



MARINÊS FERREIRA PIRES

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO,
ANATÔMICO E CITOMÉTRICO DE *Panicum
aquaticum* Poir. EXPOSTOS A DIFERENTES
METAIS PESADOS**

LAVRAS – MG

2012

MARINÊS FERREIRA PIRES

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO, ANATÔMICO E CITOMÉTRICO
DE *Panicum aquaticum* Poir. EXPOSTOS A DIFERENTES METAIS
PESADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Coorientador

Dr. Fabrício José Pereira

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Pires, Marinês Ferreira.

Comportamento fisiológico, anatômico e citométrico de *Panicum aquaticum* Poir. expostos a diferentes metais pesados / Marinês Ferreira Pires. – Lavras : UFLA, 2012.

155 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Evaristo Mauro de Castro.

Bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Elementos tóxicos. 3. Trocas gasosas. 4. Anatomia ecológica. 5. Sistema antioxidante. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 584.92041

MARINÊS FERREIRA PIRES

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO, ANATÔMICO E CITOMÉTRICO
DE *Panicum aquaticum* Poir. EXPOSTOS A DIFERENTES METAIS
PESADOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dr. João Paulo Rodrigues D. Barbosa UFLA

Dr. Sandro Barbosa UNIFAL-MG

Dr. Evaristo Mauro de Castro

Orientador

LAVRAS – MG

2012

À Mariana, minha mãe, por me ensinar a ter sonhos e, mesmo sentindo a minha ausência, fazer tudo para que eu os realizasse. Obrigada por todas as velas acesas.

Ao João, meu pai, pelo apoio incondicional a todas as minhas escolhas e pela simplicidade e sabedoria que sempre foram exemplos para mim.

À Josiane, minha irmã, por ser meu porto seguro nos momentos difíceis e minha confidente nos bons. Obrigada pelo incentivo sempre.

Ao Jean, meu amor, por simplesmente ter chegado à minha vida.

DEDICO

Às minhas irmãs de coração: Tânia, Thaís, Flávia e Suelen.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pelo amor, dedicação, carinho e apoio incondicionais que permitiram que eu chegasse até aqui.

Ao Professor Dr. Evaristo M. de Castro, meu orientador, pelos ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pelo apoio e amizade que foram fundamentais para minha formação profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Fabrício J. Pereira, por sempre ter acreditado na minha capacidade, pelos muitos ensinamentos e pela amizade que permitiram meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Sandro Barbosa pela amizade, orientação e confiança que propiciaram minha iniciação no ambiente acadêmico e de pesquisa.

Aos professores do Setor de Fisiologia e aos técnicos e funcionários do Departamento de Biologia (DBI) pelo apoio e ensinamentos.

À Professora Janice G. de Carvalho por permitir a utilização de laboratórios e casa de vegetação para condução de parte dos experimentos.

À Professora Dr. Hilda M. Longhi-Wagner (UFRGS) pelo auxílio na confirmação da espécie.

À Joyce, Leila e Catarina pelo auxílio nas análises de citometria de fluxo.

À Sara, Amanda, Jean e Túlio pela imensa ajuda nas análises enzimáticas.

À Elícia, Thaís, Maíra e João por todo auxílio nas análises anatômicas.

Ao Vinícius e André pela grande ajuda nas análises de trocas gasosas.

À Cynthia pela amizade construída nesses anos de convivência, pelos valiosos ensinamentos e apoio no laboratório.

Aos amigos e colegas por todos os momentos divididos dentro e fora da UFLA:

Kamila, Carla, Amanda, Maísa, Bárbara, Leandro, Paulo, Vinícius, Pollyanna, Evânia, Túlio, André, Tatiele, Zélia, Afonso e Gabriel.

Ao Jean, por todo amor, carinho, paciência e apoio tanto na condução desse experimento, como em nossa vida fora da UFLA.

À Tânia por ser sempre meu anjo da guarda, pela amizade e carinho em todos os momentos difíceis e felizes.

À Thaís pelo carinho e amizade, pela disponibilidade em me ouvir sempre, por ser juntamente com a Flávia a família que escolhi.

À Flávia pela amizade, atenção e apoio e pelas longas e divertidas conversas que sempre foram fundamentais.

À Suelen que, embora distante, está sempre presente em minha vida.

À Juliana que, apesar da recente amizade, fez parte de momentos especiais.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal (PPGFV) pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (Fapemig) pela concessão da bolsa.

A Deus.

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer."

(Amyr Klink)

*"E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar
É tão bonito quando a gente pisa firme
Nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos
É tão bonito quando a gente vai à vida
Nos caminhos onde bate bem mais forte o coração."*

Caminhos do coração

(Gonzaguinha)

RESUMO

A poluição de ambientes aquáticos, por metais pesados e outros elementos tóxicos, causam mudanças nas propriedades físicas e químicas da solução aquosa tornando-a tóxica para diferentes formas de vida. A fitorremediação é uma alternativa eficiente e de baixo custo para descontaminação do meio ambiente. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com a finalidade de avaliar a tolerância de plantas de *Panicum aquaticum* a crescentes concentrações de cádmio, arsênio e chumbo com base em seus mecanismos fisiológicos, anatômicos e na quantidade de DNA. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva Hoagland e Arnon e submetidas a seis concentrações de Cd, As e Pb. Ao final do experimento, o crescimento, as trocas gasosas, a anatomia da folha e da raiz, as atividades de enzimas do sistema antioxidante, bem como o conteúdo de DNA foram avaliados. As plantas apresentaram um aumento do crescimento na presença de Pb, redução do crescimento na presença de As, e nenhuma alteração do crescimento quando cultivadas com Cd. Não foram observados efeitos dos elementos tóxicos na taxa assimilatória líquida e nas características de trocas gasosas em qualquer dos tratamentos. As alterações anatômicas ocorreram favoravelmente à tolerância ao estresse em folhas e raízes de plantas cultivadas em Cd e Pb. Todavia, o As promoveu modificações anatômicas negativas, tanto em folhas como em raízes, dando indícios da toxicidade desse metaloide. A atividade das enzimas do sistema antioxidante foi afetada de diversas maneiras: o Cd promoveu aumento na atividade da catalase na folha e redução da atividade de peroxidase do ascorbato na raiz; o As causou o aumento na atividade da catalase foliar em suas concentrações menores, e redução da atividade dessa enzima em suas concentrações mais elevadas; o Pb promoveu alterações na atividade da catalase nas folhas, com um aumento inicial nas menores concentrações seguido por um declínio nas concentrações maiores. A quantidade de DNA foi afetada apenas por As. Os resultados apresentados por *P. aquaticum* demonstraram que a contaminação por Cd e Pb não afetou o seu crescimento e desenvolvimento que associados a ausência de sintomas de toxicidade caracterizam tolerância desta espécie para esses elementos. Por outro lado, *P. aquaticum* apresentou tolerância parcial à contaminação por arsênio.

Palavras-chave: Fitorremediação. Elementos tóxicos. Anatomia ecológica. Trocas gasosas. Sistema antioxidante.

ABSTRACT

Pollution of aquatic environments by heavy metals bring changes in physical and chemical properties, turning the aqueous solution toxic to various life forms. In turn, the phytoremediation is an efficient and low cost alternative for decontamination of the environment. Thus, this study was to evaluate the effect of contamination by cadmium, arsenic and lead on physiology, anatomy and DNA content of the macrophyte *Panicum aquaticum*. Plants were grown in Hoagland and Arnon nutritive solution and submitted to six concentrations of Cd, As and Pb. At the end of experiment, plant growth, gas exchange, leaf and root anatomy, antioxidant system enzyme activities as well as the DNA content were evaluated. Plants showed higher growth at the presence of Pb, reduced growth in the presence of As but, no growth changes when cultivated with Cd. No effects of toxic elements in the net assimilation rate and characteristics of gas exchange were detected in any of the treatments. The anatomical changes occurred favorably in leaves and roots of plants grown under Cd and Pb. But, As promoted negative anatomical modifications on the plants, both in leaves and roots. The enzyme activity of the antioxidant system was affected in different ways: Cd increased the CAT activity in the leaf and decreased activity of APX in root, leaf CAT was the only studied enzyme that was affected by As, increasing its activity in lower concentrations of As but decreasing in the higher concentrations; Pb only promoted changes in leaves CAT activities, with an initial increase followed by a decline in higher concentrations. The DNA content was only affected by As. Results showed that in *P. aquaticum* under Cd and Pb contamination had their growth and development unaffected and associated with the absence of toxicity symptoms characterized tolerance of this species to those elements. *P. aquaticum* showed low tolerance to arsenic contamination.

Keywords: Phytoremediation. Toxic elements. Ecological anatomy. Ecophysiological characteristics. Antioxidant system.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Elementos tóxicos nos ecossistemas aquáticos	14
2.1.1	Toxicidade do cádmio (Cd)	15
2.1.2	Toxicidade do arsênio (As)	16
2.1.3	Toxicidade do chumbo (Pb)	17
2.2	A fitorremediação	18
2.4	As macrófitas	19
2.4.1	<i>Panicum aquaticum</i> Poir	20
2.5	Efeito dos metais pesados no crescimento vegetal	23
2.6	Efeito dos metais pesados nas trocas gasosas	24
2.7	Efeito dos metais pesados na anatomia vegetal	25
2.8	Efeito dos metais pesados no sistema antioxidante	26
2.8.1	A Dismutase do Superóxido - SOD (EC 1.15.1.1)	27
2.8.2	A Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)	27
2.8.3	A Peroxidase do ascorbato – APX (EC 1.11.1.11)	28
2.9	Efeito dos metais pesados na quantidade de DNA	28
2.10	A Citometria de Fluxo	29
3	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	44
	ARTIGO 1 Características fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA em plantas de <i>Panicum aquaticum</i> submetidas a diferentes concentrações de cádmio	44
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1	Obtenção do material vegetal	50
2.2	Instalação do experimento	50
2.3	Análises de crescimento	51
2.4	Análises de trocas gasosas	52
2.5	Análises anatômicas	52
2.6	Análises do sistema antioxidante enzimático	54
2.7	Citometria de fluxo	56
2.8	Análises estatísticas	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76

	ARTIGO 2 Tolerância à toxicidade do arsênio por <i>Panicum aquaticum</i> em função dos aspectos anatômicos, fisiológicos e da quantidade de DNA	83
1	INTRODUÇÃO	86
2	MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1	Obtenção do material vegetal	89
2.2	Instalação do experimento	89
2.3	Análises de crescimento	90
2.4	Análises de trocas gasosas	91
2.5	Análises anatômicas	91
2.6	Análises do sistema antioxidante enzimático	93
2.7	Citometria de fluxo	95
2.8	Análises estatísticas	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
5	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	115
	ARTIGO 3 Respostas fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA de plantas de <i>Panicum aquaticum</i> cultivadas na presença de chumbo	122
1	INTRODUÇÃO	125
2	MATERIAL E MÉTODOS	127
2.1	Obtenção do material vegetal	127
2.2	Instalação do experimento	127
2.3	Análises de crescimento	128
2.4	Análises de trocas gasosas	129
2.5	Análises anatômicas	129
2.6	Análises do sistema antioxidante enzimático	131
2.7	Citometria de fluxo	132
2.8	Análises estatísticas	133
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	134
5	CONCLUSÃO	150
	REFERÊNCIAS	151

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A água é responsável por vários processos vitais e por possibilitar a existência da vida no planeta. A poluição dos ecossistemas aquáticos por produtos tóxicos e a eutrofização causada pelo excesso de nutrientes são problemas que despertam o interesse mundial (RAI; TRIPATHI, 2009). Além disso, elementos como os metais pesados, apresentam uma alta propensão à biomagnificação (RAI, 2009).

De acordo com Rai e Tripathi (2009) a poluição dos ambientes aquáticos por metais pesados traz evidentes alterações em suas propriedades físico-químicas que podem tornar a solução aquosa tóxica para diversas formas de vida. Entre as atividades responsáveis por estas alterações, destacam-se o uso inadequado de fertilizantes e pesticidas, bem como o aumento da mineração e industrialização (MELO et al., 2009).

Diversas técnicas já foram desenvolvidas a fim de remover metais pesados do ambiente aquático e podem ser caracterizadas por processos químicos, físicos ou biológicos. Os agentes químicos responsáveis pela precipitação e redução, além dos agentes físicos como membranas artificiais, são tecnologias de alto custo, que podem ainda gerar resíduos de difícil eliminação. O método biológico, que utiliza plantas para a retirada de contaminantes da água, a fitorremediação, tem se mostrado uma alternativa eficiente e de baixo custo (SUÑE et al., 2007).

Vários estudos revelam que as plantas que crescem sobre áreas ricas em metais pesados apresentam plasticidades fisiológicas, anatômicas e morfológicas em resposta ao estresse provocado por esses elementos (ZOCCHÉ; FREITAS;

QUADROS, 2010). A avaliação dessas plasticidades pode permitir a seleção de espécies capazes de tolerar condições de contaminação com esses poluentes.

É comum o uso de macrófitas como um componente de tratamento biológico de águas residuais contaminadas com metais pesados. Há, no entanto, uma escassez de dados comparativos sobre a eficiência de diferentes plantas aquáticas para remoção de metais pesados em condições naturais, especialmente em regiões tropicais. Muitas plantas podem acumular metais pesados em seus tecidos. No entanto, ainda há necessidade de muitos estudos sobre o potencial de fitorremediação de macrófitas aquáticas (RAI, 2009).

As macrófitas do gênero *Panicum* L. possuem uma ampla distribuição geográfica, sendo encontradas em vários locais da América do Sul e Central e em todas as regiões do Brasil. Ocorrem em brejos, margens de cursos d'água, campos, baixadas, restingas, e locais úmidos em margens de estradas. Podem apresentar comportamento bastante agressivo atuando, em alguns casos, como invasoras de culturas e jardins (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2007).

Considerando a fitorremediação como uma das formas mais viáveis, tanto ecológica quanto econômica, para a remoção de metais pesados e recuperação de ambientes aquáticos degradados, torna-se fundamental a busca por espécies que apresentem tal capacidade. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com a finalidade de avaliar a tolerância de plantas de *Panicum aquaticum* a crescentes concentrações de cádmio, arsênio e chumbo em função de seus comportamentos anatômicos, fisiológicos e citométricos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Elementos tóxicos nos ecossistemas aquáticos

Entre os diversos poluentes dos ecossistemas aquáticos, os metais pesados são os mais preocupantes, devido a sua persistência e natureza bioacumulativa (CHANG; YOON; KIM, 2009).

Do ponto de vista químico, o termo metal pesado é estritamente atribuído a metais de transição com massa atômica acima de 20 u e densidade acima de 5 $g\ cm^{-3}$. Em biologia, "pesado" refere-se a uma série de metais e metaloides que podem ser tóxicos para plantas e animais, mesmo em concentrações muito baixas (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011). Os metais pesados também são conhecidos como elementos-traços (ETs), por serem naturalmente encontrados no ambiente em concentrações de poucas partes por milhão (MATIAZZO-PREZOTTO, 1994).

A presença de níveis baixos de metais pesados nos ecossistemas aquáticos decorre naturalmente da lenta lixiviação do solo e de rochas (CHANG; WEN; WANG, 2000). Todavia, o desenvolvimento da indústria e da agricultura promoveu um rápido aumento da poluição ambiental, gerando altos níveis de Hg, Cr, Pb, Cd, Cu, Zn, Ni, entre outros nos sistemas aquáticos (LIANG et al., 2004; ZHOU et al., 2008).

Uma vez disponíveis no ambiente, os metais são absorvidos pelas plantas, incorporados aos demais organismos do ambiente aquático, principalmente pela alimentação, acumulando-se ao longo da cadeia trófica. Os danos causados pela bioacumulação dos metais pesados são muitos, entre eles a morte de organismos planctônicos e a diminuição de populações de consumidores primários e secundários, como peixes e aves (ZHOU et al., 2008).

Além disso, as plantas, quando expostas à contaminação por metais pesados, podem apresentar danos morfológicos e fisiológicos (KARENLAMPI et al., 2000), que prejudicam o seu crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, algumas plantas possuem a capacidade de tolerar e até mesmo acumular metais pesados em seus tecidos, podendo ser utilizadas na remediação dos ecossistemas aquáticos (ZHOU et al., 2008).

2.1.1 Toxicidade do cádmio (Cd)

O metal cádmio pertence à coluna 2B da tabela periódica, apresentando número atômico igual a 48 e peso atômico padrão de 112,411 (WIESER; COPLEN, 2011). É disperso no ambiente de modo natural e pelas atividades humanas, como agricultura, mineração, refinarias de petróleo, incineradoras e queima de combustíveis fósseis (WAGNER, 1993).

É um elemento não essencial que pode afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas, com sintomas como clorose foliar, necrose das folhas e raízes (HERNANDEZ; COOKE, 1997). Por ser um metal altamente tóxico e relativamente móvel, o cádmio inibe o crescimento da raiz e a produção da parte aérea, afeta a absorção de nutrientes e a homeostase (JOHN et al., 2009).

O princípio básico da toxicidade do cádmio em sistemas biológicos está na sua forte afinidade por ligações dissulfeto (SH), atingindo metaloenzimas de zinco, proteínas de membranas e a fosforilação oxidativa (WAGNER, 1993). Como consequência há prejuízo na respiração celular, inibição da atividade enzimática, desnaturação de proteínas ou inibição dos processos de transporte celular (HERNANDEZ; COOKE, 1997; SANDALIO et al., 2001). Em plantas, o cádmio é particularmente danoso para a fotossíntese, inibindo a atividade da

rubisco no Ciclo de Calvin, afetando os fotossistemas I e II e reduzindo os níveis de clorofilas e carotenoides (SIEDLECKA et al., 1997).

2.1.2 Toxicidade do arsênio (As)

O arsênio, com propriedades de elementos metálicos e não metálicos pertence à coluna 5A da tabela periódica, possui número atômico 33 e peso atômico padrão igual a 74,921 (WIESER; COPLEN, 2011). É um metaloide presente em solos, rochas e ambiente aquático, sendo mobilizado através de uma combinação de fatores naturais, tais como reações de intemperismo, atividade biológica e emissões vulcânicas (SRIVASTAVA et al., 2011).

Embora a ocorrência de arsênio no ambiente seja principalmente em minerais, as atividades humanas, tais como mineração, queima de combustíveis fósseis e o uso de produtos químicos contendo arsênio na agricultura também causam deposição desse elemento no ambiente (BISSEN; FRIMMEL, 2003).

O arsênio raramente é encontrado em sua forma nativa, devido a sua afinidade com outros elementos (RAHMAN; HASEGAWA, 2011). No ambiente, o arsênio inorgânico é encontrado em quatro estados de oxidação – arsenato (As V), arsenito (As III), arsênio (As 0) e arsino (As -III) (SHARMA; SOHN, 2009). Os estados de oxidação predominantes, arsenato e arsenito, são tóxicos e sua presença relativa em ambientes aquáticos é determinada pelo pH e condições redox prevalentes (SRIVASTAVA et al., 2011). Ainda em ambientes aquáticos, as formas inorgânicas dominantes podem ser incorporadas em microorganismos e convertidas em compostos metilarsênicos e outras formas orgânicas de arsênio (MAHER, 1984).

Devido à sua solubilidade, mobilidade e disponibilidade, a alta fitotoxicidade do arsênio vem sendo relatada em muitos estudos. O arsênio interfere em processos metabólicos e inibe o crescimento e desenvolvimento das plantas (MARIN et al., 1993). Essa toxidez em plantas pode estar relacionada à interrupção do fluxo energético entre as células, por este metaloide competir com o elemento fósforo (P), devido às suas semelhanças químicas (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

2.1.3 Toxicidade do chumbo (Pb)

O metal chumbo pertence à coluna 4A na tabela periódica, exibindo número atômico 82 e peso atômico padrão de 207,2 (WIESER; COPLEN, 2011). Além de não ser um nutriente essencial às plantas, o chumbo é um dos metais pesados mais abundantes e perigosos que poluem o ambiente, tendo sua origem a partir de fontes como mineração, fundição, queima de carvão, efluentes de indústria de baterias, pesticidas, fertilizantes e aditivos de pigmentos na gasolina (EICK et al., 1999). Desse modo, esse metal pode ser lixiviado na superfície e contaminar o solo e ecossistemas aquáticos (SHARMA; DUBEY, 2005), onde é altamente bioacumulado (BI et al., 2010).

O chumbo tem diversos efeitos em plantas e animais. Em plantas esse metal retarda a germinação das sementes, crescimento e processos fotossintéticos, causa inibição da atividade de enzimas, desbalanço hídrico e hormonal, alteração na permeabilidade da membrana e distúrbios na nutrição mineral (SHARMA; DUBEY, 2005). Adicionalmente, o chumbo causa deficiência em zinco, que é cofator de várias enzimas (SINGH et al., 2010), além de se complexar com partículas coloidais e componentes da água, podendo alterar a absorção e translocação de nutrientes minerais (SINHA et al., 2006).

2.2 A fitorremediação

Ambientes contaminados por metais pesados podem ser recuperados por meio de técnicas físicas, químicas ou biológicas (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007). As muitas tecnologias convencionais, como precipitação química, ultrafiltração, oxidação e redução química, tratamento eletroquímico, osmose reversa, coagulação e mudanças iônicas, entre outras, usadas para remover os metais pesados poluentes (VOLESKY, 2001) têm benefícios e limitações. Nos últimos anos, muitos estudos têm sido conduzidos a fim de melhorar a qualidade da água e, nesse sentido, a fitorremediação mostrou-se uma alternativa interessante (RAI, 2009).

O termo “fitorremediação” tem origem do grego *phyto* (planta) e do latim *remedium* (restabelecimento do balanço ou remediação). Consiste em atenuar a concentração de poluentes no solo, água ou ar com plantas de ocorrência natural, introduzidas e/ou geneticamente modificadas, que tem a capacidade de acumular poluentes como metais, pesticidas, solventes, petróleo e seus derivados (PRASAD; FREITAS, 2003). O principal objetivo por trás do desenvolvimento dessa tecnologia é a mínima agressão ao meio ambiente além do baixo custo efetivo em comparação às demais tecnologias (SOOD et al., 2011).

As plantas apresentam uma variedade de mecanismos em resposta aos metais pesados (SAIER JÚNIOR; TREVORS, 2010), que estão relacionados aos diferentes processos de fitorremediação: fitoextração (absorção e acumulação de poluentes nos tecidos da planta), fitodegradação (degradação dos poluentes pelas plantas e microorganismos associados), fitoadsorção (adsorção dos poluentes no sistema radicular, imobilizando os contaminantes), fitoestabilização (liberação de compostos que podem imobilizar os poluentes); fitovolatilização (volatilização

dos poluentes para a atmosfera por intermédio das plantas) e rizofiltração (absorção dos poluentes pelas raízes de plantas em ambiente aquático) (PILON-SMITS, 2005).

A eficiência da planta em descontaminar o ambiente está ligada à capacidade de absorção, acumulação, metabolização e tolerância ao poluente, alta taxa de crescimento e produção de biomassa, uma fácil colheita, resistência a pragas e doenças, fácil aquisição ou multiplicação de propágulos e capacidade de desenvolver-se em ambientes diversificados (OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, é válido ressaltar que dificilmente uma espécie terá todas essas características agrupadas, contudo, deverá ser selecionada aquela que reunir o maior número de pré-requisitos possíveis (WOLFF et al., 2009).

2.4 As macrófitas

Macrófitas são plantas aquáticas de diversos grupos e famílias que crescem em/ou próximas a corpos d'água ou ambientes lóticos ou lênticos, sendo classificadas como emersas, submersas ou flutuantes (RAI, 2009). Essas plantas são mais adequadas para os tratamentos de águas residuárias do que plantas terrestres, por apresentarem crescimento mais rápido e maior produção de biomassa, alta capacidade de absorção de poluentes e melhor efeito de purificação pelo contato direto com a água contaminada (SOOD et al., 2011). Possuem importante papel estrutural e características funcionais no ecossistema aquático, por alterar o regime de movimentos na água, promover abrigo para peixes e invertebrados aquáticos, servir como fonte de alimento e alterar a qualidade da água por regular o balanço de oxigênio, ciclo de nutrientes e acumulação de metais pesados (SRIVASTAVA; GUPTA; CHANDRA, 2008; DHOTE; DIXIT, 2009).

As macrófitas têm grande capacidade de acumular metais pesados em seus tecidos. Sabe-se, no entanto, que a remoção dos metais por macrófitas podem seguir diferentes padrões: os metais são impedidos de alcançar os tecidos internos da raiz pelas barreiras apoplásticas, podendo ficar retido na parede das células da epiderme ou exoderme; os metais são acumulados nos tecidos radiculares, com limitada translocação para parte aérea; os metais são hiperacumulados nos tecidos de toda a planta (MISHRA; TRIPATHI, 2008).

Portanto, as macrófitas apresentam comportamentos específicos quanto à sua capacidade e mecanismo de absorção de poluentes. Isso sugere a necessidade de estudos que visem à identificação de qual órgão acumula maior quantidade de poluentes e seus mecanismos de tolerância a estas substâncias (OLIVEIRA, 2010). A análise dos tecidos destas espécies podem ainda fornecer, ao longo do tempo, informações sobre a qualidade da água (BALDANTONI et al., 2005).

2.4.1 *Panicum aquaticum* Poir

A tribo Paniceae é uma das maiores da subfamília Panicoideae (Poaceae) na qual mais de 2000 famílias são incluídas em aproximadamente 208 gêneros. São principalmente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, com apenas poucos representantes em áreas temperadas e frias (MORRONE et al., 2011).

Essa tribo inclui uma enorme diversidade morfológica, citológica e fisiológica, representada por diferentes padrões de espiguetas, tipos de inflorescências, vários números básicos de cromossomos, anatomia foliar variável e diferentes mecanismos fotossintéticos (ALISCIONI et al., 2003).

Panicum é considerado um grupo de espécies, taxonomicamente complexo. É um dos maiores gêneros de Poaceae, com cerca de 450 espécies (ALISCIONI et al., 2003). Esse gênero inclui, entre suas espécies, todos os mecanismos fotossintéticos conhecidos em Poaceae, incluindo o sistema fotossintético C₃ e C₄ e alguns mecanismos intermediários C₃/C₄. As espécies C₄ incluem ainda, representantes dos subtipos fotossintéticos NAD-enzima málica (NAD-ME), NADP-enzima málica (NADP-ME) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEP-CK) (ALISCIONI et al., 2003; BROWN, 1977).

O número básico de cromossomos também é variável, com múltiplos de 8, 9, 10, 11 e 15 sendo reportados para *Panicum* (ALISCIONI et al., 2003; HAMOUD et al., 1994).

O gênero *Panicum* distingue-se dos demais gêneros da tribo Paniceae principalmente por apresentar espiguetas com ambas as glumas desenvolvidas. As lâminas foliares variam de lineares a linear-lanceoladas, não apresentam pseudopecíolo, são planas ou involutas, glabras ou com indumento variado (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2008).

A epiderme, em secção transversal, é unisseriada e apresenta células hexagonais a retangulares, raramente obovais ou elípticas. Grupos de duas a sete células buliformes estão localizados na face adaxial da epiderme, distribuídos entre os feixes vasculares de primeira e segunda ordem, e algumas vezes também na região da nervura central. Papilas podem ocorrer na face adaxial da epiderme ou, mais raramente, em ambas as faces. O clorênquima é compacto e radiado em torno dos feixes vasculares. Entre os feixes vasculares geralmente estão presentes duas a cinco células clorênquimáticas. Também podem ocorrer colunas com uma a três fileiras de células parenquimáticas aclorofiladas associadas às células buliformes entre os feixes vasculares. Cordões de fibras esclerenquimáticas, opostos aos feixes vasculares de diferentes ordens, são

observados junto à face adaxial da epiderme, mais raramente à abaxial (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2008).

Os feixes vasculares são de contorno oval ou circular. Apresentam duas bainhas, a interna esclerenquimática e a externa parenquimática, esta constituída de células com cloroplastos especializados de posição centrípeta ou centrífuga. Algumas espécies apresentam parênquima fundamental com diferentes graus de desenvolvimento na região da nervura central. A presença de quilha definida está associada à ocorrência deste tecido, o qual promove o deslocamento do feixe vascular central em direção à face abaxial, conferindo uma forma triangular a essa região (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2008).

Panicum aquaticum, também conhecida como canarana ou capim de tartaruga, está distribuída nas cinco regiões geográficas do Brasil, e ocorre em brejos, margens de cursos d'água, campos, baixadas, restingas e locais úmidos em margens de estradas. Apresenta comportamento bastante agressivo, podendo atuar como invasora de culturas e jardins (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2007).

Estudos apontam algumas espécies do gênero *Panicum* com capacidade de degradar herbicidas no solo como *Panicum virgatum* (MURPHY; COATS, 2011) e *Panicum maximum* (ASSIS et al., 2010; CARMO et al., 2008). Da mesma forma, *Panicum aquaticum* pode apresentar um potencial para descontaminação do ambiente por elementos tóxicos. Além disso, segundo Carneiro, Siqueira e Moreira (2001), poáceas tem demonstrado potencial para uso na recuperação de áreas degradadas por metais pesados pela relativa facilidade em se desenvolver e, portanto promover rápida e densa cobertura do ambiente, fornecendo uma estrutura física, atenuando a erosão e adicionando matéria orgânica.

2.5 Efeito dos metais pesados no crescimento vegetal

O crescimento da planta é usado frequentemente como uma característica de fácil mensuração para monitorar os efeitos de vários estresses. Modificações no crescimento são as primeiras e mais óbvias reações das plantas às condições de estresse (PRASAD, 2004).

Apesar de diferentes metais variarem expressivamente em seus efeitos bioquímicos, usualmente causam algum tipo de dano oxidativo, resultando em efeitos fenotípicos que são similares para os diferentes elementos (SHAW; SAHU; MISHRA, 2004), como a redução na produção e alocação de biomassa.

Postula-se que plantas ajustam sua alocação e distribuição de biomassa relativa em seus órgãos quando sujeitas a condições de estresse, referido como plasticidade de alocação (AUDET; CHAREST, 2008). Além disso, efeitos de estresse como aqueles provocados por metais pesados podem afetar o crescimento por causar alterações em processos básicos como fotossíntese e respiração (DHIR et al., 2011).

A taxa de crescimento relativo (TCR) é uma medida de eficiência do crescimento das plantas, sendo avaliada como a taxa de produção de massa seca por unidade de massa seca existente por tempo (USECHE; SHIPLEY, 2010). Além disso, a TCR ocorre em função de um componente morfológico, a razão de área foliar (RAF), caracterizada como área foliar por unidade de massa seca total, e de um componente fisiológico, a taxa assimilatória líquida (TAL), considerada o incremento de massa seca total em função da área foliar (WRIGHT; WESTOBY, 2000).

A RAF varia em função da área foliar específica (AFE), que é a área foliar por unidade de massa seca foliar, e da razão de massa foliar (RMF), que é a proporção de massa seca total alocada às folhas. Esses parâmetros são

relativamente sensíveis às condições ambientais, embora os incrementos na RAF sejam mais consequência do incremento da AFE do que da RMF, já que os valores da AFE são mais sensíveis às alterações da irradiância (LAMBERS; POORTER, 1992).

A AFE é uma medida estratégica da alocação da biomassa que reflete a área disponível para a captura de luz por unidade de fotoassimilados investidos nas folhas. Para alguns autores, a AFE seria a característica que melhor explicaria as diferenças na TCR entre espécies vegetais (PINZÓN-TORRES; SCHIAVINATO, 2008).

Além disso, a taxa fotossintética refletida indiretamente na TAL é o resultado da interação das variações dos fatores ambientais (luz, CO₂, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, idade das folhas, etc.), com as diferenças específicas de cada espécie, segundo seu genótipo (PINZÓN-TORRES; SCHIAVINATO, 2008). De acordo com Magalhães (1985), a TAL reflete a dimensão do sistema assimilador que é envolvida na produção de matéria seca, ou seja, é uma estimativa da fotossíntese líquida.

2.6 Efeito dos metais pesados nas trocas gasosas

A fotossíntese é essencial para o crescimento das plantas, (WANG; ZHOU; HUANG, 2009), e também um dos processos mais sensíveis às altas concentrações de metais pesados (BERTRAND; POIRIER, 2005; SHUKLA et al., 2003).

Os efeitos fisiológicos de metais pesados podem ser observados na biossíntese de clorofilas, na dinâmica das reações fotoquímicas e na atividade das enzimas do Ciclo de Calvin (CAGNO et al., 1999; SKORZYNSKA-POLIT; DRAZKIEWICZ; KRUPA, 2003).

A fotossíntese líquida é definida como a diferença entre a fotossíntese bruta (produção da fotossíntese no interior dos cloroplastos) e o que é consumido pela respiração. Desse modo, a fotossíntese líquida é o aspecto fisiológico de maior importância relacionado ao crescimento, uma vez que o mesmo é avaliado por meio de variações de tamanho de algum aspecto da planta, geralmente morfológico, em função da acumulação de material resultante (CARVALHO et al., 2009).

Assim, alterações no crescimento de plantas sob contaminação por metais pesados podem ser atribuídas a danos no processo fotossintético, ou seja, a toxicidade dos metais pesados pode ser detectada na taxa fotossintética líquida (A), que por sua vez é também determinada pela concentração de CO₂ no interior da folha (C_i) que é controlada pela condutância estomática (g_s). Da mesma forma a taxa transpiratória (E) também pode ser afetada pelo estresse (AHMAD et al., 2011).

2.7 Efeito dos metais pesados na anatomia vegetal

As folhas são, geralmente, mais expostas às condições aéreas, sendo mais sensíveis e plásticas às mudanças do ambiente que outros órgãos da planta. As mudanças nas condições ambientais, como estresse por metais pesados, tipicamente resultam em respostas morfológicas e anatômicas nesse órgão da planta (LI et al., 2007; SHI; CAI, 2009).

Por outro lado, as raízes são, normalmente, o primeiro órgão da planta a entrar em contato com a contaminação por metais pesados. Portanto, diferenças na estrutura e organização dos tecidos radiculares, assim como no desenvolvimento de barreiras apoplásticas, são comuns entre espécies tolerantes ou sensíveis a esses poluentes (VACULÍK et al., 2012).

Logo, a absorção e translocação de altas concentrações de metais pesados causam mudanças estruturais e ultraestruturais, (SRIDHAR et al., 2005), que afetam o crescimento e o bem-estar fisiológico das plantas. Isso já foi constatado em vários estudos como os de Pereira et al. (2011) em plantas de aguapé. Nesse sentido, tornam-se necessários estudos da anatomia, como meio de avaliar e elucidar possíveis mecanismos de tolerância a determinados poluentes (MUFARREGE; HADAD; MAINE, 2009; WOLFF et al., 2009).

2.8 Efeito dos metais pesados no sistema antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (HO^\cdot), são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico que em condições normais tem baixa produção na célula, sendo rigorosamente controlada (DAT et al., 2000; RADY, 2011). Uma consequência comum de muitos estresses abióticos é o aumento na produção de EROs, ou seja, o equilíbrio entre a produção e remoção de EROs pode ser perturbada por fatores como a presença de metais pesados (GILL; TUTEJA, 2010).

Em altas concentrações nas células, EROs reagem com lipídeos, proteínas, pigmentos e ácidos nucleicos, causando peroxidação lipídica, danos em membranas e inativação de enzimas, afetando a viabilidade celular. O efeito deletério causado pelo estresse oxidativo pode ser aliviado pelo sistema antioxidante enzimático e não enzimático da planta (KHAN; AHMAD; IQBAL, 2009). Dentre os antioxidantes enzimáticos estão a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) a glutathiona redutase (GSH) e a peroxidase do ascorbato (APX). Como antioxidantes de baixo peso molecular não enzimático, pode-se

citar o ácido ascórbico, carotenoides e tocoferóis (UPADHYAY; PANDA, 2009).

2.8.1 A Dismutase do Superóxido - SOD (EC 1.15.1.1)

A metaloenzima SOD é a enzima intracelular mais efetiva do sistema antioxidante, presente em todos os organismos aeróbicos (GILL; TUTEJA, 2010), em compartimentos celulares distintos: Fe-SOD (localizada no cloroplasto), Mn-SOD (localizada na mitocôndria e peroxissomo) e Cu-Zn-SOD (localizada no peroxissomo, cloroplasto, citosol e possivelmente no espaço extracelular) (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002).

Essas enzimas removem o O_2^- por catalisar sua dismutação em H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010), que será convertido em H_2O e O_2 pela catalase e peroxidases. Isso demonstra a importância da combinação das atividades da SOD e da CAT para manutenção dos processos celulares (CHEN et al., 2003).

2.8.2 A Catalase - CAT (EC 1.11.1.6)

A heme enzima tetramérica CAT está presente, principalmente, nos peroxissomos, e pode ser encontrada em menor quantidade na mitocôndria, no cloroplasto e no retículo endoplasmático. É responsável pela dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 durante a fotorrespiração, β -oxidação dos ácidos graxos e durante o estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010).

A reação de dismutação pode envolver dois processos distintos. Em um dos processos o H_2O_2 pode reagir com grupos heme da enzima, formando peróxido de ferro, que por sua vez, pode reagir novamente com outra molécula de H_2O_2 formando H_2O e O_2 , caso o peróxido de hidrogênio esteja em altas

concentrações. Por meio de outro processo, o peróxido de ferro pode ser reduzido por antioxidantes não enzimáticos, como por exemplo, o ácido ascórbico (CHEN et al., 2003).

2.8.3 A Peroxidase do ascorbato – APX (EC 1.11.1.11)

A família da APX tem pelo menos cinco diferentes isoformas, incluindo citosólica, mitocondrial, peroxissomal, glioxossomal e cloroplastídica (GILL; TUTEJA, 2010).

A APX é uma enzima chave no ciclo da glutathiona - ascorbato que reduz o H_2O_2 até H_2O usando ascorbato como doador de elétrons com geração de deidroascorbato. Este é reciclado a ascorbato usando a glutathiona reduzida (GSH) como doadora de elétrons. A glutathiona oxidada (GSSG) formada é convertida a glutathiona reduzida pela enzima glutathiona redutase (GR) (GILL; TUTEJA, 2010; NOCTOR; FOYER, 1998).

A APX tem maior afinidade por H_2O_2 que a CAT e as demais peroxidases, demonstrando maior importância no controle de EROs durante o estresse em plantas (GILL; TUTEJA, 2010).

2.9 Efeito dos metais pesados na quantidade de DNA

Embora o genoma das plantas seja estável, seu DNA pode sofrer danos por exposição a estresses bióticos e abióticos, exercendo, desse modo, estresse genotóxico (GILL; TUTEJA, 2010).

O aumento na concentração de EROs decorrente da presença de elementos tóxicos pode gerar apoptose e dano ao DNA, além de mudanças na atividade de enzimas relacionadas à síntese de DNA e ao reparo de erros de

replicação, que podem ou não estar associados a um dano oxidativo (FILIPIC; HEI, 2004). Além disso, EROs tem a capacidade de induzir danos como a deleção de bases, ligações cruzadas de pirimidina, quebra de ligações, modificações de bases, como alquilação e oxidação (TUTEJA et al., 2009).

Danos no DNA resultam em vários efeitos fisiológicos, como redução na síntese de proteínas, destruição da membrana celular e danos nas enzimas fotossintéticas, afetando o crescimento e desenvolvimento da planta (TUTEJA; TUTEJA, 2001).

Por outro lado, vários mecanismos estão disponíveis para reparar os danos no DNA nuclear e mitocondrial. Esses mecanismos incluem reversão direta do dano, substituição de bases e de todo o nucleotídeo (TUTEJA et al., 2009). De acordo com Roldán-Arjona e Ariza (2009) as lesões oxidativas do DNA são uma ameaça constante na manutenção do genoma, e sua frequência e importância têm provocado o desenvolvimento de funções de reparo específicas na célula, algumas das quais tem sido altamente conservadas durante a evolução.

2.10 A Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que tem potencial para detectar mínimas diferenças no conteúdo de DNA nuclear, bem como danos nos cromossomos (MONTEIRO et al., 2010). Seu princípio básico consiste na análise de propriedades ópticas, tais como dispersão da luz e fluorescência de partículas que fluem em uma suspensão líquida formada por um tampão de extração (usualmente uma solução tampão hipotônica com um detergente não iônico) (GALBRAITH et al., 1983). Essas partículas podem ser núcleos, organelas, células ou cromossomos.

Tais partículas em suspensão, coradas com fluorocromos específicos que se ligam ao DNA (DAPI, iodeto de propídeo, brometo de etídeo), movem-se por um capilar dentro do citômetro de fluxo intersectando um feixe de laser, o que causa a emissão de fluorescência e/ou dispersão da luz com intensidade de acordo com as características das partículas (CÔRTE-REAL et al., 2002; DOLEZEL, 1997). Assim, pode-se analisar, simultaneamente, as distribuições dos valores da frequência e/ou densidade de cada parâmetro. Os sinais emitidos pelas partículas são convertidos em valores digitais e exibidos na forma de histogramas. A quantificação do conteúdo de DNA é feita com base na intensidade da fluorescência emitida pelos núcleos, células em suspensão e outras partículas, corados com um fluorocromo específico para DNA. Estes valores são comparados aos valores apresentados por um padrão de referência, o qual já possui sua quantidade de DNA conhecida (SILVA, 2011).

Finalmente, para estimar a quantidade de DNA da amostra estudada, a posição de seu pico G1 no histograma é comparada à posição do pico G1 da planta utilizada como padrão de referência. Entretanto, as medições da quantidade de DNA não são exatas, podem apresentar variações relacionadas com a metodologia aplicada para o isolamento dos núcleos, com a coloração com fluorocromos específicos para DNA nuclear e, ainda, com a leitura no citômetro de fluxo. Essas variações são expressas no coeficiente de variação ($CV = \text{desvio padrão}/\text{média}$), cujos valores considerados como de alta qualidade variam de 1 a 2% e os valores tidos como de rotina são de até 3% (MARIE; BROWN, 1993).

3 CONCLUSÃO

A crescente preocupação com a qualidade da água diante dos problemas causados pela contaminação por elementos tóxicos torna indispensável o desenvolvimento de tecnologias viáveis, limpas e de baixo custo que atuem na recuperação desses ambientes. Nesse contexto, a fitorremediação tem ocupado situação de destaque, e muitos estudos têm sido realizados a fim de identificar espécies com potencial para acumular elementos tóxicos em seus tecidos.

Entretanto, além da seleção dessas espécies, torna-se fundamental o estudo do comportamento fisiológico, relacionado ao crescimento, às trocas gasosas e ao sistema antioxidante enzimático; anatômico, destacando plasticidades dos tecidos foliares e radiculares; e citométrico, avaliando a quantidade de DNA de plantas expostas a diferentes elementos tóxicos. A compreensão desses mecanismos fornece informações sobre a capacidade de tolerância da planta, aprimorando assim, os estudos relacionados à fitorremediação.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. S. A. et al. Lead (Pb)-Induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 144, p. 1229–1239, 2011.
- ALISCIONI, S. S. A molecular phylogeny of *Panicum* (Poaceae:Paniceae): tests of monophyly and phylogenetic placement within the Panicoideae. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 90, n. 5, p. 796–821, 2003.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEALTH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue. **Journal of experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ASSIS, R. L. et al. Fitorremediação de solo contaminado com o herbicida Picloram por plantas de *Panicum maximum* em função do teor de água no solo. **Engenharia Agrícola**, Sorocaba, v. 30, n. 5, p. 845-853, set./out. 2010
- AUDET, P.; CHAREST, C. Allocation plasticity and plant metal partitioning: Meta-analytical perspectives in phytoremediation. **Environmental Pollution**, Barking, v. 156, p. 290-296, 2008.
- BALDANTONI, D. et al. Analyses of three native aquatic plant species to assess spatial gradients of lake trace element contamination. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 46-60, Sept. 2005.
- BERTRAND, M.; POIRIER, I. Photosynthetic organisms and excess of metals. **Photosynthetica**, Prague, v. 43, p. 345–53, 2005.

BISSEN, M.; FRIMMEL, F. H. Arsenic – a review. Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. **Acta Hydrochimic Hydrobiology**, Weinheim, v. 31, p. 9–18, 2003.

BROWN, W. V. The Kranz syndrome and its types in grass stematics. **Memoirs of the Torrey Botanical Club**, v. 23, p. 1–97, 1977.

CAGNO, R. et al. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. **New Phytologist**, Cambridge, v. 144, p. 65-71, 1999.

CARMO, M. L. et al. Influence of *Panicum maximum* cultivation period on Phytoremediation of soil contaminated with picloram. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 315-322, 2008.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Establishment of herbaceous plants in soils contaminated with heavy metals and inoculation with mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 1443-1452, 2001.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Tópicos em ciências agrárias**. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, 2009. v. 1, 296 p.

CHANG, J. S.; YOON, I. H.; KIM, K. W. Heavy metal and arsenic accumulating fern species as potential ecological indicators in As-contaminated abandoned mines. **Ecological Indicators**, Kiel, v. 9, p. 1275–1279, 2009.

CHANG, X. X.; WEN, C. H.; WANG, H. J. Effect of heavy metal pollution on human health and sustainable development. **Yunnan Environmental Science**, Kunming, v. 19, n. 1, p. 59-611, 2000.

CHEN, Y. X. et al. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 789-793, 2003.

CÔRTE-REAL, M. et al. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, n. 71, p. 19-33, abr. 2002.

DAT, J. et al. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, p. 779–795, 2000.

DHIR, B. et al. Heavy metal induced physiological alterations in *Salvinia natans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 1678–1684, 2011.

DHOTE, S.; DIXIT, S. Water quality improvement through macrophytes- a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 152, p. 149–153, 2009.

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plants genomes. **Journal of Applied Genetics**, Olomouc, v. 38, n. 3, p. 285-302, 1997.

EICK, M. J. Kinetics of Pb absorption/desorption on goethite: residence time effect. **Soil Science**, Madison, v. 164, p. 28–39, 1999.

FILIPIC, M.; HEI, T. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 546, p. 81–91, 2004.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, n. 4601, p. 1049-1051, June 1983.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER H. M.; ZULOAGA, F. O. Anatomia foliar das espécies de *Panicum* L. subg. *Panicum* (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) ocorrentes no Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 63, n. 2, p. 279-293, jul./dez. 2008.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER H. M.; ZULOAGA, F. O. *Panicum* Sect. *Dichotomiflora* (Hitcch. & Chase) Honda e P. sect. *Virgata* Hitcch. & Chase ex Pilg. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, n. 4, p. 785-805, 2007.

HAMOUD, M. A. et al. Cytological relationships of selected species of *Panicum* L. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 36, p. 37-45, 1994.

HERNANDEZ, L. E.; COOKE, D. T. Modifications of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1375-1381, 1997.

JOHN, R. et al. Heavy metal toxicity: effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L. **International Journal of Plant Production**, Gorgan, v. 3, n. 3, p. 65-75, July 2009.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007. 550 p.

KARENLAMPI, S. et al. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environmental Pollution**, Barking, v. 107, n. 2, p. 225-231, 2000.

KHAN, I.; AHMAD, A.; IQBAL, M. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York , v. 72, p. 626–634, 2009.

LAMBERS, H.; POORTER, H. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. **Advances Ecology Research**, Neew York, v. 23, p. 187-261, 1992.

LI, Q. et al. Leaf epidermal characters of *Lonicera japonica* and *Lonicera confuse* and their ecology adaptation. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 18, p. 103–108, 2007.

LIANG, L. N. et al. Primary investigation of heavy metal contamination status in molluscs collected from Chinese coastal sites. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.72, n. 5, p. 937-944, 2004.

MAGALHÃES, A. C. N. Análise quantitativa do crescimento. In: FERRI, M. G. **Fisiologia vegetal 1**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1985. Cap.8, p. 333-350.

MAHER, W. Arsenic in marine organisms. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 6, p. 159–164, 1984.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, p. 41-51, 1993.

MARIN, A. R. et al. Effect of dimethylarsenic acid DMAA on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 16, p. 865-880, 1993.

MATIAZZO-PREZOTTO, M. E. **Comportamento do Cobre, Cádmiu, Cromo, Níquel e Zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH.** 1994. 197 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

MELO, E. E. C. et al. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As- riched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.168, n. 1, p. 479-483, Aug. 2009.

MISHRA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, p. 7091-7097, 2008.

MONTEIRO, M. S. et al. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, p. 1231–1237, 2010.

MORRONE et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, Westport, p. 1–24, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1096-0031.2011.00384.x/abstract>>. Acesso em: 22 dez. 2011.

MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to Heavy Metals (Cr, Ni, and Zn) and Phosphorous. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Alexandria, v. 58, n. 1, p. 53-61, 2009.

MURPHY, I. J.; COATS, J. R. The capacity of switchgrass (*Panicum virgatum*) to degrade atrazine in a phytoremediation setting. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 3, p. 715–722, 2011.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio**. 2010. 171 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OLIVEIRA, D. B. et al. **Fitorremediação: o estado da arte**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2006. 32 p. (Tecnologia Ambiental).

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology: Hyperaccumulation metals in plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 184, n. 1/4, p. 105-126, 2007.

PEREIRA, F. J. et al. Anatomical and physiological mechanisms of water hyacinth plants to arsenic contamination tolerance. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 259-267, 2011.

PINZÓN-TORRES, J. A.; SCHIAVINATO, M. A. Crescimento, eficiência fotossintética e eficiência do uso da água em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 395-404, 2008.

PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. Metal hyperaccumulation in plants— Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 6, p. 285–321, 2003.

PILON- SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 15-39, 2005.

RADY, M. M. Effect of 24-epibrassinolide on growth, yield, antioxidant system and cadmium content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants under salinity and cadmium stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, p. 232–237, 2011.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H. Aquatic arsenic: phytoremediation using floating macrophytes. **Chemosphere**, Oxford, v. 83, p. 633–646, 2011.

RAI, P. K. Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 39, n. 9, p. 697–753, Sept. 2009.

RAI, P. K.; TRIPATHI, B. D. Comparative assessment of *Azolla pinnata* and *Vallisneria spiralis* in Hg removal from G.B. Pant Sagar of Singrauli Industrial region, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 148, p. 75–84, 2009.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, Limerick, v. 180, p. 169–181, 2011.

ROLDÁN-ARJONA, T.; ARIZA, R. R. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, p. 169–179, 2009.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 2115–2126, 2001.

SAIER JÚNIOR, M. H.; TREVORS, J. T. Phytoremediation. **Water Air Soil Pollution**, Dordrecht, v. 205, p. 61–63, 2010.

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

SHARMA, V. K.; SOHN, M. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. **Environment International**, New York, v. 35, p. 743–759, 2009.

SHAW, B. P.; SAHU, S. K.; MISHRA, R. K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants**. Berlin: Springer, 2004. p. 84–126.

SHI, G.; CAI, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, p. 112–117, 2009.

SHUKLA, U. C. et al. Effect of bioaccumulation of cadmium on biomass productivity, essential trace elements, chlorophyll biosynthesis and macromolecules of wheat seedlings. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 92, p. 257–73, 2003.

SIEDLECKA, A. et al. Primary carbon metabolism in Phaseolus vulgaris plants under Cd/Fe interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 35, p. 951-957, 1997.

SILVA, S. A. **Citogenotoxicidade e modificações morfofisiológicas em Pistia stratiotes L. sob contaminação com cádmio**. 2011.70 p. Monografia (Graduação em ciências biológicas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SINGH, R. et al. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 3025–3032, 2010.

SINHA, P. et al. Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 651–656, 2006.

SKORZYNSKA-POLIT, E.; DRAZKIEWICZ, M.; KRUPA, Z. The activity of the antioxidative system in cadmium treated *Arabidopsis thaliana*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 47, p. 71-78, 2003.

SOOD, A. et al. **Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, *Azolla***. 2011. Disponível em: <<http://resources.metapress.com/pdf-preview.axd?code=k46651g86741x4q0&size=largest>>. Acesso em: 21 out. 2011.

SRIDHAR, B. B. M. et al Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indianmustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 54, p. 131–141, 2005.

SRIVASTAVA, J.; GUPTA, A.; CHANDRA, H. Managing water quality with aquatic macrophytes. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 7, p. 255–266, 2008.

SRIVASTAVA, S. et al. Phytofiltration of arsenic from simulated contaminated water using *Hydrilla verticillata* in field conditions. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 37, p. 1937–1941, 2011.

SUÑÈ, N. et al. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 2, p. 467-473, 2007.

TUTEJA, N. et al. Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, p. 134-149, 2009.

TUTEJA, N.; TUTEJA, R. Unravelling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect, **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 36, p. 261-290, 2001.

UPADHYAY, R.; PANDA, S. K. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Comptes rendus Biologies**, Paris, v. 332, n. 7, p. 623-632, 2009.

USECHE, A.; SHIPLEY, B. Plasticity in relative growth rate after a reduction in nitrogen availability is related to root morphological and physiological responses. **Annals of Botany**, London, v. 106, p. 617–625, 2010.

VACULÍK, M. et al. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, Barking, v. 163, p. 117-126, 2012.

VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 59, v. 203–216, 2001.

WAGNER, G. J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 51, p.173-212, 1993.

WANG, L.; ZHOU, Q.; HUANG, X. Photosynthetic responses to heavy metal terbium stress in horseradish leaves. **Chemosphere**, Oxford, v. 77, p. 1019–1025, 2009.

WIESER, M. E.; COPLEN, T. B. Atomic weights of the elements 2009. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 83, p. 359, 2011.

WOLFF, G. et al. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, n. 1, p. 133-137, 2009.

WRIGHT, I. J.; WESTOBY, M. Cross-species relationships between seedling relative growth rate, nitrogen productivity and root vs leaf function in 28 Australian woody species. **Functional Ecology**, Oxford, v. 14, p. 97-107, 2000.

ZHOU, Q. A. et al. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, n. 2, p. 135-150, 2008.

ZOCHE, J. J.; FREITAS, M.; QUADROS, K. E. Concentração de Zn e Mn nos Efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *Typha domingensis* Pers (Typhaceae) **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 34, n. 1, p. 177-188, 2010.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Características fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA em plantas de *Panicum aquaticum* submetidas a diferentes concentrações de cádmio

RESUMO

O cádmio é um importante poluente do meio ambiente, e pode ser facilmente absorvido pelas plantas. Dessa forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar as modificações fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA da macrófita *Panicum aquaticum* submetida a crescentes concentrações de cádmio. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon em casa de vegetação por 30 dias, sob seis concentrações de Cd: 0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 mg L⁻¹. Ao final do experimento, o crescimento, as trocas gasosas, a atividade enzimática do sistema antioxidante, a anatomia e o conteúdo de DNA foram avaliados. *P. aquaticum* demonstrou aumento da razão de área foliar e da área foliar específica. As plantas não apresentaram alterações na taxa de crescimento relativo, na razão raiz/parte aérea e na taxa assimilatória líquida. Assim como nenhuma das características de trocas gasosas foram afetadas pelos tratamentos. A anatomia da folha demonstrou alterações, com redução na espessura do limbo e do parênquima clorofiliano; aumento da densidade estomática em ambas as faces da epiderme, assim como no diâmetro polar e equatorial dos estômatos; a funcionalidade estomática foi reduzida apenas na face abaxial da epiderme. As raízes apresentaram aumento da espessura da epiderme, exoderme e endoderme; redução na proporção entre a área do cilindro vascular e da área total da raiz; aumento da espessura do córtex e do índice de vulnerabilidade do Carlquist. As enzimas do sistema antioxidante foram pouco afetadas pelo metal, com uma redução da atividade da APX nas raízes e aumento na atividade da CAT nas folhas. A quantidade de DNA não foi modificada na presença de Cd. Portanto, *P. aquaticum* apresenta evidências de tolerância ao metal, apoiada pela ausência de sintomas de toxicidade.

Palavras-chave: *Panicum aquaticum*. Cádmio. Fitorremediação. Anatomia. Fisiologia.

ABSTRACT

Cadmium is an important environmental pollutant, and can be easily absorbed by plants. In this study, the objective was to evaluate the physiology, anatomy and DNA content of *Panicum aquaticum* cultivated under contamination by Cd. Plants were grown in Hoagland and Arnon nutritive solution at greenhouse for 30 days under six Cd concentrations: 0.0, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 mg L⁻¹. At the end of experiment, plant growth, gas exchanges, anatomical, enzymatic activity of antioxidant system and DNA content were evaluated. *P. aquaticum* showed increased in the leaf area ratio and in the surface specific area. Plants do not showed changes in relative growth rate. None of the gas exchange characteristics were affected by the treatments. The leaf anatomy showed changes with a reduction in both mesophyll and chlorenchyma thickness; increase of stomatal density on both sides of the epidermis as well as in stomatal polar and equatorial diameters; stomatal functionality was reduced only on the leaves abaxial surface. Roots showed increase in the epidermis, exodermis and endodermis thickness; reduction in the proportion between the area of vascular cylinder and the total área; increased in area and thickness of the cortex and the vulnerability index of Carlquist. Enzymes of the antioxidant system were little affected by the metal, with a reduction in activity of APX in roots and increase in CAT activity in the leaves. DNA content was not modified in the presence of Cd. Therefore, *P. aquaticum* shows evidences of tolerance to Cd, supported by the absence of toxicity symptoms.

Keywords: *Panicum aquaticum*. Cadmium. Phytoremediation. Ecological Anatomy. Plant Physiology.

1 INTRODUÇÃO

Metais são liberados no ambiente a partir de processos naturais de intemperismo da crosta terrestre e erosão do solo. Além desses fatores, a descarga de mineração, da indústria e o esgoto urbano, a poluição do ar e o controle químico de pragas e doenças aplicado à agricultura podem aumentar a concentração desse elemento (ANAMIKA; EAPEN; FULEKAR, 2009). Dentre esses metais, o cádmio é um importante poluente ambiental (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). Sua alta mobilidade permite que seja facilmente absorvido pelas plantas e transferido para a parte aérea, onde pode se acumular em altos níveis. Por conseguinte, pode entrar na cadeia alimentar e se tornar prejudicial para a saúde humana e animal (BAH et al., 2011).

Nas plantas, o cádmio pode provocar vários efeitos tóxicos, como clorose, redução nas atividades metabólicas e no crescimento (PIETRINI et al., 2003). O cádmio interfere no balanço hídrico da planta, inibindo a abertura estomática (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002), provocando danos aos fotossistemas I e II (KRÜPPER et al., 2007), e inibindo algumas enzimas do Ciclo de Calvin (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Plantas expostas às altas concentrações de cádmio podem apresentar alterações na área e proporção dos tecidos radiculares (LUX et al., 2011; VACULÍK et al., 2012), assim como modificações no desenvolvimento de barreiras apoplásticas, como maior espessamento da epiderme, endoderme e exoderme (REDJALA et al., 2011). Na parte aérea podem ocorrer alterações nas células epidérmicas e parenquimáticas em decorrência da influência do cádmio sobre a diferenciação e extensibilidade celular e na formação de estômatos (MARQUES et al., 2011).

O cádmio em altas concentrações pode ainda elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que dentre outros efeitos estão envolvidas na genotoxicidade desse metal. Podem ocorrer mudanças na atividade de enzimas de síntese do DNA e de reparo de erros de replicação (FILIPIC; HEI, 2004).

A macrófita *Panicum aquaticum* pertence à subfamília Panicoideae (Poaceae), sendo encontrada em brejos, margens de cursos d'água, campos, baixadas, e locais úmidos em margens de estradas (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2007). Diversos trabalhos evidenciaram capacidade para degradação de herbicidas por outras espécies do gênero, como *P. virgatum* (MURPHY; COATS, 2011) e *P. maximum* (CARMO et al., 2008). Além disso, poáceas têm demonstrado potencial para uso na recuperação de áreas degradadas por metais pesados pela relativa facilidade em se desenvolver e, portanto promover rápida e densa cobertura do solo, fornecendo uma estrutura física, atenuando a erosão e adicionando matéria orgânica (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2001).

É devido à capacidade de extrair, acumular e tolerar altos níveis de metais pesados que algumas plantas são requeridas em estudos e trabalhos de fitorremediação (FAN et al., 2011). Tal tecnologia emergente faz uso de plantas para extrair, sequestrar e desintoxicar ambientes poluídos (BAH et al., 2011). Essa tecnologia é considerada adequada para grandes áreas e, ainda, de baixo custo e menos destrutiva ao meio ambiente em comparação a outras técnicas (MAKINO et al., 2006). Entretanto, o sucesso da fitorremediação depende de vários fatores, como a capacidade das espécies em acumular altas concentrações do metal e produzir alta biomassa (FONT; DEL RÍO; HARO, 2002), que por sua vez está atrelado aos mecanismos de tolerância desenvolvidos pelas plantas.

Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar as modificações fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA da macrófita *P. aquaticum* submetida às crescentes concentrações de cádmio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As plantas de *P. aquaticum* foram coletadas em uma lagoa livre de aparentes fontes de contaminação por cádmio, localizada no campus da Universidade Federal de Lavras. Após a coleta, as plantas foram lavadas e selecionadas quanto à sua qualidade fitossanitária e por uniformidade de tamanho. Em seguida levadas para casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, juntamente com areia lavada como substrato. Esse período de aclimatização durou tempo suficiente para obtenção de gerações clonais isentas de qualquer fonte de cádmio endógena.

2.2 Instalação do experimento

As plantas filhas, uniformizadas quanto ao tamanho, foram transferidas para bandejas plásticas com capacidade para 4,0 L. Cada bandeja contendo 2,0 L de areia lavada e 2,0 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) como descrito para a solução utilizada na aclimatização com concentrações crescentes de cádmio na forma de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Os valores das concentrações de Cd utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de Cd total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (BRASIL, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta legislação é de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 1).

O experimento teve duração de 30 dias e o delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições. A parcela experimental constituiu-se de uma bandeja com três plantas.

Tabela 1 Concentrações de cádmio utilizadas no experimento

Tratamento	Concentrações de Cd (mg L ⁻¹)
T1 (Controle)	0,0
T2	0,4
T3	0,8
T4	1,6
T5	3,2
T6	6,4

2.3 Análises de crescimento

Foram selecionadas e coletadas cinco plantas por tratamento em dois tempos: tempo um, no início do experimento e tempo dois, após 30 dias, ao final do experimento. As plantas foram separadas em folha, caule e raiz. A área foliar foi obtida a partir de fotografias de todas as folhas de cada planta e para a mensuração do somatório das áreas dessas folhas utilizou-se o software de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). Em seguida, todo o material foi colocado em estufa de circulação forçada a 60 °C até massa constante. Os dados de massa seca da folha, caule e raiz foram obtidos em balança analítica.

Os dados de massa seca e área foliar foram utilizados para obtenção das variáveis de crescimento, de acordo com o software proposto por Hunt et al. (2002). As variáveis avaliadas foram: taxa de crescimento relativo (TCR), razão

de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), taxa assimilatória líquida (TAL) e razão raiz/parte aérea.

2.4 Análises de trocas gasosas

Aos 20 dias de exposição aos tratamentos de cádmio foram avaliadas as características de trocas gasosas das plantas através de um analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LCA4 – ADC - INSTRUMENTAL. Avaliou-se a taxa fotossintética líquida (A), a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E) e a relação entre carbono interno e externo (C_i/C_a), de uma folha jovem completamente expandida em cada repetição por tratamento. As análises foram realizadas no período da manhã entre 9 e 11 horas.

2.5 Análises anatômicas

Ao final do período experimental, cinco plantas por tratamento foram coletadas, lavadas em água corrente e fixadas em F.A.A._{70%} - (formaldeído, ácido acético glacial p.a. e etanol 70%, na proporção de 0,5: 0,5: 9) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Foram realizadas secções paradérmicas e transversais da folha e transversais da raiz. As secções paradérmicas das faces abaxial e adaxial obtidas com lâminas de aço foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de safranina 1% (JOHANSEN, 1940). As secções transversais da folha foram retiradas da região mediana contendo a nervura central, sendo obtidas com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. As secções transversais foram clarificadas em solução de

hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de safrablau (safranina 1,0% e azul de Astra 0,1%, na proporção de 7:3), segundo os métodos descritos por Burger e Richter (1991) e Bukatsch (1972). Nos dois casos, os cortes corados foram montados com lâmina e lamínula em glicerina 50%.

Para as secções transversais da raiz fragmentos de cerca de 2,0 cm foram removidos da região pilífera da raiz e expostos a uma série etanólica crescente para desidratação do material (70, 80, 90 e 100%) sob vácuo, a temperatura ambiente de acordo com Johansen (1940) com modificações. Em seguida o material foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por etanol 100% e resina base (1:1), segundo as instruções do fabricante (kit Historesina Leica) por, pelo menos, 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se a infiltração em resina base por mais 24 horas sob vácuo e temperatura ambiente. Para a polimerização utilizou-se o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Os cortes foram feitos em micrótomo de deslizamento na espessura de 5 μm , sendo em seguida corados em solução de Azul de Toluidina 1% (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As lâminas foram fotografadas em câmera Moticam 2500 acoplada ao microscópio modelo Olympus CX41 e as análises realizadas em um software de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). As características anatômicas avaliadas na folha em secção transversal foram: espessura da epiderme na face abaxial (EAB), espessura da epiderme na face adaxial (EAD), espessura do limbo (LM), espessura do parênquima clorofiliano (PC), área do conjunto de células buliformes por campo (ACB), número de conjuntos de células buliformes por mm^{-1} de folha (NCB), distância entre os feixes vasculares (DF), número de feixes vasculares por mm^{-1} de folha (NF), espessura da cutícula (CT) e área de esclerênquima por campo (ECL). Em

secção paradérmica foram avaliadas em ambas as faces da epiderme: densidade estomática (DE), índice estomático (IE), diâmetro polar (POL) e equatorial (EQU) dos estômatos e funcionalidade estomática (FUN). Na raiz foram avaliados: espessura da epiderme (EP), espessura da exoderme (EX), espessura da endoderme (ED), proporção entre a área do cilindro vascular e a área total da raiz (ACAT), proporção de aerênquima no córtex (PAR), espessura do córtex (ECX) e índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC). O IVC foi calculado segundo Carlquist (1975), as proporções de aerênquima segundo Pereira et al. (2008) e a DE e o IE segundo Castro, Pereira e Paiva (2009).

2.6 Análises do sistema antioxidante enzimático

Ao término do experimento, amostras de folhas e raízes foram coletadas no período da manhã, armazenadas em nitrogênio líquido e preservadas em freezer -80°C até a data das análises.

Para a extração enzimática utilizou-se 0,2 g de folhas e de raízes maceradas em nitrogênio líquido com adição de 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), ácido ascórbico 0,001 M e 12 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nos ensaios enzimáticos da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10,0 µL do extrato enzimático a

190,0 µL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50,0 mM (pH 7,8), metionina 14,0 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75,0 µM e riboflavina 2,0 µM. A placa de acrílico UV, contendo o meio de incubação mais amostra, foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o controle, utilizou-se o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro ELISA e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem extrato enzimático}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), na qual uma alíquota de 10,0 µL do extrato enzimático foi adicionada a 190,0 µL do meio de incubação contendo 100,0 µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 10,0 µL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290,0 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 10,0 µL do extrato enzimático foi adicionada a 190,0 µL de tampão de incubação composto por 100,0 µL de fosfato de potássio 200,0 mM (pH 7,0), 10,0 µL de ácido ascórbico 10,0 mM e 10,0 µL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para $1,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

2.7 Citometria de fluxo

Para quantificação do conteúdo de DNA utilizou-se cinco folhas jovens de *P. aquaticum* por tratamento. Para a análise de citometria de fluxo, as mostras de *P. aquaticum*, juntamente com o padrão de referência (*Pisum sativum*) foram dissociados com auxílio de um bisturi em uma placa de petri (GALBRAITH et al., 1983), sob gelo triturado, contendo 1,0 mL de tampão de extração LB01 gelado, para a liberação dos núcleos (DOLEŽEL; BINAROVÁ, LUCRETTI, 1989). A suspensão obtida foi filtrada em uma malha de náilon de 50,0 µm e corada com 25,0 µL de iodeto de propídeo ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) acrescentando-se, em seguida, 5 µL de RNase do tipo I e, finalmente, armazenadas em tubos de poliestireno no escuro e refrigeradas até o momento da análise em citômetro Facs Callibur quatro cores. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados no programa WinMDI 2.8 (2009).

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da interfase) do padrão de referência e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg).

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$ ou análise de regressão com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença do cádmio afetou de modo distinto as características de crescimento avaliadas em dois tempos durante o experimento. A razão de área foliar (RAF) e área foliar específica (AFE) demonstraram um aumento nas plantas submetidas às duas maiores concentrações do metal (Figura 1). Enquanto a taxa de crescimento relativo ($F_c = 2,123$ e $P = 0,1324$) com média de $0,09 \text{ g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, a razão raiz/parte aérea ($F_c = 1,708$ e $P = 0,2071$) com média de $1,23 \text{ g g}^{-1}$ e a taxa assimilatória líquida ($F_c = 2,5$ e $P = 0,0898$) com média de $0,00002 \text{ g mm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ não diferiram entre os tratamentos.

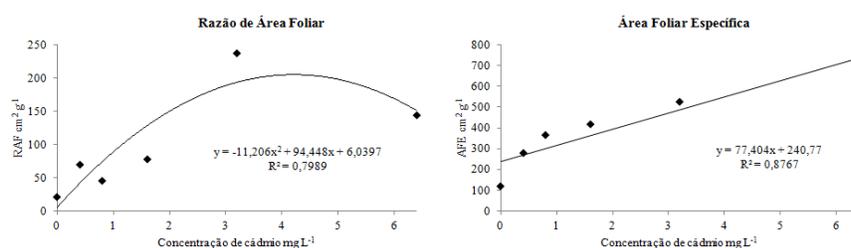


Figura 1 Razão de área foliar e Área foliar específica de plantas de *Panicum aquaticum* submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Cada ponto no gráfico refere-se à média de cinco repetições em dois tempos de coleta.

O comportamento da TCR e da razão raiz/parte aérea pode sugerir uma estratégia de tolerância, uma vez que a redução do crescimento é citada na literatura como um dos efeitos do cádmio sobre as plantas (REDONDO-GÓMEZ; MATEOS-NARANJO; ANDRADES-MORENO, 2010). Segundo Fan et al. (2011) uma inibição no crescimento de raízes e da parte aérea e redução no acúmulo de massa seca ocorrem como resultado da exposição à quantidades tóxicas de cádmio. No entanto, esse comportamento não foi observado em *P. aquaticum*.

A TCR tem dois componentes, o que representa a capacidade de assimilação fotossintética por unidade de área foliar, a TAL, e o que representa o incremento da área foliar ou área foliar útil para fotossíntese, a RAF (SINGH; AGRAWAL, 2010). Assim, a TCR pode estar associada com a TAL, no sentido de relacionar a taxa fotossintética à quantidade de área foliar disponível para a interceptação de luz e à alocação da biomassa foliar (LAMBERS; CHAPIM; PONS, 1998), o que significa o ganho de carbono através da fotossíntese e a perda de carbono através da respiração (JAMES; REBECCA, 2007). No entanto, alguns autores consideram que há pouca ou nenhuma relação entre TCR e TAL e sugerem que as variações da TCR ocorram principalmente pelas diferenças na AFE (LAMBERS; CHAPIM; PONS, 1998), que relaciona a área com a massa de matéria seca da própria folha (LACERDA et al., 2009).

Além disso, sabe-se que a RAF varia em função da AFE e da razão de peso foliar (LAMBERS; CHAPIM; PONS, 1998). Nesse sentido, o incremento da AFE provavelmente promoveu aumento da RAF, que pode ter favorecido a manutenção das taxas fotossintéticas na presença do metal.

Não foi verificado efeito significativo dos tratamentos para taxa fotossintética ($F_c = 0,180$ e $P = 0,9674$) com média de $0,007 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condutância estomática ($F_c = 0,307$ e $P = 0,9041$) com média de $0,39 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, taxa transpiratória ($F_c = 0,373$ e $P = 0,8623$) com média de $0,006 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e relação C_i/C_a ($F_c = 1,045$ e $P = 0,4145$) com média de 0,72.

Diversos estudos têm demonstrado que o cádmio causa diminuição da transpiração e da fotossíntese (SOUZA, V. L. et al., 2009), sendo esse decréscimo da taxa fotossintética associado à mudanças bioquímicas, causando inibição na síntese de clorofila (BOONYAPOOKANA et al., 2002) ou à formação de espécies reativas de oxigênio (SCHUZENDUBEL et al., 2001) que podem alterar a estrutura das membranas dos cloroplastos (STOEVA; BINEVA,

2003). No entanto, assim como observado por Pereira (2010) em plantas de aguapé, as respostas fotossintéticas de *P. aquaticum* não foram influenciadas pelo metal o que pode estar associado à eficiência do sistema antioxidante.

Além disso, esse comportamento da fotossíntese pode estar relacionado com a manutenção dos valores da TAL ao longo dos tratamentos, uma vez que a eficiência do sistema fotossintético está envolvida na produção de massa seca, estimando, dessa forma, a fotossíntese líquida (RADFORD, 1967). Soma-se a isso, o fato da taxa transpiratória, da condutância e da relação Ci/Ca não terem sido afetadas pelos tratamentos, o que contraria resultados observados por Dhi et al. (2011) ao avaliarem as alterações fisiológicas de *Salvinia natans* induzidas por metais pesados. Nesse caso, o acúmulo de metais pesados alterou, principalmente, o potencial fotossintético reduzindo a eficiência das reações de assimilação de carbono.

As folhas de *P. aquaticum* apresentaram epiderme unisseriada e conjuntos de células buliformes em sua face adaxial; estômatos em alteres distribuídos nas duas faces da epiderme foliar (folha anfiestomática), embora em menor número na face adaxial; papilas localizadas em maior quantidade na face adaxial que na face abaxial; mesofilo composto de clorênquima compacto e radiado em torno dos feixes vasculares, caracterizado pela estrutura Kranz, de acordo com a descrição feita por Guglieri, Longhi-Wagner e Zuloaga (2007).

Os valores das médias para a espessura do limbo (LM) e para espessura do parênquima clorofiliano apresentaram uma redução com o aumento nas concentrações de cádmio (Figuras 2 e 3). Essa redução em LM, provavelmente em função da redução do PC parece não ter afetado a disponibilidade de CO₂ na folha, sendo corroborado pelos resultados observados para fotossíntese, condutância e relação Ci/Ca, e coerente com o aumento da AFE. Segundo Lambers, Chapim e Pons (1998), o aumento da AFE geralmente implica na

redução da espessura da folha. Desse modo, o cádmio promoveu um aumento da AFE, assim como uma redução na espessura do limbo foliar.

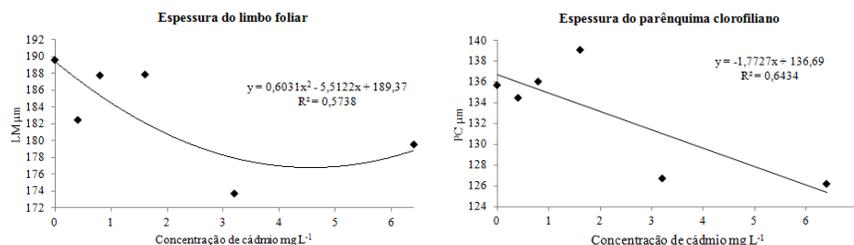


Figura 2 Espessura do limbo foliar e do parênquima clorofiliano de *Panicum aquaticum* submetidas a diferentes concentrações de cádmio.

A espessura da epiderme (face abaxial e adaxial) e da cutícula (CT); a área (ACB) e o número de conjunto de células buliformes (NCB); a área de esclerênquima (ECL) e o número (NF) e a distância (DF) entre os feixes vasculares não diferiram entre as crescentes concentrações de cádmio (Figura 3 e Tabela 2).

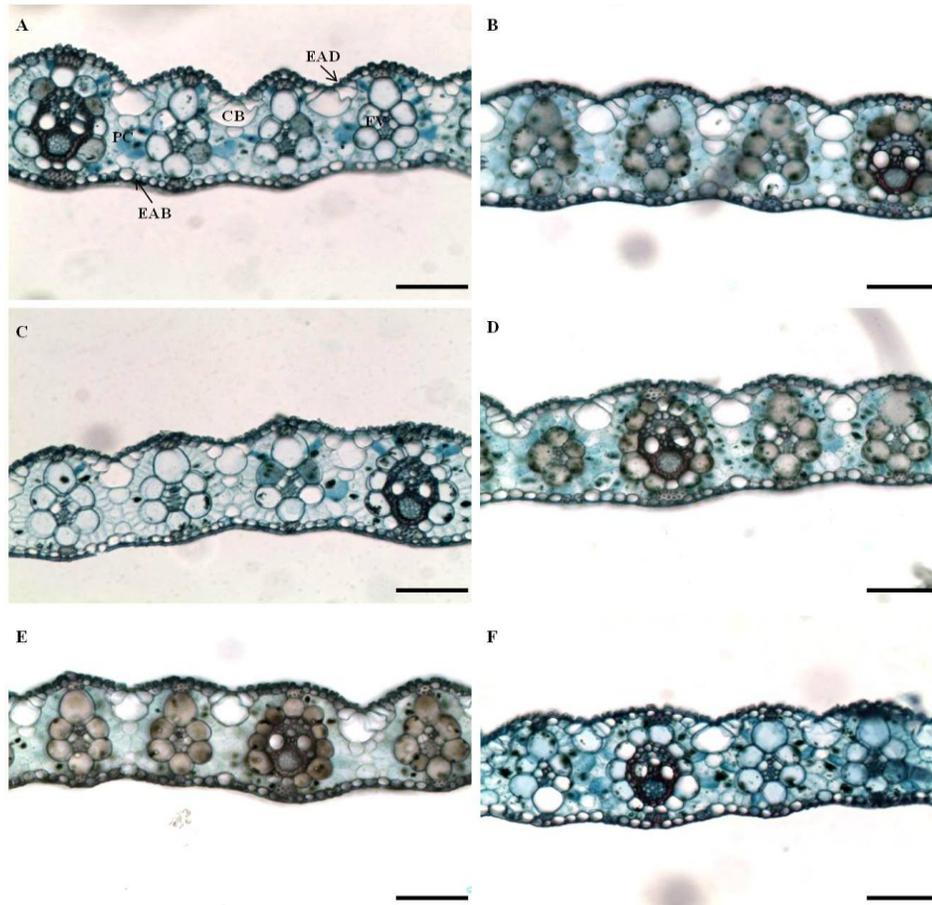


Figura 3 Secções transversais de folhas de *Panicum aquaticum* submetidas a crescentes concentrações de cádmio. EAD= epiderme face adaxial, EAB= epiderme face abaxial, PC= parênquima clorofiliano, CB= células buliformes, FV= feixe vascular. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,40 mg L⁻¹, C= 0,80 mg L⁻¹, D= 1,60 mg L⁻¹, E= 3,20 mg L⁻¹, F= 6,40 mg L⁻¹. Barras= 100 μm.

Tabela 2 Características dos tecidos foliares em secção transversal de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de cádmio (mg L^{-1})

Cd mg L^{-1}	EAB (μm)	EAD (μm)	ACB (μm^2)	NCB	DF (μm)	NF	CT (μm)	ECL (μm^2)
0,00	14,39a	12,28a	2560,75a	06a	49,31a	07a	5,13a	1628,85a
0,40	13,54a	12,01a	2380,40a	05a	57,89a	07a	5,09a	1497,64a
0,80	14,09a	11,57a	2486,66a	06a	62,45a	07a	5,17a	1538,19a
1,60	14,34a	11,53a	2554,96a	06a	58,03a	07a	5,31a	1503,39a
3,20	14,27a	11,71a	2545,83a	07a	62,68a	07a	5,44a	1463,69a
6,40	13,58a	11,86a	2273,54a	06a	54,60a	07a	5,84a	1517,81a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, ACB= área de conjunto de células buliformes por campo, NCB= número de conjunto de células buliformes (por mm^{-1} de folha), DF= distância entre os feixes vasculares, NF= número de feixes vasculares (por mm^{-1} de folha), CT= espessura da cutícula, ECL= área de esclerênquima por campo.

Em secção paradérmica não houve diferença entre os tratamentos apenas para a funcionalidade estomática (FUN) na face abaxial e para o índice estomático (IE) na face adaxial. Observou-se na face abaxial da epiderme uma redução do índice estomático (IE) e uma tendência ao aumento da densidade estomática (DE) nas diferentes concentrações de cádmio. Ainda na face abaxial, os diâmetros polar (POL) e equatorial (EQU) sofreram uma redução na maior concentração do metal. Na face adaxial da epiderme a DE demonstrou tendência ao aumento na presença do metal, assim como a FUN. O POL e o EQU sofreram uma redução na presença de maiores concentrações de cádmio (Figura 4 e Tabela 3).

O IE é um atributo que permite obter informações sobre a diferenciação celular (TICHÁ, 1982), ou seja, uma estimativa entre células estomáticas e epidérmicas. Desse modo, o cádmio pode ter influenciado o processo de diferenciação de células para formação de estômatos ao diminuir o IE, além de afetar o processo de expansão celular, diminuindo o tamanho das células (MARQUES et al., 2011). O aumento na DE provavelmente contribuiu para a manutenção da captação de CO₂, sendo uma característica comum em plantas sob estresse, como observado em aguapé (PEREIRA, 2010). O aumento na FUN na face adaxial da epiderme corrobora esse resultado e, associado aos demais aspectos dos estômatos observados, pode evidenciar características de tolerância ao cádmio.

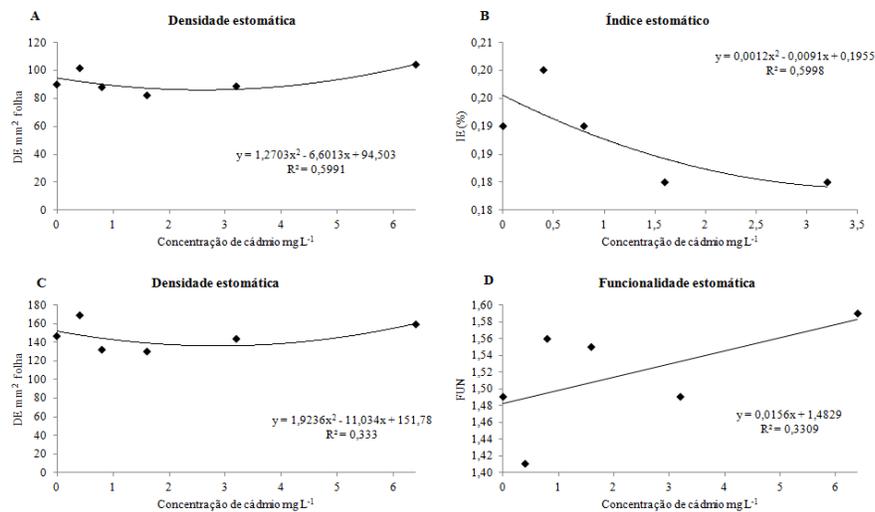


Figura 4 Densidade estomática na face abaxial (A) e adaxial (C) da epiderme, índice estomático da face abaxial da epiderme (B) e funcionalidade estomática (relação POL/EQU) da face adaxial da epiderme (C) em *Panicum aquaticum* submetidas a diferentes concentrações de cádmio.

Tabela 3 Características da epiderme foliar *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de cádmio (mg L^{-1})

FACE ABAXIAL			
Cd mg L^{-1}	POL (μm)	EQU (μm)	FUN
0,00	34,52a	21,17a	1,63a
0,40	32,84a	21,62a	1,52a
0,80	33,55a	20,89a	1,61a
1,60	34,21a	21,94a	1,56a
3,20	32,83a	21,08a	1,57a
6,40	29,64b	19,58b	1,52a
FACE ADAXIAL			
Cd mg L^{-1}	IE (%)	POL (μm)	EQU (μm)
0,00	0,21a	28,41b	19,18a
0,40	0,23a	27,07b	19,31a
0,80	0,21a	29,91a	19,25a
1,60	0,21a	30,03a	19,42a
3,20	0,22a	28,87b	19,51a
6,40	0,22a	28,27b	17,83b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, %). IE= índice estomático, POL= diâmetro polar dos estômatos, EQU= diâmetro equatorial dos estômatos, FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU).

As raízes de *P. aquaticum* são compostas por epiderme uniestratificada formada por células de paredes delgadas, exoderme formada por células de paredes espessadas e endoderme unisseriada. Possuem ainda em seu córtex, câmaras de ar formando aerênquima, neste caso constitutivo, por se tratar de uma espécie aquática.

Nas análises anatômicas dos tecidos radiculares, foi possível observar alterações significativas decorrentes dos tratamentos em todas as variáveis analisadas, com exceção da proporção de aerênquima no córtex. A espessura da epiderme (EP) apresentou valores maiores nas concentrações de 0,0 e 6,4 mg L⁻¹. As médias para espessura da exoderme (EX) e da endoderme (ED) evidenciaram um aumento na presença de maiores concentrações de cádmio. Já a proporção entre a área do cilindro vascular e área total da raiz (ACAT) sofreu uma redução em suas médias nas concentrações de 0,4 e 0,8 mg L⁻¹. As médias para espessura do córtex (ECX) foram maiores a partir da concentração de 3,2 mg L⁻¹. O índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC) demonstrou um aumento nas plantas submetidas a maior concentração do metal (Figuras 5 e 6 e Tabela 4).

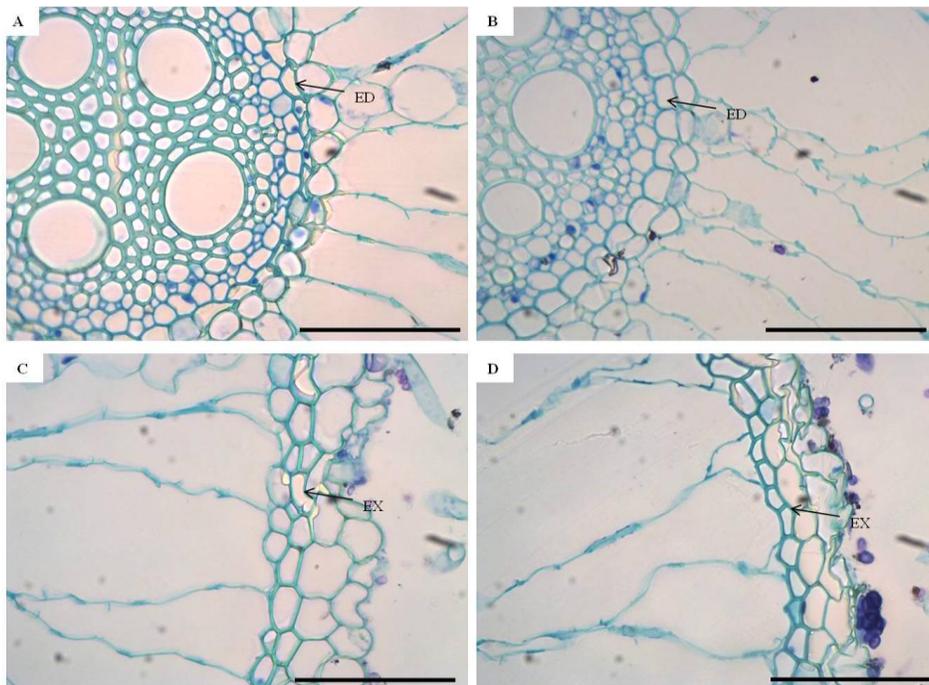


Figura 5 Detalhe da endoderme (A e B) e exoderme (C e D) da raiz de *Panicum aquaticum* sob contaminação por cádmio. A e C= 0,0 mg L⁻¹; B e D= 6,40 mg L⁻¹. Barras= 100 µm.

Tabela 4 Características dos tecidos radiculares em secção transversal de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de cádmio (mg L^{-1})

Cd mg L^{-1}	EP (μm)	EX (μm)	ED (μm)	ACAT	PAR	ECX (μm)	IVC
0,00	43,93 a	22,59 b	11,58 b	0,06 a	0,81 a	386,16 b	0,11 b
0,40	39,77 b	23,90 b	10,79 b	0,05 b	0,80 a	374,47 b	0,09 c
0,80	38,64 b	24,44 b	11,93 b	0,05 b	0,86 a	378,09 b	0,09 c
1,60	39,55 b	22,68 b	13,53 a	0,06 a	0,82 a	397,86 b	0,11 b
3,20	40,20 b	27,39 a	13,95 a	0,06 a	0,83 a	441,87 a	0,09 c
6,40	47,71 a	28,43 a	13,84 a	0,06 a	0,79 a	482,85 a	0,12 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EP= espessura da epiderme, EX= espessura da exoderme, ED= espessura da endoderme, ACAT= proporção entre a área do cilindro vascular e a área total, PAR= proporção de aerênquima no córtex, ECX= espessura do córtex, IVC= índice de vulnerabilidade de Carlquist.

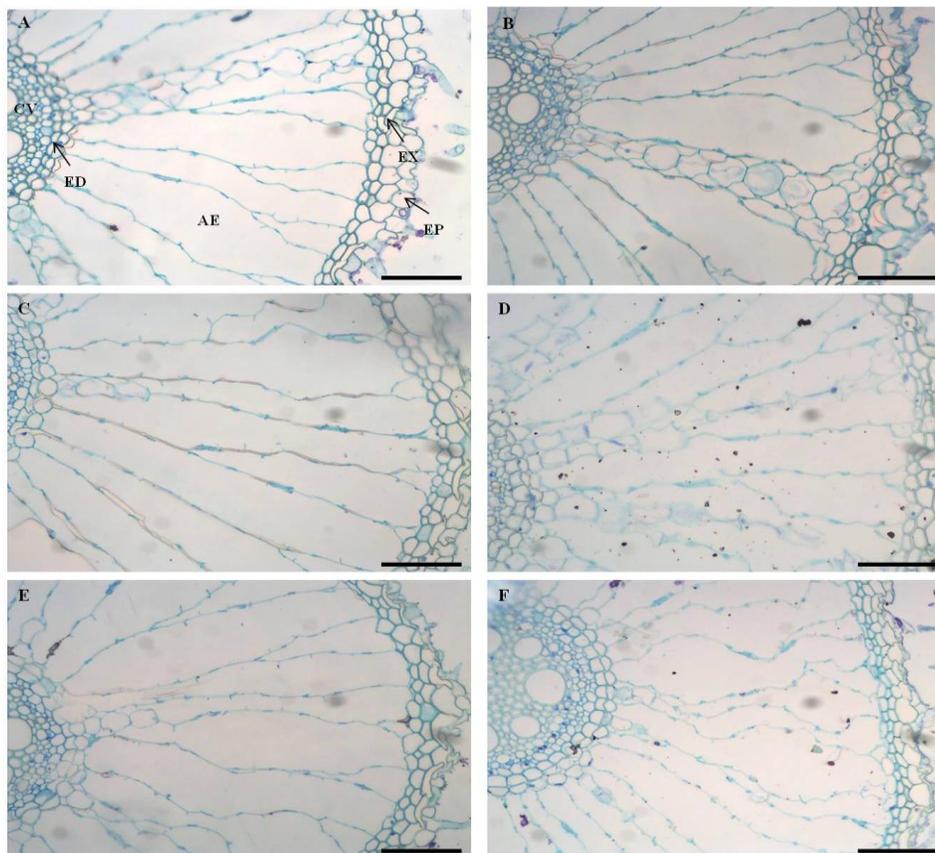


Figura 6 Secções transversais de raízes de *Panicum aquaticum* submetidas a crescentes concentrações de cádmio. EP= epiderme, EX= exoderme, ED= endoderme, AE= aerênquima, CV= cilindro vascular. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,40 mg L⁻¹, C= 0,80 mg L⁻¹, D= 1,60 mg L⁻¹, E= 3,20 mg L⁻¹, F= 6,40 mg L⁻¹. Barras= 100 µm.

Considerando que os elementos são transportados radialmente a partir da epiderme radicular através do apoplasto ou simplasto do córtex para o xilema e parte aérea, a epiderme, a endoderme e a exoderme funcionam como barreiras apoplásticas no controle da absorção (SCHREIBER, 2010). O desenvolvimento destas barreiras é variável, e muitas vezes, difere entre espécies vegetais e condições ambientais (REDJALA et al., 2011; VACULÍK et al., 2012). Assim, um maior espessamento desses tecidos, principalmente, nas concentrações mais

elevadas de cádmio provavelmente minimizou a absorção desse metal e sua translocação para parte aérea, diminuindo os efeitos tóxicos no sistema fotossintético (MARQUES et al., 2011). Esse fato também pode ser relacionado com a permanência do potencial fotossintético de *P. aquaticum* em condições inalteradas ao longo dos tratamentos.

Alterações na área e na proporção dos tecidos radiculares também podem ser consequência de exposição contínua aos metais pesados (LUX et al., 2011; VACULÍK et al., 2012). Nesse sentido, uma maior espessura do córtex nas maiores concentrações de cádmio representa um aumento no diâmetro dessas raízes e pode ser considerada uma estratégia de tolerância, relacionada a uma maior capacidade de acúmulo do metal.

Além disso, o fato da proporção de aerênquimas, característica indispensável à fisiologia de raízes de plantas aquáticas (PEREIRA et al., 2008; SOUZA, T. C. et al., 2009) não ter sido afetada pelos tratamentos, oferece mais um indício de tolerância ao metal. Esse mesmo resultado foi observado por Pereira (2010) na análise do potencial fitorremediador de *E. crassipes* em relação ao cádmio.

O IVC está diretamente associado a uma maior eficiência do sistema vascular das plantas e pode ser utilizado para inferir sobre a probabilidade de embolias no xilema, sendo diretamente relacionado com o número e diâmetro dos vasos de metaxilema (CARLQUIST, 1975; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009), sendo que a sua redução relaciona-se com melhores condições do xilema para a condutividade hidráulica (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Em *P. aquaticum* o aumento do IVC sob a concentração mais elevada de cádmio pode ser um indício de alteração na condutividade hidráulica, provavelmente afetando a translocação do metal para parte aérea.

As enzimas do sistema antioxidante de *P. aquaticum* demonstraram comportamento distinto na presença de cádmio. As atividades da peroxidase do

ascorbato (APX) na folha (Fc= 0,358 e P= 0,8674), da catalase na raiz (Fc= 1,758 e P= 0,2556) e da dismutase do íon superóxido na folha (Fc= 3,132 e P= 0488) e na raiz (Fc= 1,752 e P= 0,2556) não foram afetadas pelas concentrações. A atividade da APX na raiz tendeu a uma redução nas concentrações mais elevadas de cádmio, enquanto que a atividade da CAT na folha exibiu um aumento nessas concentrações (Figura 7).

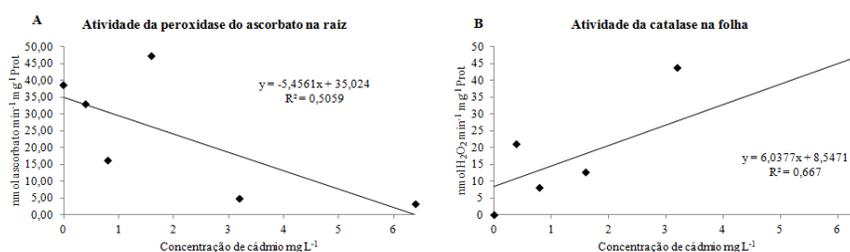


Figura 7 Atividade das enzimas do sistema antioxidante de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de cádmio. A= Atividade da Peroxidase do Ascorbato na raiz, B= Atividade da Catalase na folha.

Ambientes sob estresse, como exposição a metais pesados, podem aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas plantas causando estresse oxidativo e induzindo o sistema antioxidante (LIN et al., 2007). O comportamento apresentado pela SOD indica que, provavelmente, a remoção das EROs foi realizada de modo mais eficiente pela CAT e APX. Além disso, estudos relataram que a contaminação por cádmio resulta em estresse oxidativo, porém diferentemente da maioria dos metais, este elemento parece não agir diretamente na produção de espécies reativas de oxigênio a partir das reações de Fenton ou Haber-Weiss (TOPPI; GABRIELLE, 1999), na qual é formado o íon superóxido, que poderá ser combatido pela SOD (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). Isso explica a ausência de alteração da atividade dessa enzima na presença do metal, o que não compromete fatalmente o sistema

antioxidante, uma vez que se encontra auxiliado pela maior atividade da CAT e APX (OLIVEIRA, 2010).

O aumento da atividade da CAT, que decompõe H_2O_2 em água e oxigênio molecular, nas folhas na presença do metal, confirma a eficiência desse sistema enzimático. Resultado semelhante foi verificado em plantas de *Kandelia candel* sob contaminação por cádmio e chumbo (ZHANG et al., 2007). Considerando ainda, a necessidade de um equilíbrio entre as enzimas CAT e APX (BROWLER et al., 1991), é provável que a atividade da CAT tenha aumentado na folha como mecanismo compensatório à queda da atividade da APX na raiz, uma vez que ao ser translocado para a parte aérea o cádmio pode afetar processos vitais como a fotossíntese (PIETRINI et al., 2003).

A queda na atividade da APX na raiz indica que possivelmente o estresse oxidativo ultrapassou a capacidade de controle de EROs pela enzima, resultando em inibição enzimática da mesma, ou por efeito inibitório na via de síntese desta proteína (OLIVEIRA, 2010). No entanto, a não detecção de danos provocados pelas EROs pode ser resultado de um mecanismo compensatório pela CAT e talvez, pela ação de outros componentes do sistema antioxidante, denotando uma estratégia de tolerância da espécie ao estresse por cádmio.

As análises de citometria de fluxo não demonstraram efeito das diferentes concentrações de cádmio na quantidade de DNA de *P. aquaticum* (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5 Quantidade de 2C de DNA e coeficiente de variação obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo para *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de cádmio (mg L^{-1})

Cd mg L^{-1}	DNA (pg)	CV (%)
0,00	3,27 \mathbf{a}	0,51
0,40	3,32 \mathbf{a}	0,60
0,80	3,21 \mathbf{a}	0,62
1,60	2,94 \mathbf{a}	0,48
3,20	3,13 \mathbf{a}	0,46
6,40	2,80 \mathbf{a}	0,69

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%).

O aumento na concentração das EROs decorrentes da presença de níveis tóxicos de Cd podem produzir apoptose e dano ao DNA (GUIMARÃES et al., 2008). Em plantas, um efeito indireto do Cd no DNA associa-se a mudanças na atividade de enzimas relacionadas à síntese de DNA e ao reparo de erros de replicação, que podem ou não estar relacionados a um dano oxidativo (FILIPIC; HEI, 2004). O fato de não ter sido detectado influência do metal no teor de DNA de *P. aquaticum* evidencia a eficiência do sistema antioxidante, além de fornecer mais um indício de tolerância dessa espécie à presença de cádmio.

Os coeficientes de variação das amostras analisadas ficaram abaixo de 3%, o que sugere maior confiabilidade dos dados. Segundo Marie e Brown (1993) o coeficiente de variação (CV) é um critério elementar na validação de métodos citológicos e definem uma gama de valores entre 1 e 2% para análises de alta qualidade e 3% como um valor de rotina. Por outro lado, um $\text{CV} < 5\%$ pode ser aceitável (GALBRAITH et al., 1983). Assim, é possível atestar confiabilidade aos coeficientes observados para *P. aquaticum* neste estudo.

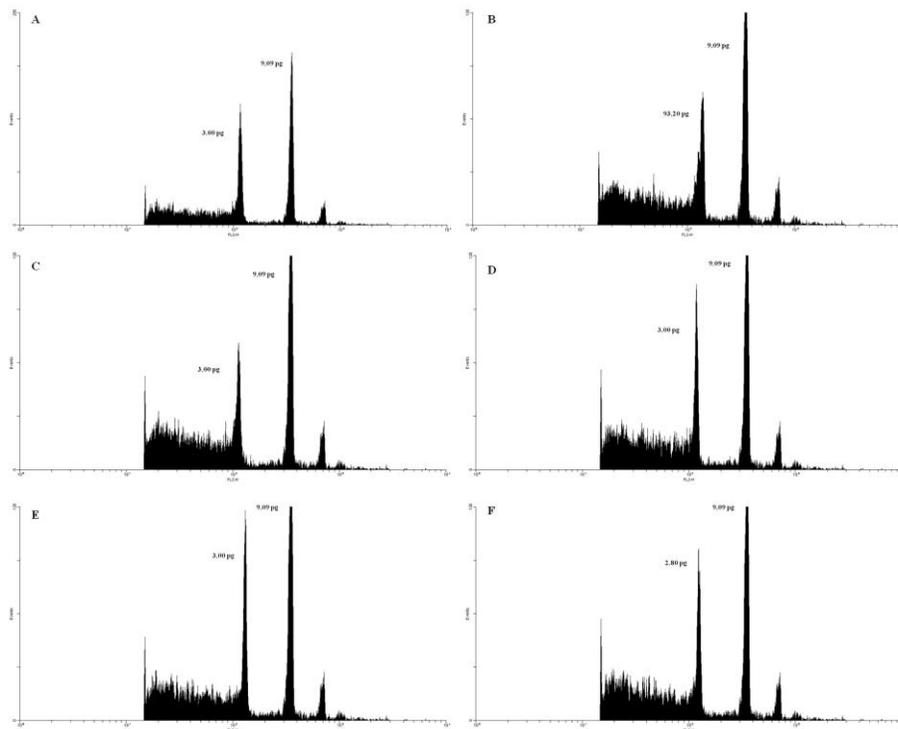


Figura 8 Histogramas de citometria de fluxo em núcleos de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de cádmio. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,40 mg L⁻¹, C= 0,80 mg L⁻¹, D= 1,60 mg L⁻¹, E= 3,20 mg L⁻¹, F= 6,40 mg L⁻¹. O primeiro pico em cada histograma é referente ao pico G1 das plantas de cada tratamento e o segundo pico G1 é da amostra de referência. Eixo das abscissas representa a quantidade de DNA e o das ordenadas, o número de núcleos.

5 CONCLUSÃO

Panicum aquaticum não apresenta sintomas de toxidez ao cádmio. Associado a isso, há manutenção do crescimento, das características de trocas gasosas e da quantidade de DNA na presença de crescentes concentrações do metal.

As modificações nos tecidos foliares e radiculares demonstram mecanismos eficientes de tolerância relacionados, principalmente, às barreiras apoplásticas ao processo fotossintético. A ausência de danos provocados por EROs evidencia a eficiência do sistema antioxidante.

Assim, *P. aquaticum* mostrou-se, pelas características avaliadas, tolerante à contaminação por cádmio, considerando as concentrações estudadas.

REFERÊNCIAS

ANAMIKA, S.; EAPEN, S.; FULEKAR, M. H. Phytoremediation of Cadmium, Lead and Zinc by *Brassica juncea* L. Czern and Coss. **Journal of Applied Bioscience**, Nairobi, v. 13, p. 726–736, 2009.

BAH, A. M. et al. Effects of cadmium, chromium and lead on growth, metal uptake and antioxidative capacity in *Typha angustifolia*. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 142, p. 77–92, 2011.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeratio following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 116, p. 651-658, 1998.

BOONYAPOOKANA, B. Phytoaccumulation and phytotoxicity of cadmium and chromium in duck-weed *Wolffia globosa*. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 4, p. 87–100, 2002.

BOWLER, C. et al. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 7, p. 1723-1732, July 1991.

BRASIL. Congresso. Senado Federal. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2005.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfarbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975. 259 p.

CARMO, M. L. Influence of *Panicum maximum* cultivation period on phytoremediation of soil contaminated with picloram. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 315-322, 2008.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Establishment of herbaceous plants in soils contaminated with heavy metals and inoculation with mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 1443-1452, 2001.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 31, p. 113-120, 1989.

FAN, K. C. et al. Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedlings for phytoextraction applications. **Journal of Environmental Management**, London, v. 92, p. 2818-2822, 2011.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 123-142, 1968.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.0: sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2007.

FILIPIC, M.; HEI, T. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 546, p. 81-91, 2004.

FONT, R.; DEL RÍO, M.; HARO, A. Use of near infrared spectroscopy to evaluate heavy content in *Brassica juncea* cultivated on the polluted soils of Guadiamar river area, Fresen. **Environmental Bulletin**, New York, v.11, p. 777-781, 2002.

GALBRAITH, D.W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GIANNOPOLITIS, C. N; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Minneápolis, v. 59, p. 309-314, 1977.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER H.M.; ZULOAGA, F. O. Panicum Sect. *Dichotomiflora* (Hitc. & Chase) Honda e P. sect. *Virgata* Hitc. & Chase ex Pilg. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, n. 4, p. 785-805, 2007.

GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 3, p. 58, 2008.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HUNT, R. et al. A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 485-488, 2002.

JAMES, J. J.; REBECCA, E. D. A basis for relative growth rate differences between native and invasive forb seedlings. **Rangeland Ecology & Management**, Boise, v. 60, p. 395-400, 2007.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC, 2001.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

KRÜPPER, H. et al. Cadmium- induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, p. 655–674, 2007.

LACERDA, C. F. et al. Análise de crescimento de milho e feijão sob diferentes condições de sombreamento. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 1, p. 18-24, jan./mar. 2010.

LAMBERS, H.; CHAPIM, F. S.; PONS, T. L. **Plant physiological ecology**. New York: Springer, 1998. 540 p.

LIN, R. et al. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Chemosphere**, Oxford, v. 69, p. 89–98, 2007.

LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 21-37, 2011.

MAKINO, T. Remediation of cadmium contamination in paddy soils by washing with chemicals: selection of washing chemicals. **Environmental Pollution**, Barking, v. 144, p. 2-10, 2006.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, p. 41-51, 1993.

MARQUES, T. C. L. L.S. M. et al. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 997-1006, 2011.

MURPHY, I. J.; COATS, J. R. The capacity of switchgrass (*Panicum virgatum*) to degrade atrazine in a phytoremediation setting. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 3, p. 715–722, 2011.

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

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio**. 2010. 1480 p. Dissertação (Mestrado em fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PEREIRA, F. J. **Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface d'água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo**. 2010. 116 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p.1649-1656, 2008.

PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 32, p. 539–548, 2002.

PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex strudel. **Plant Physiology**, Minneápolis, v. 133, p. 829–837, 2003.

RADFORD, R. J. Growth analysis formulae: their use and abuse. **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 3, p. 171-175, 1967.

REDJALA, T. et al. Relationship between root structure and root cadmium uptake in maize. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, p. 241-24, 2011.

REDONDO-GÓMEZ, S.; MATEOS-NARANJO, E.; ANDRADES-MORENO, L. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a halophytic Cd-hyperaccumulator, *Arthrocnemum macrostachyum*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 184, p. 299–307, 2010.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, mar./abr. 2003.

SCHREIBER, L. Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, p. 546-553, 2010.

SCHUZENDUBEL, A. et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Clare, v. 127, n. 3, p. 887-889, Nov. 2001.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Variations in heavy metal accumulation, growth and yield of rice plants grown at different sewage sludge amendment rates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, p. 632–641, 2010.

SOUZA, T. C. et al. Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil and Environment**, Czeck, v. 55, n. 11, p. 504-510, Nov. 2009

SOUZA, V. L. et al. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 343-354, 2009.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 29, n. 1, p. 87-95, Jan. 2003.

TICHÁ, I. Photosynthetic characteristics during ontogenesis of leaves: stomatal density and size. **Photosynthetica**, Prague, v. 16, n. 3, p. 375-471, 1982.

TOPPI, L. S.; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 105-130, Apr. 1999.

UTHSCSA image tool: image processing and analyses program: version 3.0. San Antonio: University of Texas, 2002. Disponível em: <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

VACULÍK, M. et al. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, Barking, v. 163, p. 117-126, 2012.

ZHANG, F. Q. et al. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, Oxford, v. 67, p. 44-50, 2007.

ARTIGO 2

Tolerância à toxicidade do arsênio por *Panicum aquaticum* em função dos aspectos anatômicos, fisiológicos e da quantidade de DNA

RESUMO

Devido à alta toxicidade do arsênio, muitos estudos têm tentado aprimorar as técnicas para a sua remoção do ambiente. A biorremediação faz uso de organismos para remoção de elementos tóxicos e a fitorremediação, particularmente, utiliza plantas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a tolerância de *Panicum aquaticum* à contaminação por arsênio por meio de avaliações anatômicas, fisiológicas e da quantidade de DNA. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon em casa de vegetação por 30 dias sob seis concentrações de arsênio: 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 mg L⁻¹. Foram realizadas análises de crescimento, de trocas gasosas, anatômicas de folhas e raízes, da atividade de enzimas do sistema antioxidante e da quantidade de DNA. A taxa de crescimento relativo, área foliar específica e razão de área foliar foram reduzidas na presença de arsênio. As trocas gasosas não foram afetadas pelo metaloide. A anatomia da folha mostrou uma redução na espessura da epiderme na face abaxial e redução na espessura do limbo e clorênquima; um aumento na área de conjunto de células buliformes, na espessura da cutícula e área de esclerênquima, bem como redução do número e distância dos feixes vasculares também foram observados. O índice estomático aumentou em ambas as faces da epiderme foliar, mas houve uma redução no número e densidade de estômatos e maior funcionalidade estomática apenas na epiderme adaxial. As raízes apresentaram uma redução na espessura da epiderme, endoderme e exoderme. O índice de vulnerabilidade de Carlquist sofreu aumento. Apenas a atividade da CAT foi afetada pelo metaloide, mostrando um aumento nas concentrações mais baixas de arsênio, seguido de uma redução em concentrações mais elevadas. A quantidade de DNA foi negativamente afetada pela presença de arsênio em altas concentrações. *P. aquaticum* demonstrou-se parcialmente tolerante ao arsênio nas menores concentrações e apresentou evidências de toxicidade nas maiores concentrações do metaloide.

Palavras-chave: *Panicum aquaticum*. Arsênio. Fitorremediação. Anatomia. Fisiologia.

ABSTRACT

Because of the high toxicity of arsenic, many studies have attempted to improve the techniques for its removal from environment. Bioremediation uses biological organisms to toxic elements removal and phytoremediation particularly uses plants. Accordingly, the objective of this work was to evaluate the tolerance of *Panicum aquaticum* to contamination by arsenic by physiological, anatomical and DNA content evaluations. Plants were grown in Hoagland and Arnon nutritive solution at greenhouse for 30 days under the six arsenic concentrations: 0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg L⁻¹. Analysis of growth, gas exchanges, leaves and roots anatomy, activities of antioxidant system enzyme and DNA content were performed. The relative growth rate, specific leaf area and leaf area ratio were reduced in presence of arsenic. Leaf gas exchanges were not affected by the metalloid. Leaf anatomy showed a reduction in the epidermal thickness on the abaxial surface, and reductions on the mesophyll and chlorenchyma thickness; an increase in the overall buliform cells, in the cuticle thickness and area of sclerenchyma, as well as reductions in the distance and number of vascular bundles. Stomatal index increased in both leaves surfaces, but there was a reduction in the number and density of stomata and increased stomatal functionality only on the adaxial surface epidermis. Roots showed reduction in the thickness of the endodermis and exodermis, as well as in the cortex area and thickness. The vulnerability index showed an increase. Only leaves CAT activity were affected by the metalloid, showing an initial increase followed by a reduction at higher concentrations. DNA content was negatively affected by the presence of arsenic in high concentrations. *P. aquaticum* showed partial tolerant to arsenic at lower concentrations and show evidence of toxicity at the highest concentrations of the metalloid.

Keywords: *Panicum aquaticum*. Arsenic. Phytoremediation. Ecological Anatomy. Plant Physiology.

1 INTRODUÇÃO

O arsênio é um metaloide presente naturalmente em rochas, solos e ambientes aquáticos naturais, sendo mobilizado através de uma combinação de processos, tais como intemperismo, atividade biológica e emissões vulcânicas. Intervenções humanas representam uma importante contribuição nesse processo, por meio da mineração, queima de combustíveis fósseis, uso de pesticidas e herbicidas (SRIVASTAVA et al., 2011). Assim, em ambientes naturais como solo e ecossistemas aquáticos, a contaminação por arsênio tornou-se uma séria ameaça à biota, incluindo plantas, animais e seres humanos (MAHIMAIRAJA et al., 2005).

Devido à alta toxicidade do arsênio, muitos estudos tentam aperfeiçoar as técnicas de descontaminação do ambiente, utilizando organismos, em particular as plantas (SINGH et al., 2007). O acúmulo desse metaloide é uma forma extrema de tolerância das plantas, sob poluição, por elementos tóxicos. As folhas das plantas tolerantes acumulam arsênio, ao mesmo tempo em que estão envolvidas na fotossíntese, processo crucial para a produção primária. Desse modo, o ideal é que os principais processos fisiológicos da planta, tais como a fotossíntese, transporte da água, respiração e metabolismo de nutrientes, não sejam perturbados pela acumulação de concentrações elevadas de arsênio (WANG et al., 2012).

De fato, as plantas apresentam uma grande variação em suas respostas à toxicidade de arsênio (MEHARG, 2003). Em plantas não tolerantes, o arsênio pode induzir estresse oxidativo, resultando em danos celulares em termos de peroxidação lipídica, acúmulo de H_2O_2 e aumento na regulação de várias enzimas antioxidantes (MASCHER et al., 2002). O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem, ainda provocar danos ao DNA (SHARMA; SOHN, 2009). Além disso, por possuir uma semelhança química

com o fósforo, o arsênio pode se envolver em muitas reações celulares e até mesmo substituí-lo em grupos fosfatos do DNA (PATRA et al., 2004).

O arsênio pode promover modificações em células e tecidos da planta. Nos folhas podem ocorrer alterações como o espessamento do esclerênquima e colênquima, onde os elementos tóxicos podem ser adsorvidos na parede celular, constituindo assim, uma alternativa de alocação para esses elementos e prevenindo a translocação para os tecidos fotossintéticos (COSIO; VOLLENWEIDER; KELLER, 2006). Modificações na epiderme, nas células bulbiformes e nos estômatos podem ocorrer em função do controle da transpiração que está intimamente relacionada à absorção pelas raízes (GOMES et al., 2011). Além disso, alteração na proporção dos tecidos radiculares, assim como no desenvolvimento das barreiras apoplásticas são comuns em raízes de plantas expostas a elementos tóxicos (LUX et al., 2011; VACULIK et al., 2012).

Poáceas têm demonstrado potencial para uso na recuperação de áreas degradadas por metais pesados pela relativa facilidade em se desenvolver e, portanto promover rápida e densa cobertura do ambiente, fornecendo uma estrutura física, atenuando a erosão e adicionando matéria orgânica no sistema (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2001). Nesse sentido, *Panicum aquaticum* pertencente à subfamília Panicoideae (Poaceae), possui aspectos favoráveis à fitorremediação, sendo encontrada em brejos, margens de cursos d'água, campos, baixadas e locais úmidos em margens de estradas (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2007). Vale ressaltar que vários trabalhos evidenciaram capacidade para degradação de herbicidas por outras espécies do gênero, como *P. virgatum* (MURPHY; COATS, 2011) e *P. maximum* (CARMO et al., 2008).

Desse modo, o desenvolvimento da técnica de fitorremediação, precisa de uma profunda compreensão dos processos subjacentes à genética, bioquímica e níveis fisiológicos e agrônômicos (RAHMAN; HASEGAWA, 2011). Com

esse intuito, o presente estudo tem por objetivo avaliar a tolerância da macrófita *P. aquaticum* submetida às crescentes concentrações de arsênio, em função das respostas fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As plantas de *P. aquaticum* foram coletadas em uma lagoa livre de aparentes fontes de contaminação por arsênio, localizada no campus da Universidade Federal de Lavras. Após a coleta, as plantas foram lavadas e selecionadas quanto à sua qualidade fitossanitária e por uniformidade de tamanho. Em seguida levadas para casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, juntamente com areia lavada como substrato. Esse período de aclimatização durou o tempo suficiente para obtenção de gerações clonais isentas de qualquer fonte de arsênio endógena.

2.2 Instalação do experimento

As plantas filhas uniformizadas quanto ao tamanho foram transferidas para bandejas plásticas com capacidade para 4,0 L. Cada bandeja contendo 2,0 L de areia lavada e 2,0 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) como descrita para a aclimatização com concentrações crescentes de arsênio na forma de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Os valores das concentrações de As utilizadas para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de As total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (BRASIL, 2005). Nesse caso, o VMP segundo esta legislação é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 1).

O experimento teve duração de 30 dias, sendo o delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições. A parcela experimental constituiu-se de uma bandeja com três plantas.

Tabela 1 Concentrações de As utilizadas no experimento

Tratamento	Concentrações de As (mg L ⁻¹)
T1 (Controle)	0,00
T2	0,25
T3	0,50
T4	1,00
T5	2,00
T6	4,00

2.3 Análises de crescimento

Foram selecionadas e coletadas cinco plantas por tratamento em dois tempos: tempo um, no início do experimento e tempo dois, após 30 dias, ao final do experimento. As plantas foram separadas em folha, caule e raiz. A área foliar foi obtida a partir de fotografias de todas as folhas de cada planta e a mensuração do somatório das áreas dessas folhas utilizando-se o software de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). Em seguida, todo o material foi colocado em estufa de circulação forçada a 60 °C até peso constante. Os dados de massa seca da folha, caule e raiz foram obtidos em balança analítica.

Os dados de massa seca e área foliar foram utilizados para obtenção das variáveis de crescimento, de acordo com o software proposto por Hunt et al. (2002). As variáveis avaliadas foram: taxa de crescimento relativo (TCR), razão

de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), taxa assimilatória líquida (TAL) e razão raiz/parte aérea.

2.4 Análises de trocas gasosas

Aos 20 dias de exposição aos tratamentos de arsênio foram avaliadas as características de trocas gasosas das plantas através de um analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LCA4-ADC- INSTRUMENTAL. Avaliou-se a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E) e a relação entre carbono interno e externo (C_i/C_a), de uma folha completamente expandida em cada repetição por tratamento. As análises foram realizadas no período da manhã entre 9 e 11 horas.

2.5 Análises anatômicas

Ao final do período experimental, cinco plantas por tratamento foram coletadas, lavadas em água corrente e fixadas em F.A.A._{70%} - (formaldeído, ácido acético glacial p.a. e etanol 70%, na proporção de 0,5: 0,5: 9) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Foram realizadas secções paradérmicas e transversais da folha e transversais da raiz. As secções paradérmicas das faces abaxial e adaxial obtidas com lâminas de aço foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de safranina 1,0% (JOHANSEN, 1940). As secções transversais da folha foram retiradas da região mediana contendo a nervura central, sendo obtidas com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. As secções transversais foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50,0%, lavadas em água destilada e coradas com solução de

safrablau (safranina 1,0% e azul de Astra 0,1%, na proporção de 7:3), segundo os métodos descritos por Bukatsch (1972) e Burger e Richter (1991). Nos dois casos, os cortes corados foram montados com lâmina e lamínula em glicerina 50,0%.

Para as secções transversais da raiz fragmentos de cerca de 2,0 cm foram removidos da região pilífera da raiz e expostos a uma série etanólica crescente para desidratação do material (70, 80, 90 e 100%) sob vácuo, a temperatura ambiente segundo Johansen (1940) com modificações. Em seguida o material foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por etanol 100% e resina base (1:1), de acordo com as instruções do fabricante (kit Historesina Leica) por, pelo menos, 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se a infiltração em resina base por mais 24 horas sob vácuo a temperatura ambiente. Para a polimerização utilizou-se o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Os cortes foram feitos em micrótomo de deslizamento na espessura de 5,0 μm , sendo em seguida corados em solução de Azul de Toluidina 1% (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As lâminas foram fotografadas em câmera Moticam 2500 acoplada ao microscópio modelo Olympus CX41 e as análises realizadas em um software de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). As características anatômicas avaliadas na folha em secção transversal foram: espessura da epiderme na face abaxial (EAB), espessura da epiderme na face adaxial (EAD), espessura do limbo (LM), espessura do parênquima clorofiliano (PC), área do conjunto de células buliformes por campo (ACB), número de conjuntos de células buliformes por mm^{-1} de folha (NCB), distância entre os feixes vasculares (DF), número de feixes vasculares por mm^{-1} de folha (NF), espessura da cutícula (CT) e área de esclerênquima por campo (ECL). Em secção paradérmica foram avaliadas em ambas as faces da epiderme: densidade estomática (DE), índice estomático (IE), diâmetro polar (POL) e equatorial

(EQU) dos estômatos e funcionalidade estomática (FUN). Na raiz foram avaliados: espessura da epiderme (EP), espessura da exoderme (EX), espessura da endoderme (ED), proporção entre a área do cilindro vascular e a área total da raiz (ACAT), proporção de aerênquima no córtex (PAR), espessura do córtex (ECX) e índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC). O IVC foi calculado segundo Carlquist (1975), as proporções de aerênquima segundo Pereira et al. (2008) e a DE e o IE segundo Castro, Pereira e Paiva (2009).

2.6 Análises do sistema antioxidante enzimático

Ao término do experimento, amostras de folhas e raízes foram coletadas no período da manhã, armazenadas em nitrogênio líquido e preservadas em freezer -80°C até a data das análises.

Para a extração enzimática, utilizaram-se 0,2 g de folhas e de raízes, maceradas em nitrogênio líquido com adição de 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15,0 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), ácido ascórbico 0,001 M e 12 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nos ensaios enzimáticos da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10,0 µL do extrato enzimático a 190,0 µL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50,0 mM (pH 7,8), metionina 14,0 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75,0 µM e riboflavina 2,0 µM. A placa de acrílico UV contendo o meio de incubação mais amostra foi

iluminado com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o controle, utilizou-se o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro ELISA e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem extrato enzimático}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 10,0 μL do extrato enzimático foi adicionada a 190,0 μL do meio de incubação contendo 100,0 μL de fosfato de potássio 200,0 mM (pH 7,0) e 10,0 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240,0 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para 18 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290,0 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 10,0 μL do extrato enzimático foi adicionada a 190,0 μL de tampão de incubação composto por 100,0 μL de fosfato de potássio 200,0 mM (pH 7,0), 10,0 μL de ácido ascórbico 10,0 mM e 10,0 μL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para 1,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

2.7 Citometria de fluxo

Para quantificação do conteúdo de DNA foram utilizadas cinco folhas jovens de *P. aquaticum* por tratamento. Para a análise de citometria de fluxo, as mostras de *P. aquaticum*, juntamente com o padrão de referência (*Pisum sativum*) foram dissociadas com auxílio de um bisturi em uma placa de petri (GALBRAITH et al., 1983), sob gelo triturado, contendo 1,0 mL de tampão de extração LB01 gelado, para a liberação dos núcleos (DOLEŽEL et al., 1989). A suspensão obtida foi filtrada em uma malha de náilon de 50,0 µm e corada com 25,0 µL de iodeto de propídeo (1,0 mg mL⁻¹) acrescentando-se, em seguida, 5 µL de RNase do tipo I e, finalmente, armazenadas em tubos de poliestireno no escuro e refrigeradas até o momento da análise em citômetro Facs Callibur 4 cores. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados no programa WinMDI 2.8 (2009).

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado utilizando-se a razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da interfase) do padrão de referência e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg).

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$ ou regressão com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados para as análises de crescimento das plantas realizadas em dois tempos evidenciaram alterações significativas na maioria das variáveis, em decorrência da presença de arsênio. A taxa de crescimento relativo (TCR) apresentou uma redução na presença do arsênio. De modo semelhante, na razão de área foliar (RAF) observou-se um comportamento decrescente com a elevação das concentrações de arsênio. A área foliar específica AFE e AF demonstrou uma queda com o aumento da concentração desse metaloide. A razão raiz/parte aérea ($F_c = 0,698$ e $P = 0,63$), com média de $1,59 \text{ g g}^{-1}$ e a taxa assimilatória líquida ($F_c = 3,202$ e $P = 0,0234$) com média de $0,000017 \text{ g mm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$ não foram afetadas pelas diferentes concentrações de arsênio (Figura 1).

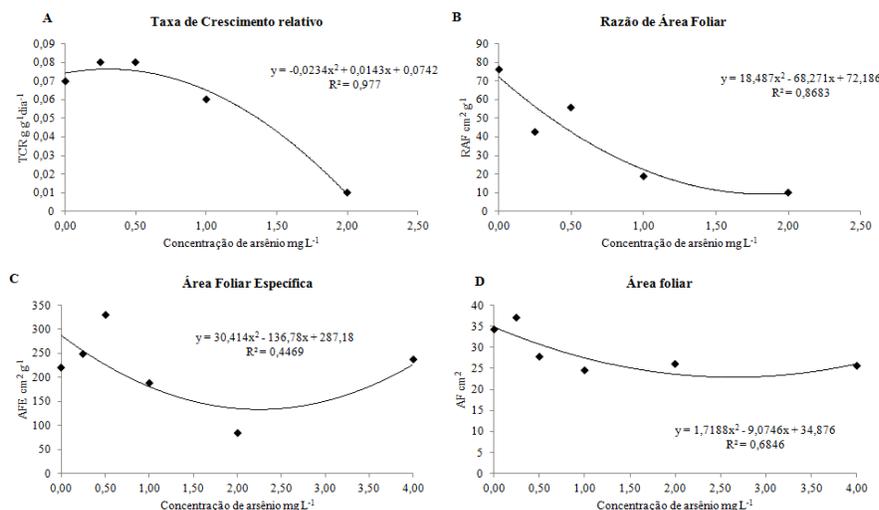


Figura 1 Análises de Crescimento de plantas de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio. A= Taxa de Crescimento relativo, B= Razão de Área Foliar, C= Área Foliar Específica, D= Área foliar. Cada ponto no gráfico refere-se à média de cinco repetições em dois tempos de coleta.

Diferentes autores observaram que uma alta concentração de arsênio é tóxica para a maioria das plantas, uma vez que interfere em processos metabólicos e inibe seu crescimento e desenvolvimento (MATEOS-NARANJO; ANDRADES-MORENO; REDONDO-GÓMEZ, 2012). A diminuição do crescimento é atribuída, muitas vezes, à redução na assimilação de carbono pela fotossíntese (MATEOS-NARANJO; ANDRADES-MORENO; REDONDO-GÓMEZ, 2012), decorrente de uma limitação estomática (FLEXAS; MEDRANO, 2002), ou em termos de fixação de CO₂, transporte de elétrons, fotofosforilação e atividade enzimática (MATEOS-NARANJO; ANDRADES-MORENO; REDONDO-GÓMEZ, 2012). No entanto, a taxa fotossintética ($F_c = 0,478$ e $P = 0,7894$), com média de $0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a condutância estomática ($F_c = 0,2$ e $P = 0,9593$), com média de $0,06 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a relação C_i/C_a ($F_c = 2,205$ e $P = 0,0871$), com média de $0,26$ além da taxa transpiratória ($F_c = 0,444$ e $P = 0,8131$), com média de $0,007 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não foram afetadas em nenhuma das concentrações de arsênio.

Sabe-se, entretanto, que plantas sob estresse, geralmente, apresentam alta taxa de respiração, causando alterações no crescimento com maior perda de carbono e redução no acúmulo de biomassa. De acordo com Flexas et al. (2006), do total de carbono assimilado na fotossíntese, geralmente mais que a metade é perdida nos processos respiratórios necessários ao crescimento e à manutenção do metabolismo vegetal; porém esse equilíbrio pode mudar sob estresse. Talvez seja esse o caso da redução no crescimento de *P. aquaticum* na presença de arsênio.

Embora a taxa fotossintética tenha sido mantida, a queda na RAF, na AF e na AFE, provavelmente afetaram o crescimento, uma vez que a RAF constitui-se em um dos componentes responsáveis pelo incremento de biomassa avaliado como TCR (SINGH; AGRAWAL, 2010), e sofre variações em função da AFE (PINZÓN-TORRE; SCHIAVINAT, 2008).

Considerando que a TAL descreve a eficiência de produção líquida do aparelho assimilatório, ou seja, a fotossíntese por unidade de área foliar (PINZÓN-TORRE; SCHIAVINAT, 2008), é provável que a sua falta de alteração ao longo dos tratamentos tenha sido favorecida pela manutenção da fotossíntese apesar da redução na RAF e na AFE.

A manutenção da fotossíntese em *P. aquaticum* na presença de arsênio contraria vários estudos que demonstraram um declínio nas taxas fotossintéticas (MATEOS-NARANJO, ANDRADES-MORENO; REDONDO-GÓMEZ, 2012; WANG et al., 2012) como resultado da toxidez desse metaloide. Segundo Wang et al. (2012), idealmente, os principais processos da planta, como fotossíntese não devem ser perturbados quando expostas à altas concentrações de arsênio. Além disso, segundo Stoeva e Bineva (2003), estresse por arsênio podem levar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e causar estresse oxidativo, podendo prejudicar as membranas dos cloroplastos. No entanto, a resposta do aparelho fotossintético observada em *P. aquaticum*, provavelmente, reflete a ação do sistema antioxidante, uma vez que não foi verificado efeito dos tratamentos sobre esses processos, sugerindo que a fase fotoquímica da fotossíntese pode não ter sofrido inibições (PEREIRA et al., 2011).

A relação raiz/parte aérea comprova que as modificações sofridas pelo incremento de biomassa em *P. aquaticum* como consequência da contaminação por arsênio seguiram padrões semelhantes entre raiz e parte aérea. Diferentemente, Melo et al. (2010) verificou um aumento da relação raiz/parte aérea em função de doses crescentes de arsênio em *Eucalyptus grandis* e *E. cloeziana*, indicando um prejuízo à produção da planta.

P. aquaticum apresentou epiderme unisseriada e conjuntos de células buliformes na face adaxial; folhas anfiestomáticas com estômatos em alteres e papilas na face adaxial e abaxial; clorênquima compacto e radiado em torno dos

feixes vasculares, denotando a estrutura Kranz, de acordo com o descrito por Guglieri, Longhi-Wagner e Zuloaga (2007).

A maioria das características dos tecidos foliares em secção transversal foi afetada pelas diferentes concentrações de arsênio. As espessuras da epiderme na face abaxial (EAB), do limbo foliar (LM) e parênquima clorofiliano (PC) apresentaram um aumento nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹, seguido de uma redução nas concentrações mais elevadas de arsênio. Ao passo que a espessura da epiderme na face adaxial (EAD) foi diferente e menor apenas na concentração de 1,0 mg L⁻¹. A presença do metaloide, de um modo geral, promoveu um aumento nos valores das médias da área de conjunto de células buliformes (ACB). A distância (DF) e número (NF) de feixes vasculares também sofreram modificações em decorrência dos tratamentos, apresentando valores maiores na concentração de 2,0 mg L⁻¹ e nas concentrações de 0,0 e 1,0 mg L⁻¹, respectivamente. A concentração mais elevada de arsênio promoveu maior espessura da cutícula (CT) e área de esclerênquima (ECL). Somente no número de conjunto de células buliformes (NCB) não se verificou diferenças significativas causadas pelos tratamentos (Figura 2 e Tabela 2).

Uma importante função da epiderme foliar é a realização de trocas gasosas (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Desse modo, modificações na espessura da epiderme, assim como da cutícula podem afetar a resistência à difusão de CO₂ (MIYAZAWA; TERASHIMA, 2001) e a transpiração (GRISI et al., 2008). Entretanto, como referido anteriormente, não foram detectadas influência dos tratamentos na taxa transpiratória e na relação Ci/Ca. Da mesma forma, as modificações na espessura do limbo e do parênquima clorofiliano, apresentadas por *P. aquaticum* não foram suficientes para afetar a disponibilidade de CO₂ na folha, apesar de seu importante papel nesse aspecto (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

O aumento do esclerênquima sob a concentração mais elevada do metal pode estar relacionado com a adsorção de metais nas paredes celulares, constituindo uma via alternativa para alocação destes íons e impedindo sua translocação para tecidos fotossintéticos (GOMES et al., 2011). De fato, a distribuição entre os tecidos da folha tende a ocorrer de forma a minimizar a sua concentração no parênquima clorofiliano, prevenindo danos à fotossíntese (COSIO; VOLLENWEIDER; KELLER, 2006 et al., 2006; GOMES et al., 2011). Essa hipótese pode justificar as modificações observadas nos tecidos foliares de *P. aquaticum*, que, além disso, podem ter promovido esclerofilia na folha, uma vez que a área foliar foi reduzida.

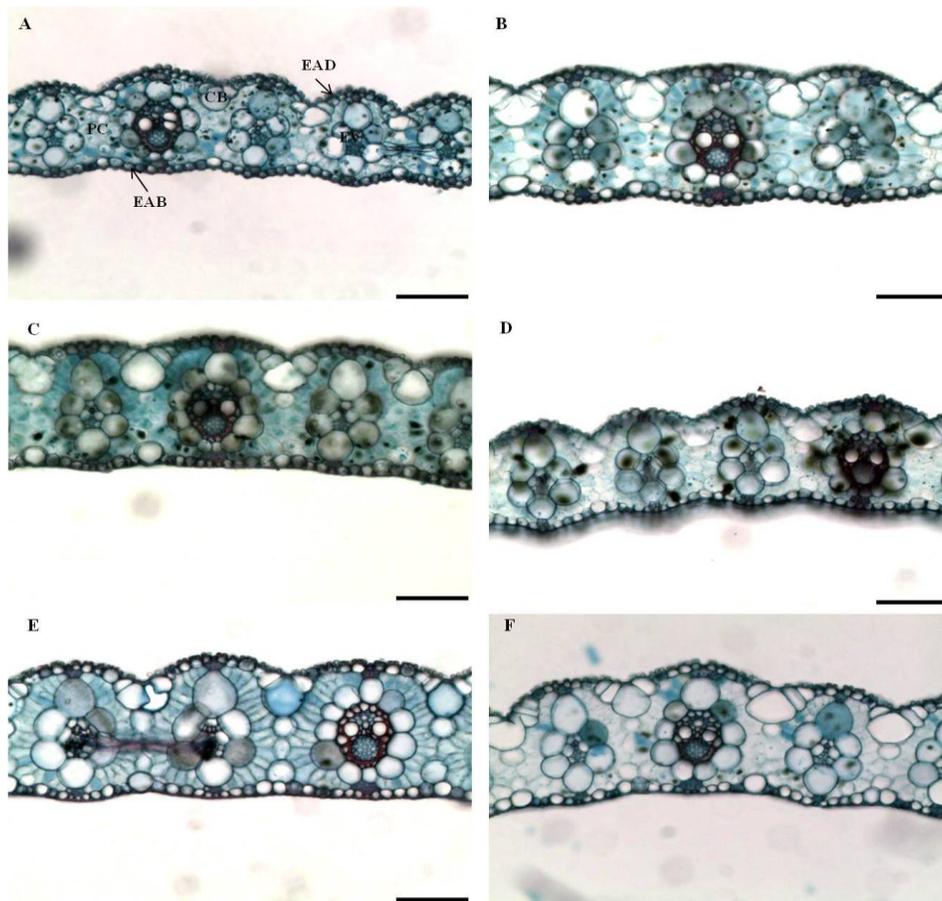


Figura 2 Secções transversais de folhas de *Panicum aquaticum* submetidas a concentrações crescentes de arsênio. EAD= epiderme face adaxial, EAB= epiderme face abaxial, PC= parênquima clorofiliano, CB= células buliformes, FV= feixe vascular. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,25 mg L⁻¹, C= 0,50 mg L⁻¹, D= 1,00 mg L⁻¹, E= 2,00 mg L⁻¹, F= 4,00 mg L⁻¹. Barras= 100 μm.

Tabela 2 Características dos tecidos foliares em secção transversal de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio (mg L^{-1})

As mg L^{-1}	EAB (μm)	EAD (μm)	LM (μm)	PC (μm)	ACB (μm^2)	NCB	DF (μm)	NF	CT (μm)	ECL (μm^2)
0,00	14,37 b	12,48 a	188,28 b	141,12 b	2210,61 b	06 a	56,06 b	07 a	5,72 b	1134,60 d
0,25	15,89 a	13,12 a	203,57 a	153,84 a	2894,53 b	06 a	60,97 b	06 b	5,71 b	1437,55 c
0,50	16,24 a	12,44 a	208,86 a	156,01 a	3231,18 a	06 a	64,17 b	06 b	5,61 b	1709,72 b
1,00	13,97 b	11,35 b	196,11 b	147,28 b	2681,97 b	06 a	58,57 b	07 a	5,84 b	1802,73 b
2,00	14,94 b	12,28 a	196,97 b	148,71 b	3112,76 a	06 a	82,71 a	06 b	5,82 b	1596,22 b
4,00	15,33 b	12,95 a	192,65 b	145,22 b	3066,93 a	06 a	65,36 b	06 b	6,26 a	1999,99 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, LM= espessura do limbo, PC= espessura do parênquima clorofiliano, ACB= área de conjunto de células buliformes por campo, NCB= número de conjunto de células buliformes (por mm^{-1} de folha), DF= distância entre os feixes vasculares, NF= número de feixes vasculares (por mm^{-1} de folha), CT= espessura da cutícula, ECL= área de esclerênquima.

As células buliformes, ou células motoras, estão agrupadas em determinados pontos da epiderme de folhas de poáceas e por mudanças de turgor, estão envolvidas no movimento da folha, promovendo seu dobramento de acordo com as condições ambientais (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009; HABERLANDT, 1914). Embora não tenham variado em número, os conjuntos de células buliformes de *P. aquaticum* apresentaram um aumento em área ocupada no limbo foliar. Isso sugere, provavelmente, um aumento no volume das células, e conseqüentemente uma maior abertura da folha, permitindo maior exposição de área foliar e compensando a redução dessa característica.

O estudo das características anatômicas da folha de *P. aquaticum* em secção paradérmica não demonstrou modificações decorrentes dos tratamentos na densidade estomática (DE), diâmetro polar (POL) e equatorial (EQU) e funcionalidade estomática (FUN) na face abaxial e em EQU na face adaxial das folhas dessas plantas.

Na face abaxial, o índice estomático (IE) apresentou um aumento na presença do arsênio, sendo sua maior média na concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$. Enquanto que na face adaxial, o IE, de um modo geral, sofreu um aumento nas maiores concentrações do elemento. Ainda na face adaxial, a DE demonstrou uma redução nas concentrações de $0,25$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A presença de arsênio em concentrações intermediárias promoveu aumento no POL e na FUN, seguidos de um decréscimo nas concentrações mais elevadas do metaloide (Tabela 3).

Ainda na epiderme, em sua face abaxial, o aumento do IE na presença de arsênio, pode ser um indício de influência desse metal na diferenciação das células para formação dos estômatos. Pereira et al. (2011) verificaram resultados semelhantes em plantas de aguapé na presença de arsênio. Na face adaxial, modificações no número e no tamanho dos estômatos foram observadas na presença do metal, o que determinou alterações em sua densidade e funcionalidade. Isso está de acordo com Castro, Pereira e Paiva (2009) que

afirmam que condições ambientais alteram o tamanho e a densidade dos estômatos, com o intuito de auxiliar a planta na tolerância desta condição.

Tabela 3 Características da epiderme foliar em secção paradérmica de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio (mg L^{-1})

FACE ABAXIAL					
As mg L^{-1}	DE	IE (%)	POL (μm)	EQU (μm)	FUN
0,00	100a	0,21c	34,46a	21,95a	1,58a
0,25	091a	0,22c	34,69a	21,69a	1,60a
0,50	096a	0,23b	34,81a	23,04a	1,52a
1,00	089a	0,23b	34,56a	22,13a	1,56a
2,00	098a	0,25a	34,94a	22,45a	1,56a
4,00	089a	0,24b	35,94a	21,93a	1,64a
FACE ADAXIAL					
As mg L^{-1}	DE	IE (%)	POL (μm)	EQU (μm)	FUN
0,00	145a	0,27b	29,87b	20,21a	1,49b
0,25	126b	0,27b	31,45a	19,69a	1,60a
0,50	148a	0,29a	29,88b	19,51a	1,54a
1,00	132b	0,27b	31,75a	19,99a	1,59a
2,00	153a	0,30a	29,52b	20,42a	1,45b
4,00	154a	0,30a	29,31b	19,83a	1,48b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, %). DE= densidade estomática (por mm^2 de folha), IE= índice estomático, POL= diâmetro polar dos estômatos, EQU= diâmetro equatorial dos estômatos, FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU).

P. aquaticum possui epiderme radicular uniestratificada, exoderme formada por células de paredes espessadas e endoderme unisseriada. O seu córtex é composto por aerênquimas constitutivos.

Na anatomia da raiz de *P. aquaticum*, todas as características avaliadas foram afetadas pela presença do arsênio. A espessura da epiderme (EP) apresentou uma redução na concentração de 1,0 mg L⁻¹, sendo os demais tratamentos considerados iguais. As diferentes concentrações de arsênio promoveram a redução na espessura da exoderme (EX) e na espessura da endoderme (ED), uma vez que as médias dos tratamentos contendo o metaloide foram consideradas iguais entre si e menores que o tratamento controle. Na concentração de 0,25 mg L⁻¹ foi possível verificar uma redução significativa na média da proporção entre a área de cilindro vascular e a área total da raiz (ACAT), diferindo das demais médias que foram consideradas iguais. Do mesmo modo, os valores para a proporção de aerênquima no córtex (PAR) foram menores na concentração de 0,25 mg L⁻¹, assim como à 1,0 mg L⁻¹ de arsênio. A espessura do córtex (ECX) sofreu uma redução na presença do metaloide. E o índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC) demonstrou tendência ao aumento nas concentrações mais elevadas do elemento (Figura 3,4 e 5 e Tabela 4).

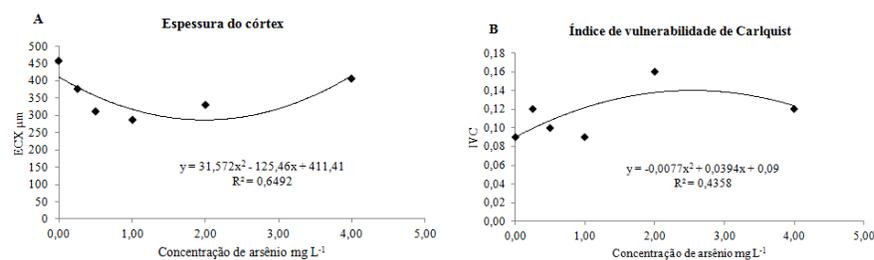


Figura 3 Espessura do córtex (A) e Índice de vulnerabilidade de Carlquist (B) em plantas de *Panicum aquaticum* submetidas a crescentes concentrações de arsênio.

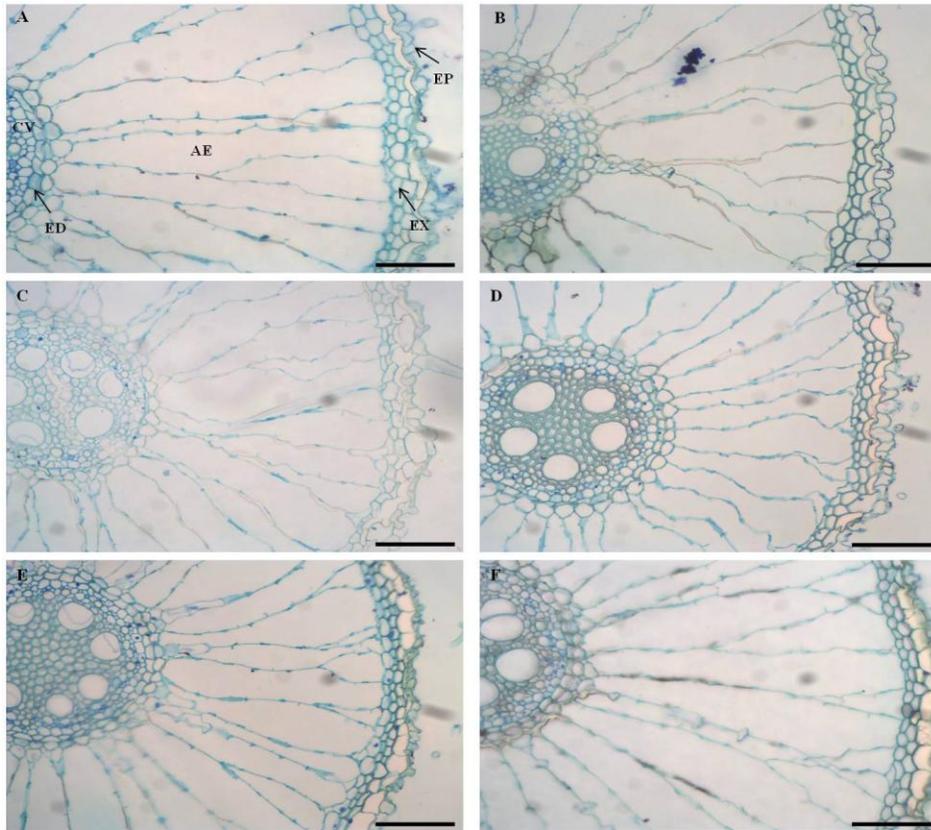


Figura 4 Secções transversais de raízes de *P. aquaticum* submetidas a crescentes concentrações de arsênio. EP= epiderme, EX= exoderme, ED= endoderme, AE= aerênquima, CV= cilindro vascular. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,25 mg L⁻¹, C= 0,50 mg L⁻¹, D= 1,00 mg L⁻¹, E= 2,00 mg L⁻¹, F= 4,00 mg L⁻¹. Barras= 100 µm.

Tabela 4 Características dos tecidos radiculares em secção transversal de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio (mg L^{-1})

As mg L^{-1}	EP (μm)	EX (μm)	ED (μm)	ACAT	PAR
0,00	41,26 a	26,62 a	15,59 ^a	0,06 a	0,83 a
0,25	44,01 a	23,38 b	11,69 b	0,04 b	0,81 b
0,50	38,66 a	22,63 b	11,69 b	0,05 a	0,85 a
1,00	33,13 b	21,05 b	11,75 b	0,06 a	0,76 b
2,00	40,99 a	23,66 b	12,59 b	0,06 a	0,85 a
4,00	41,84 a	23,94 b	11,35 b	0,06 a	0,85 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EP= espessura da epiderme, EX= espessura da exoderme, ED= espessura da endoderme, ACAT= proporção entre a área do cilindro vascular e a área total, PAR= proporção de aerênquima no córtex.

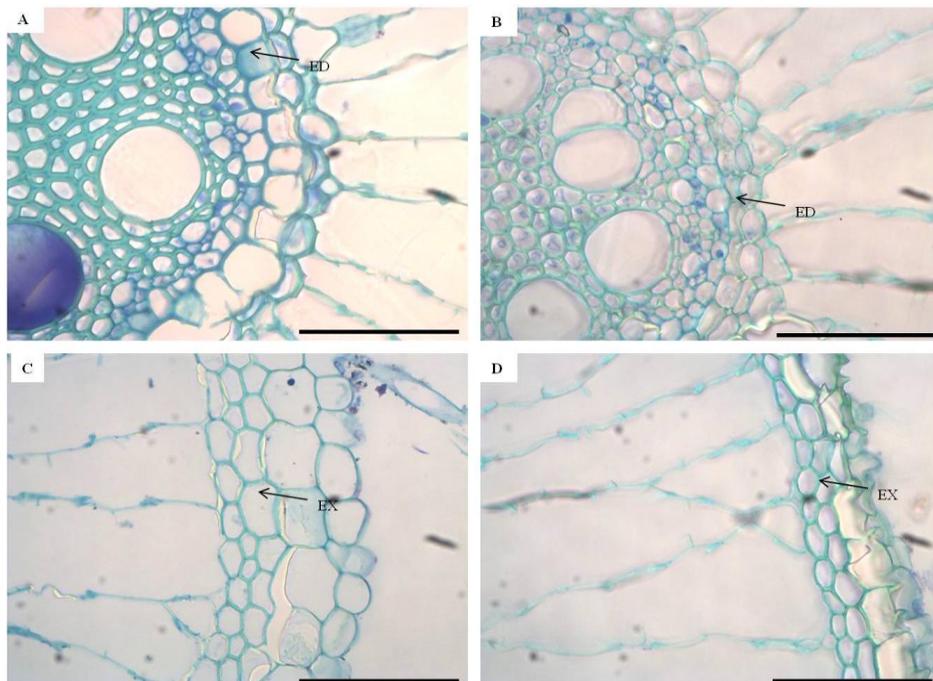


Figura 5 Detalhe da endoderme (A e B) e exoderme (C e D) da raiz de *Panicum aquaticum* sob contaminação por arsênio. A e C= 0,0 mg L⁻¹; B e D= 4,0 mg L⁻¹. Barras= 100 μm.

A redução da espessura da exoderme e da endoderme de *P. aquaticum* nos tratamentos contendo arsênio pode representar um indício de toxicidade, uma vez que são consideradas adaptações importantes para a tolerância das plantas a fatores de estresse, como metais pesados, por funcionarem como barreiras apoplásticas (MARQUES et al., 2011). Essa redução, provavelmente, favoreceu a translocação de arsênio para a parte aérea. Resultados contrastantes foram encontrados em aguapé, onde a endoderme tornou-se 21,6% mais espessa nos tratamentos com arsênio, em relação ao controle (PEREIRA et al., 2011).

Embora tenha ocorrido uma redução na espessura do córtex ao longo dos tratamentos, a proporção entre a área do cilindro vascular e a área total foi pouco afetada. Nesse caso a proporção entre os tecidos radiculares sofreu poucas

alterações, contrariando autores que afirmam ser esta uma consequência de exposição contínua aos metais pesados (LUX et al., 2011; VACULÍK et al., 2012).

Aerênquimas fornecem um caminho de baixa resistência interna para o movimento de O₂ (e outros gases) entre a parte aérea e a extremidade da raiz em plantas de ambiente alagado (LI et al., 2011). Nesse sentido, a redução na proporção de aerênquima pode ter afetado o crescimento das plantas.

O IVC pode ser influenciado por condições ambientais, constituindo-se em um índice que detecta a vulnerabilidade do xilema a embolias (CARLQUIST, 1975; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Desse modo, *P. aquaticum* apresentou menor eficiência na condutividade hidráulica na presença de arsênio, sendo esta uma característica de toxicidade, causando prejuízos à translocação de nutrientes à parte aérea e contribuindo para a redução na RAF e na TCR.

Em relação às enzimas do sistema antioxidante, apenas a atividade da catalase (CAT) na folha foi afetada pelas diferentes concentrações de metal. Nesse caso, observou-se um aumento da atividade nas menores concentrações, atingindo a maior atividade sob 1,0 mg L⁻¹ de arsênio, seguida de uma queda a valores iguais ao controle nas duas concentrações mais elevadas do metaloide (Figura 6). As atividades da CAT na raiz (Fc= 0, 776 e P= 0, 5854), da peroxidase do ascorbato na folha (Fc= 1, 121 e P= 0, 4001) e na raiz (Fc= 0, 885 e P= 0, 5284) e da dismutase do íon superóxido na folha (Fc= 2, 504 e P= 0, 0895) e na raiz (Fc= 0, 770 e P= 0, 5890) não apresentaram modificações significativas entre os tratamentos.

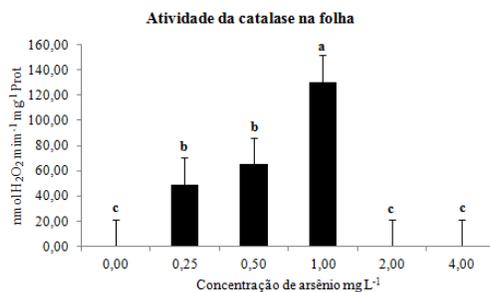


Figura 6 Atividade da Catalase na folha de *Panicum aquaticum* sob crescentes concentrações de arsênio.

Dentre os vários processos bioquímicos e fisiológicos, o comportamento do sistema antioxidante é fundamental no entendimento da tolerância das plantas ao arsênio (VALKO et al., 2006). Entretanto, a ausência de modificações na atividade da SOD, da APX e da CAT na raiz nas crescentes concentrações do metaloide contraria essa hipótese em *P. aquaticum*. Os resultados encontrados fornecem indícios de que tais enzimas foram pouco responsivas ao estresse por arsênio ao não alterarem sua atividade diante do aumento das concentrações do metaloide, permitindo a ação das EROs sobre processos cruciais, prejudicando o crescimento e a quantidade de DNA.

Diante do comportamento demonstrado pela SOD e APX, é possível inferir que a remoção dos EROs formados em resposta ao estresse, foi realizada de modo mais eficiente pela CAT na folha em concentrações intermediárias. Provavelmente, a atividade da CAT foliar tenha sido aumentada em detrimento à APX como mecanismo compensatório (VANDENABEELE et al., 2004), visto a necessidade do equilíbrio das enzimas CAT e APX, essencial ao controle de EROs (BOWLER et al., 1991), uma vez que ambas agem sobre o peróxido de hidrogênio. Entretanto, a posterior redução sofrida pela atividade da CAT na folha sob maiores concentrações de arsênio pode ser um indício de inibição, tanto pela quantidade limitada da enzima disponível, quanto por inibição em sua síntese (OLIVEIRA, 2010), demonstrando sinais de toxicidade do arsênio.

Segundo Toppi e Gabrielli (1999) a presença de metais pesados altera a atividade das enzimas antioxidantes podendo inibi-las ou estimulá-las. Provavelmente, outros componentes do sistema antioxidante atuaram para minimizar a ação danosa das EROs, principalmente, em relação à fotossíntese.

No caso das análises de citometria de fluxo, observou-se menor quantidade de DNA nas plantas submetidas a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de arsênio (Tabela 5 e Figura 7 e 8).

Como relatado anteriormente, uma consequência comum de estresse biótico ou abiótico, como os provocados pelo arsênio, é o aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio, seguida por uma situação conhecida como estresse oxidativo, responsáveis por injúrias em membranas lipídicas, proteínas e no DNA (PINTO et al., 2003). A redução no teor de DNA verificada nas plantas de *P. aquaticum* submetidas a maiores concentrações de arsênio provavelmente fornece um indício de que esse elemento causou algum dano ou redução na síntese de DNA, como observado por Gichner et al. (2004) ao avaliarem o efeito do cádmio em tabaco. Essa redução, portanto, pode ser reflexo da reduzida resposta das enzimas do sistema antioxidante avaliadas, e ter afetado o crescimento de *P. aquaticum*, assim como foi observado por Monteiro et al. (2010) em *Lactuca sativa* na presença de cádmio.

Além disso, segundo Patra et al. (2004), o arsênio pode substituir o fósforo em grupos fosfatos do DNA, por suas semelhanças químicas com esse elemento. Provavelmente, essa substituição causaria redução na quantidade de DNA, o que pode ser outro fator determinante para os resultados observados.

Vale ressaltar que o coeficiente de variação (CV) é um critério elementar na validação de métodos citológicos e definem uma gama de valores entre 1 e 2% para análises de alta qualidade e 3% como um valor de rotina (MARIE; BROWN, 1993). Por outro lado, um $CV < 5\%$ pode ser aceitável

(GALBRAITH et al., 1983), o que permite considerar os CVs observados para as amostras de *P. aquaticum*, como aceitáveis.

Tabela 5 Quantidade de 2C de DNA e coeficiente de variação obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo para *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio (mg L^{-1})

As mg L^{-1}	DNA (pg)	CV (%)
0,00	3,38	0,91
0,25	3,30	0,57
0,50	3,14	0,73
1,00	3,22	0,73
2,00	2,71	0,68
4,00	3,21	0,58

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%).

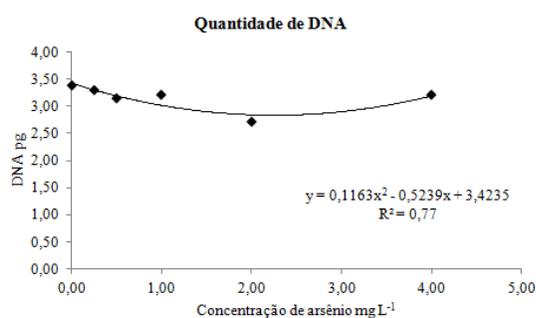


Figura 7 Quantidade de 2C de DNA obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo para *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio.

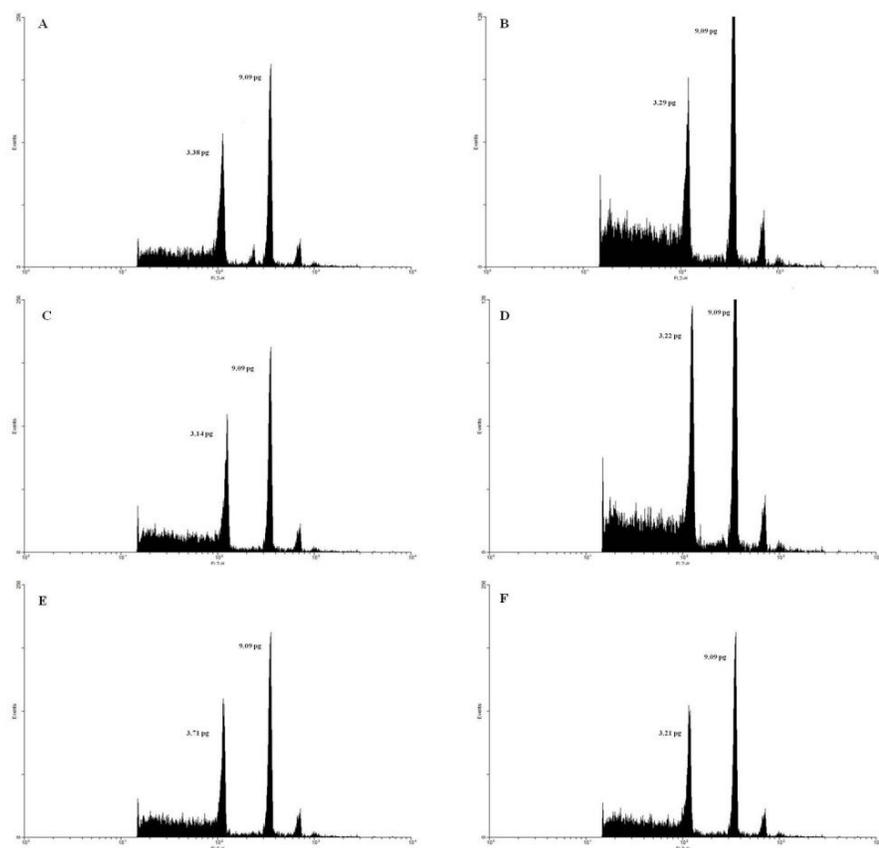


Figura 8 Histogramas de citometria de fluxo em núcleos de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de arsênio. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,25 mg L⁻¹, C= 0,50 mg L⁻¹, D= 1,00 mg L⁻¹, E= 2,00 mg L⁻¹, F= 4,00 mg L⁻¹. O primeiro pico em cada histograma é referente ao pico G1 das plantas de cada tratamento e o segundo pico G1 é da amostra de referência. Eixo das abscissas representa a quantidade de DNA e o das ordenadas, o número de núcleos.

5 CONCLUSÃO

Em concentrações mais elevadas de arsênio há redução na taxa de crescimento relativo, razão de área foliar e área foliar específica, embora a fotossíntese e a taxa assimilatória permaneçam inalteradas.

A anatomia é modificada negativamente, principalmente pela redução na espessura das barreiras apoplásticas na raiz. As enzimas do sistema antioxidante avaliadas são pouco responsivas ao estresse imposto pelo arsênio, ou inibidas por altas concentrações do metaloide, no caso da catalase, permitindo a ação danosa de EROs. A quantidade de DNA também é afetada nas maiores concentrações de arsênio.

Desse modo, *Panicum aquaticum* demonstra-se parcialmente tolerante ao arsênio em suas menores concentrações e apresenta evidências de toxicidade nas maiores concentrações de arsênio avaliadas.

REFERÊNCIAS

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeratio following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Minneápolis, v.116, p. 651-658, 1998.

BOWLER, C. et al. Manganese superoxide-dismutase can reduce cellular-damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, n. 7, p. 1723-1732, July 1991.

BRASIL. Congresso. Senado Federal. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2005.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfarbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975. 259 p.

CARMO, M. L. Influence of *Panicum maximum* Cultivation Period on Phytoremediation of Soil Contaminated with Picloram. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 315-322, 2008.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Establishment of herbaceous plants in soils contaminated with heavy metals and inoculation with mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 1443-1452, 2001.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

COSIO, C.; VOLLENWEIDER, P.; KELLER, C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). II. microlocalization and cellular effects of cadmium. **Environmental of Experimental Botany**, Amsterdam, v. 58, p. 25-40, 2006.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 31, p. 113–120, 1989.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 123-142, 1968.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.0**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2007.

FLEXAS, J. et al. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, p. 343–352, 2006.

FLEXAS, J.; MEDRANO, H. Drought-inhibition of photosynthesis in C-3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 183–189, 2002.

GALBRAITH, D. W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Minneápolis, v. 59, p. 309-314, 1977.

GICHNER, T. et al. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 559, p. 49–57, 2004.

GOMES, M. P. et al. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 566-573, Sept./Oct. 2011.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuaí’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, 2008.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER H.M.; ZULOAGA, F. O. Panicum Sect. *Dichotomiflora* (Hitchc. & Chase) Honda e P. sect. *Virgata* Hitchc. & Chase ex Pilg. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, n. 4, p. 785-805, 2007.

HABERLANDT, G. **Physiological plant anatomy**. London: Macmillan, 1914.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HUNT, R. et al. A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 485-488, 2002.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LI, H. et al. Root porosity and radial oxygen loss related to arsenic tolerance and uptake in wetland plants. **Environmental Pollution**, Barking, v. 159, p. 30-37, 2011.

LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 21-37, 2011.

MAHIMAIRAJA, S. Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 86, p. 1-82, 2005.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, p. 41-51, 1993.

MARQUES, T. C. L. L.S. M. et al. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 35, n. 5, p. 997-1006, 2011.

MASCHER, R. et al. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 961-969, 2002.

MATEOS-NARANJO, E.; ANDRADES-MORENO, L.; REDONDO-GÓMEZ, S. Tolerance to and accumulation of arsenic in the cordgrass *Spartina densiflora* Brongn. **Bioresource Technology**, Essex, v. 104, p. 187-194, 2012.

MEHARG, A. A. Variation in arsenic accumulation-hyperaccumulation in Ferns and their allies. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, p. 25-31, 2003.

MIYAZAWA, S. I.; TERASHIMA, I. Slow development of leaf photosynthesis in an evergreen broad-leaved tree, *Castanopsis sieboldii*: relationships between leaf anatomical characteristics and photosynthetic rate. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 24, p. 279–291, 2001.

MONTEIRO, M. S. et al. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, p. 1231–1237, 2010.

MURPHY, I. J.; COATS, J. R. The capacity of switchgrass (*Panicum virgatum*) to degrade atrazine in a phytoremediation setting. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 3, p. 715–722, 2011.

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

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio.** 2010. 171 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PATRA, M. et al. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 52, p.199–223, 2004.

PEREIRA, F. J. et al. Anatomical and Physiological Mechanisms of Water Hyacinth Plants to Arsenic Contamination Tolerance. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 259-267, 2011.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho ‘Saracura’ em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, 2008.

PINTO, E. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 39, p. 1008–1018, 2003.

PINZÓN-TORRES, J. A.; SCHIAVINATO, M. A. Crescimento, eficiência fotossintética e eficiência do uso da água em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais. **Hoehnea**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 395-404, 2008.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H. Aquatic arsenic: Phytoremediation using floating macrophytes. **Chemosphere**, Oxford, v. 83, p. 633–646, 2011.

SHARMA, V. K.; SOHN, M. Aquatic arsenic: toxicity, speciation, transformations, and remediation. **Environment International**, New York, v. 35, p. 743–759, 2009.

SINGH, H. P. et al. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 53, p. 65–73, 2007.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Variations in heavy metal accumulation, growth and yield of rice plants grown at different sewage sludge amendment rates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, p. 632–641, 2010.

SRIVASTAVA, S. Phytofiltration of arsenic from simulated contaminated water using *Hydrilla verticillata* in field conditions. **Ecological Engineering**, Oxford, v. 37, p. 1937–1941, 2011.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Sciences**, Sofia, v. 29, n. 1, p. 87-95, Jan. 2003.

TOPPI, L. S.; GABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, n. 2, p. 105–130, Apr. 1999.

UTHSCSA image tool: image processing and analyses program: version 3.0. San Antonio: University of Texas, 2002. Disponível em: <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

VACULÍK, M. et al. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, Barking, v. 163, p. 117-126, 2012.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANDENABEELE, S. et al. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 45-58, July 2004.

WANG, H. B. et al. The effects of arsenic and induced-phytoextraction methods on photosynthesis in *Pteris* species with different arsenic-accumulating abilities. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 75, p. 298–306, 2012.

ARTIGO 3

**Respostas fisiológicas, anatômicas e da quantidade de DNA de plantas de
Panicum aquaticum cultivadas na presença de chumbo**

RESUMO

O chumbo é considerado um dos metais pesados mais perigosos que poluem o meio ambiente, por isso, novas técnicas para sua remoção são necessárias. Entre essas encontra-se a fitorremediação que utiliza plantas para a remoção de poluentes do solo e da água a baixo custo. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar a fisiologia, a anatomia e a quantidade de DNA de *Panicum aquaticum* submetida à contaminação por Pb. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon em casa de vegetação por 30 dias, sob seis concentrações de Pb: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 mg L⁻¹. Foram realizadas análises de crescimento, de trocas gasosas, da anatomia de folhas e raízes, da atividade enzimática do sistema antioxidante e da quantidade de DNA. As plantas apresentaram aumento da taxa de crescimento relativo, da área foliar específica e da razão de área foliar. As características de trocas gasosas não foram afetadas pela presença de chumbo. A espessura da epiderme, em ambas as faces da epiderme foliar, foi reduzida pela presença do chumbo; a densidade estomática foi reduzida na face adaxial e a funcionalidade estomática aumentou na face abaxial. As raízes mostraram aumento da espessura da exoderme, da endoderme e da proporção de aerênquima no córtex e redução no índice de vulnerabilidade de Carlquist. Das enzimas do sistema antioxidante avaliadas apenas atividade da CAT nas folhas apresentou modificação na presença do metal. A quantidade de DNA não mostrou alterações em quaisquer concentrações de chumbo. O comportamento de *P. aquaticum* diante da contaminação por Pb está relacionado com mecanismos de tolerância sem prejudicar o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como quaisquer sintomas de toxicidade.

Palavras-chave: *Panicum aquaticum*. Chumbo. Fitorremediação. Anatomia. Fisiologia.

ABSTRACT

Lead is considered one of the most hazardous heavy metals that pollute the environment, and new techniques for lead removal from environment are necessary. Among this techniques, phytoremediation uses plants for removal of soil and water pollutants at low cost, This work aimed to evaluate the physiology, anatomy and DNA content of *Panicum aquaticum* subject to Pb contamination. Plants were grown in Hoagland and Arnon nutritive solution at greenhouse for 30 days under six Pb concentrations: 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg L⁻¹. Analysis of growth, gas exchanges, leaves and roots anatomy, enzymatic antioxidant system and DNA content were performed. Plants showed increased relative growth rate, specific leaf area and leaf area ratio. Gas exchange traits are not affect lead. Leaf epidermal thickness on both surfaces were reduced by lead; stomatal density reduced on adaxial surface and leaves showed increased showed functionality on abaxial surface. Roots showed increased thickness of the exodermis, endodermis and proportion of aerenchyma in the cortex and decreased Carlquist vulnerability index. Antioxidant system enzymes only showed increase in leaves CAT activity. DNA content do not showed changes I any lead concentrations. *P. aquaticum* behavior due to lead contamination is related to tolerance mechanisms, with no prejudices to the growth and development of plants, as well as any toxicity symptoms.

Keywords: *Panicum aquaticum*. Lead. Phytoremediation. Ecological Anatomy. Plant Physiology.

1 INTRODUÇÃO

O chumbo, um elemento não essencial às plantas, é considerado um dos mais perigosos metais pesados que poluem o ambiente, sendo originado de várias fontes como atividades de mineração e fundição, queima de carvão, efluentes das industriais, pesticidas e esgoto (EICK et al., 1999).

O acúmulo desse metal no ambiente pode tornar-se perigoso para todos os tipos de organismo, incluindo as plantas (GICHNER; ZNIDAR; SZÁKOVÁ, 2008). Em plantas, o efeito tóxico do chumbo está relacionado ao retardo da germinação, do crescimento e de processos fotossintéticos, inibição da atividade enzimática, desequilíbrio hídrico, alteração na permeabilidade das membranas e distúrbios na nutrição mineral (SHARMA; DUBEY, 2005).

A contaminação por metais pesados pode afetar células e tecidos das plantas. Na raiz, diferentes tecidos agem como barreiras apoplásticas e simplásticas ao transporte do metal, sendo muitas vezes afetadas em condições de estresse (ISLAM et al., 2008). Nos tecidos foliares podem ocorrer modificações a fim de minimizar danos aos tecidos fotossintéticos, assim como controlar a transpiração que está intimamente relacionada à absorção dos metais pela raiz (GOMES et al., 2011).

Danos celulares e ao DNA também podem ocorrer em decorrência de estresse oxidativo provocado pela exposição a metais pesados (BHAT et al., 2011), levando a diversas modificações genotóxicas (ROLDÁN-ARJONA; ARIZA, 2009).

Muitas espécies da família Poaceae são reconhecidamente bem sucedidas em ambientes adversos devido ao seu crescimento rápido, sendo que os diferentes graus de tolerância dependem de fatores genéticos, do estágio de desenvolvimento no qual a planta foi submetida ao estresse, do órgão a ser considerado e da duração e intensidade do estresse (MELO et al., 2007). Nesse

sentido, *Panicum aquaticum*, pertencente à subfamília Panicoideae (Poaceae), possui aspectos favoráveis à fitorremediação, sendo encontrada em brejos, margens de cursos d'água, campos, baixadas, e locais úmidos em margens de estradas (GUGLIERI; LONGHI-WAGNER; ZULOAGA, 2007).

Há uma nítida necessidade de se desenvolver uma tecnologia de baixo custo e que não agrida o meio ambiente, para remover poluentes tanto do solo, quanto do ambiente aquático. A fitorremediação oferece uma alternativa interessante (SOOD et al., 2011).

Sabe-se que algumas plantas de ambiente aquático tem a capacidade de acumular metais pesados da água e dos substratos o que as tornam interessantes na fitorremediação desses locais. Assim, a compreensão dos mecanismos de tolerância dessas plantas aos metais pesados fornece importantes subsídios para a seleção de espécies para essa finalidade (DENG; YE; WONG, 2009).

Desse modo, considerando o crescente interesse com as questões ambientais e o papel que a fitorremediação tem exercido nesse cenário, o presente estudo teve por objetivo avaliar as respostas fisiológicas, anatômicas e a quantidade de DNA da macrófita *P. aquaticum* cultivadas na presença de chumbo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As plantas de *P. aquaticum* foram coletadas em uma lagoa livre de aparentes fontes de contaminação por chumbo, localizada no campus da Universidade Federal de Lavras. Após a coleta, as plantas foram lavadas e selecionadas quanto à sua qualidade fitossanitária e por uniformidade de tamanho. Em seguida levadas para casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, onde foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada, com 40% da força iônica total, juntamente com areia lavada como substrato. Esse período de aclimatização durou o tempo suficiente para obtenção de gerações clonais isentas de qualquer fonte de chumbo endógena.

2.2 Instalação do experimento

As plantas filhas, uniformizadas quanto ao tamanho, foram transferidas para bandejas plásticas com capacidade para 4,0 L. Cada bandeja contendo 2,0 L de areia lavada e 2,0 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) como descrita para a aclimatização com concentrações crescentes de chumbo na forma de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

Os valores das concentrações de Pb utilizados para os diferentes tratamentos foram obtidos com base no valor máximo permitido (VMP) de Pb total para lançamento de efluentes em corpos d'água doce (BRASIL, 2005). Neste caso, o VMP segundo esta legislação é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 1).

O experimento teve duração de 30 dias em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições. A parcela experimental constituiu-se de uma bandeja com três plantas.

Tabela 1 Concentrações de Pb utilizadas no experimento

Tratamento	Concentrações de Pb (mg L ⁻¹)
T1 (Controle)	0,0
T2	0,5
T3	1,0
T4	2,0
T5	4,0
T6	8,0

2.3 Análises de crescimento

Foram selecionadas e coletadas cinco plantas por tratamento em dois tempos: tempo um, no início do experimento e tempo dois, após 30 dias, ao final do experimento. As plantas foram separadas em folha, caule e raiz. Obteve-se a área foliar a partir de fotografias de todas as folhas de cada planta e a mensuração do somatório das áreas dessas folhas foi conseguido, utilizando-se o software de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). Em seguida, todo o material foi colocado em estufa de circulação forçada a 60 °C até peso constante. Os dados de massa seca da folha, caule e raiz foram obtidos em balança analítica.

Utilizou-se os dados de massa seca e área foliar na obtenção das variáveis de crescimento, de acordo com o software proposto por Hunt et al. (2002). As variáveis avaliadas foram: taxa de crescimento relativo (TCR), razão

de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE), taxa assimilatória líquida (TAL) e razão raiz/parte aérea.

2.4 Análises de trocas gasosas

Aos 20 dias de exposição aos tratamentos de chumbo foram avaliadas as características de trocas gasosas das plantas através de um analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA) modelo LCA4-ADC- INSTRUMENTAL. Avaliou-se a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (g_s), a taxa transpiratória (E) e a relação entre carbono interno e externo (C_i/C_a), de uma folha completamente expandida em cada repetição por tratamento. As análises foram realizadas no período da manhã entre 9 e 11 horas.

2.5 Análises anatômicas

Ao final do período experimental, cinco plantas por tratamento foram coletadas, lavadas em água corrente e fixadas em F.A.A._{70%} - (formaldeído, ácido acético glacial p.a. e etanol 70%, na proporção de 0,5: 0,5: 9) por um período de 72 horas e posteriormente conservadas em etanol 70% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Foram realizadas secções paradérmicas e transversais da folha e transversais da raiz. As secções paradérmicas das faces abaxial e adaxial obtidas com lâminas de aço foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de safranina 1,0% (JOHANSEN, 1940). As secções transversais da folha foram retiradas da região mediana contendo a nervura central, sendo obtidas com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. As secções transversais foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de

safrablau (safranina 1,0% e azul de Astra 0,1%, na proporção de 7:3), segundo os métodos descritos por Bukatsch (1972) e Burger e Richter (1991). Nos dois casos, os cortes corados, foram montados com lâmina e lamínula em glicerina 50%.

Para as secções transversais da raiz fragmentos de cerca de 2,0 cm foram removidos da região pilífera da raiz e expostos a uma série etanólica crescente para desidratação do material (70, 80, 90 e 100%) sob vácuo, a temperatura ambiente (JOHANSEN, 1940). Em seguida o material foi imerso em solução de pré-infiltração, composta por etanol 100% e resina base (1:1), segundo as instruções do fabricante (kit Historesina Leica) por 24 horas. Após esse período, prosseguiu-se a infiltração em resina base por mais 24 horas sob vácuo e temperatura ambiente. Para a polimerização utilizou-se o kit Historesina (hidroxietilmetacrilato, Leica, Heidelberg). Os cortes foram feitos em micrótomo de deslizamento na espessura de 5,0 μm , sendo em seguida corados em solução de Azul de Toluidina 1,0% (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As lâminas foram fotografadas em câmera Moticam 2500 acoplada ao microscópio modelo Olympus CX41, sendo as análises realizadas em um software de análise de imagens Image Tool versão 3.0 (UTHSCSA..., 2002). As características anatômicas avaliadas na folha em secção transversal foram: espessura da epiderme na face abaxial (EAB), espessura da epiderme na face adaxial (EAD), espessura do limbo (LM), espessura do parênquima clorofiliano (PC), área do conjunto de células buliformes por campo (ACB), número de conjuntos de células buliformes por mm^{-1} de folha (NCB), distância entre os feixes vasculares (DF), número de feixes vasculares por mm^{-1} de folha (NF), espessura da cutícula (CT) e área de esclerênquima por campo (ECL). Em secção paradérmica foram avaliadas em ambas as faces da epiderme: densidade estomática (DE), índice estomático (IE), diâmetro polar (POL) e equatorial (EQU) dos estômatos e funcionalidade estomática (FUN). Na raiz foram

avaliados: espessura da epiderme (EP), espessura da exoderme (EX), espessura da endoderme (ED), proporção entre a área do cilindro vascular e a área total da raiz (ACAT), proporção de aerênquima no córtex (PAR), espessura do córtex (ECX) e índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC). O IVC foi calculado segundo Carlquist (1975), as proporção de aerênquima segundo Pereira et al. (2008) e a DE e o IE segundo Castro, Pereira e Paiva (2009).

2.6 Análises do sistema antioxidante enzimático

Ao término do experimento, amostras de folhas e raízes foram coletadas no período da manhã e armazenadas em nitrogênio líquido e preservadas em freezer -80°C até a data das análises.

Para a extração enzimática foram utilizadas 0,2 g de folhas e de raízes maceradas em nitrogênio líquido com adição de 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15,0 µL de EDTA 0,1 M (pH 7,0), ácido ascórbico 0,001 M e 12,0 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nos ensaios enzimáticos da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 10,0 µL do extrato enzimático a 190,0 µL do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50,0 mM (pH 7,8), metionina 14,0 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75,0 µM e riboflavina 2,0 µM. A placa de acrílico UV, contendo o meio de incubação mais amostra, foi iluminada com lâmpada fluorescente de 20 W por 10 minutos. Para o

controle utilizou-se o mesmo meio de reação sem a amostra, que foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro ELISA e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem extrato enzimático}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da enzima CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 10,0 μL do extrato enzimático foi adicionada a 190,0 μL do meio de incubação contendo 100,0 μL de fosfato de potássio 200,0 mM (pH 7,0) e 10,0 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio através do espectrofotômetro de ELISA. O coeficiente de extinção molar utilizado foi 36 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para 18 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 10,0 μL do extrato enzimático foi adicionada a 190,0 μL de tampão de incubação composto por 100,0 μL de fosfato de potássio 200,0 mM (pH 7,0), 10,0 μL de ácido ascórbico 10,0 mM e 10,0 μL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ corrigido para 1,4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da placa UV possuem 0,5 cm de comprimento.

2.7 Citometria de fluxo

Para quantificação do conteúdo de DNA foram utilizadas cinco folhas jovens de *P. aquaticum* por tratamento. Para a análise de citometria de fluxo, as

mostras de *P. aquaticum*, juntamente com o padrão de referência (*Pisum sativum*) foram dissociadas com auxílio de um bisturi em uma placa de petri, (GALBRAITH et al., 1983), sob gelo triturado, contendo 1,0 mL de tampão de extração LB01 gelado, para a liberação dos núcleos (DOLEŽEL et al., 1989). A suspensão obtida foi filtrada em uma malha de náilon de 50,0 μm e corada com 25,0 μL de iodeto de propídeo ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) acrescentando-se, em seguida, 5 μL de RNase do tipo I e, finalmente, armazenadas em tubos de poliestireno no escuro e refrigeradas até o momento da análise em citômetro Facs Callibur 4 cores. Os histogramas foram obtidos pelo programa Cell Quest e analisados no programa WinMDI 2.8 (2009).

O conteúdo de DNA nuclear (pg) das plantas foi estimado através da razão entre as intensidades de fluorescência dos núcleos G1 (núcleos que estão na fase G1 da interfase) do padrão de referência e dos núcleos G1 da amostra, multiplicando-se esta razão pela quantidade de DNA do padrão de referência (9,09 pg).

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, em seguida, submetidos à análise de variância e a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott para $P < 0,05$ ou regressão com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2007).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferentes concentrações de chumbo afetaram de modo significativo a maioria das variáveis de análise de crescimento verificadas em dois tempos, com exceção da razão raiz/parte aérea ($F_c = 1,658$ e $P = 0,1831$), com média de $0,94 \text{ g g}^{-1}$ e da taxa assimilatória líquida ($F_c = 2,167$ e $P = 0,0918$), com média de $0,000006 \text{ mm}^{-2}\text{dia}^{-1}$. A taxa de crescimento relativo (TCR) e a área foliar específica (AFE) demonstraram um progressivo aumento na presença do metal. De modo semelhante, a razão de área foliar (RAF) exibiu uma tendência a um aumento em função das crescentes concentrações de chumbo (Figura 1).

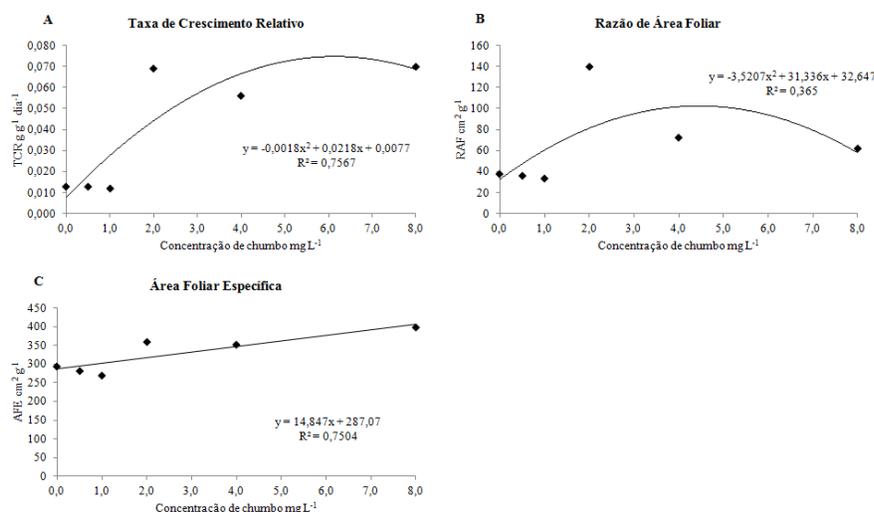


Figura 1 Análises de Crescimento de plantas de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo. A= Taxa de Crescimento relativo, B= Razão de Área Foliar, C= Área Foliar Específica.

O crescimento desempenhado pela planta está correlacionado ao seu potencial fitorremediador, regido pela capacidade acumuladora (YADAV et al., 2009). Contrariando vários autores que verificaram uma redução no crescimento de outras espécies causada pelo estresse por chumbo, (SHU et al., 2011; SINGH

et al., 2010), *P. aquaticum* demonstrou tolerância ao metal, com um aumento da TCR nas plantas sob estresse. Segundo Faquin (2005) o chumbo absorvido se acumula nas paredes, notadamente das raízes, contribuindo para uma diminuição do seu efeito tóxico na planta. A relação raiz/parte aérea comprova a ausência de efeito do metal sobre a alocação de biomassa. De modo diferente, Xiong (1998), encontrou uma baixa relação raiz/parte aérea em *Brassica pekinensis*, na presença de chumbo.

As diferentes concentrações de chumbo não afetaram significativamente a taxa transpiratória ($F_c = 1,706$ e $P = 0,1716$), com média de $0,02 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a condutância estomática ($F_c = 1,095$ e $P = 0,3887$), com média de $0,79 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a taxa fotossintética ($F_c = 0,802$ e $P = 0,5591$), com média de $0,05 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e relação C_i/C_a ($F_c = 0,511$ e $P = 0,7650$), com média de $0,54$.

A fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais afetados pelos efeitos tóxicos do chumbo, (AHMAD et al., 2011), porém no caso de *P. aquaticum* esse efeito tóxico não foi observado. Isso, provavelmente, é um indício de tolerância da espécie, sendo coerente com os resultados relatados para TAL. Além disso, sabe-se que uma das formas de inibição da fotossíntese se dá por meio da indução de estresse oxidativo através da produção de EROs na presença de chumbo (ISLAM et al., 2008). Assim, pode-se inferir que o sistema antioxidante foi capaz de impedir os danos causados por EROs. O aumento da RAF e da AFE pode também estar relacionado a um mecanismo de manutenção da fotossíntese sob concentrações mais elevadas de chumbo.

P. aquaticum apresentou epiderme foliar unisseriada, com conjuntos de células buliformes em sua face adaxial; estômatos em alteres e distribuídos nas duas faces da epiderme (folha anfiestomática) e papilas na face adaxial; clorênquima compacto e radiado em torno dos feixes vasculares caracterizando uma estrutura Kranz, estando de acordo com a descrição realizada por Guglieri, Longhi-Wagner e Zuloaga (2007).

A espessura da epiderme na face abaxial (EAB) apresentou um aumento apenas na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, ao passo que a espessura da epiderme na face adaxial (EAD) sofreu uma redução a partir da concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ promoveu um aumento na área de esclerênquima (ECL). Em relação à espessura do limbo (LM), do parênquima clorofiliano (PC), à área (ACB) e número (NCB) dos conjuntos de células buliformes, à distância (DF) e número (NF) de feixes vasculares e à espessura da cutícula (CT) não foram observados efeitos significativos dos tratamentos (Figura 2 e Tabela 2).

Condicionada à plasticidade anatômica algumas espécies desenvolvem modificações nos tecidos foliares que permitem uma melhor adaptação às diferentes condições de estresse (MELO et al., 2007). As modificações observadas na espessura da face abaxial e adaxial da epiderme na presença do metal não alteraram negativamente as trocas gasosas, podendo até mesmo ter favorecido a manutenção da fotossíntese. Além disso, a falta de alteração na espessura do limbo do parênquima clorofiliano foi favorável ao armazenamento de CO_2 captado pelos estômatos (PEREIRA, 2010), permitindo a manutenção da relação C_i/C_a ao longo dos tratamentos.

A modificação no esclerênquima da folha pode ser decorrente de um mecanismo de tolerância, no qual o metal pode ser adsorvido nas paredes celulares como forma de prevenir a sua translocação para os tecidos fotossintéticos (GOMES et al., 2011). Nas concentrações mais elevadas essa estratégia pode não ter sido necessária, se outros mecanismos da planta tiverem minimizado a translocação para a parte aérea, como o espessamento de barreiras apoplásticas na raiz.

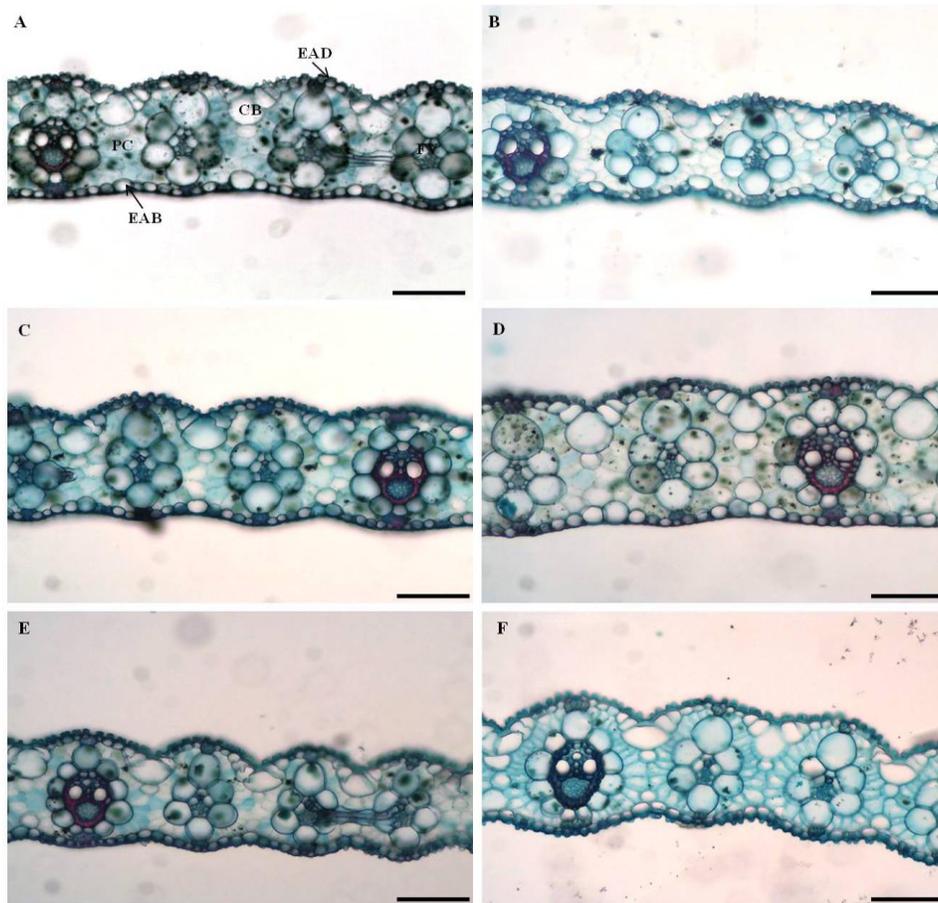


Figura 2 Secções transversais de folhas de *Panicum aquaticum* submetidas a crescentes concentrações de chumbo. EAD= epiderme face adaxial, EAB= epiderme face abaxial, PC= parênquima clorofiliano, CB= células buliformes, FV= feixe vascular. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,50 mg L⁻¹, C= 1,00 mg L⁻¹, D= 2,00 mg L⁻¹, E= 4,00 mg L⁻¹, F= 8,00 mg L⁻¹. Barras= 100 µm.

Tabela 2 Características dos tecidos foliares em secção transversal de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo (mg L^{-1})

Pb mg L^{-1}	EAB (μm)	EAD (μm)	LM (μm)	PC (μm)	ACB (μm^2)	NCB	DF (μm)	NF	CT (μm)	ECL (μm^2)
0,00	12,63 b	11,18 a	179,98 a	137,97 a	2623,53 a	11 a	69,09 a	11 a	5,16 a	1465,69 b
0,50	13,86 a	11,58 a	186,22 a	143,84 a	2569,50 a	09 a	67,72 a	10 a	5,37 a	1850,49 a
1,00	12,85 b	10,98 b	177,43 a	133,17 a	2362,33 a	10 a	63,56 a	11 a	5,09 a	1367,51 b
2,00	12,81 b	10,45 b	188,83 a	144,56 a	2813,95 a	09 a	69,03 a	10 a	5,29 a	1590,83 b
4,00	12,17 b	09,95 b	175,79 a	133,94 a	2410,63 a	10 a	64,68 a	10 a	5,05 a	1502,27 b
8,00	11,90 b	10,06 b	184,62 a	138,67 a	2439,56 a	10 a	57,83 a	11 a	5,51 a	1484,99 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EAB= espessura da epiderme da face abaxial, EAD= espessura da epiderme da face adaxial, LM= espessura do limbo, PC= espessura do parênquima clorofiliano, ACB= área de conjunto de células buliformes por campo, NCB= número de conjunto de células buliformes (por mm^{-1} de folha), DF= distância entre os feixes vasculares, NF= número de feixes vasculares (por mm^{-1} de folha), CT= espessura da cutícula, ECL= área de esclerênquima.

Em relação às características analisadas em secção paradérmica, *P. aquaticum* demonstrou influência significativa da presença de chumbo, com exceção da funcionalidade estomática (FUN) na face adaxial ($F_c = 1,116$ e $P = 0,3544$). Na face abaxial a densidade estomática (DE) apresentou maiores médias nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg L^{-1} . Houve uma redução nas médias referentes ao índice estomático (IE) a partir da concentração de 2,0 mg L^{-1} . De modo oposto, o diâmetro polar (POL) e equatorial (EQU) evidenciou um aumento a partir dessa mesma concentração. A FUN apresentou um aumento à medida que as concentrações do metal ficaram maiores (Figura 3 e Tabela 3).

Na face adaxial houve uma tendência à redução na DE, assim como no IE na presença de chumbo. Já as plantas submetidas a 2,0 e 4,0 mg L^{-1} de chumbo exibiram um aumento nas médias de POL e EQU (Figura 3 e Tabela 3).

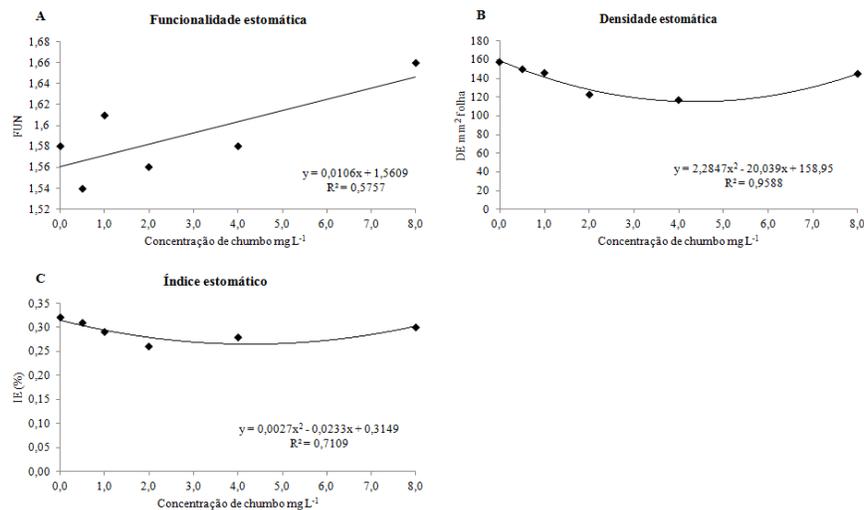


Figura 3 Funcionalidade estomática (relação POL/EQU) da epiderme na face abaxial (A), densidade estomática (B) e índice estomático (C) da epiderme na face adaxial de plantas de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo.

Tabela 3 Características da epiderme foliar em secção paradérmica de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo (mg L^{-1})

FACE ABAXIAL				
Pb mg L^{-1}	DE	IE (%)	POL (μm)	EQU (μm)
0,00	85 b	0,27 a	34,61 b	22,00 b
0,50	96 a	0,27 a	33,92 b	22,13 b
1,00	97 a	0,27 a	34,84 b	21,78 b
2,00	84 b	0,26 b	36,91 a	23,79 a
4,00	81 b	0,25 b	37,49 a	23,77 a
8,00	82 b	0,25 b	38,37 a	23,98 a
FACE ADAXIAL				
Pb mg L^{-1}	POL (μm)	EQU (μm)	FUN	
0,00	29,62 b	19,74 b	1,50 a	
0,50	30,11 b	19,59 b	1,54 a	
1,00	30,06 b	18,91 c	1,59 a	
2,00	32,52 a	21,37 a	1,53 a	
4,00	32,32 a	20,98 a	1,54 a	
8,00	30,43 b	19,90 b	1,53 a	

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, %). DE= densidade estomática (por mm^2 de folha), IE= índice estomático, POL= diâmetro polar dos estômatos, EQU= diâmetro equatorial dos estômatos, FUN= funcionalidade estomática (relação POL/EQU).

A toxicidade do chumbo pode afetar a absorção de CO₂, (AZMAT et al., 2009). No entanto, o aumento na DE e na FUN na face abaxial da epiderme em *P. aquaticum* na presença desse metal, pode ter favorecido a captação de CO₂ pelo aumento no número de estômatos por área foliar e maior funcionalidade dos mesmos (PEREIRA, 2010). Esse resultado, provavelmente, permitiu a manutenção da relação Ci/Ca e da taxa fotossintética. Por outro lado, a redução no IE e da DE na face adaxial parece não ter afetado as trocas gasosas e a fotossíntese.

A epiderme radicular de *P. aquaticum* é uniestratificada, formada por células de paredes delgadas; a exoderme é formada por células de paredes espessadas e a endoderme é unisseriada. As plantas apresentaram, ainda, aerênquimas em seu córtex, neste caso constitutivo.

A anatomia radicular foi alterada significativamente em função da presença de chumbo na maioria das características analisadas. A espessura da exoderme (EX) apresentou tendência ao aumento na presença de maior concentração de chumbo. Nas duas maiores concentrações do metal verificou-se um aumento significativo na espessura da endoderme (ED). A proporção de aerênquima no córtex (PAR) apresentou um acréscimo ao longo das diferentes concentrações de chumbo. Os valores para o índice de vulnerabilidade de Carlquist (IVC) sofreram uma redução na presença do metal. Por outro lado, a espessura da epiderme (EP), a proporção entre a área do cilindro vascular e a área total da raiz (ACAT) e a espessura da exoderme (ECX) não sofreram modificações significativas em função das diferentes concentrações do metal (Figura 4, 5 e 6 e Tabela 4).

Tem sido relatado que o chumbo é desigualmente distribuído nas raízes, onde diferentes tecidos agem como barreiras apoplásticas e simplásticas ao transporte desse metal e que, portanto, fica restrito (ISLAM et al., 2008; TRIVEDI; ERDEI, 1992). O espessamento da endoderme e exoderme

observado, provavelmente, representa uma estratégia da planta para minimizar a translocação de chumbo para parte aérea. De acordo com Lux et al. (2004) altas proporções da endoderme e exoderme caracterizam elevada tolerância aos metais pesados. Além disso, o espessamento das paredes das células na raiz fornece uma maior área para a retenção de metais pesados, diminuindo sua translocação para a parte aérea (GOMES et al., 2011). Assim como verificado em aguapé por Pereira (2010), a espessura da epiderme não sofreu efeitos do chumbo, demonstrando que as concentrações aplicadas não causaram efeito tóxico, uma vez que esse tecido é o primeiro a entrar em contato com o metal (PEREIRA, 2010).

A formação de aerênquimas é uma característica comum às plantas de ambientes alagados, funcionando como uma estratégia alternativa para a obtenção de O₂ (DREW; HE; MORGAN, 2000). Um aumento na proporção de aerênquima no córtex de raízes de *P. aquaticum* na presença de chumbo, provavelmente, indica uma estratégia de tolerância ao metal, fornecendo maior área disponível para reserva de O₂.

De um modo geral a redução do IVC evidencia uma plasticidade do sistema vascular, a fim de aumentar sua eficiência sob condições de estresse (PEREIRA, 2010).

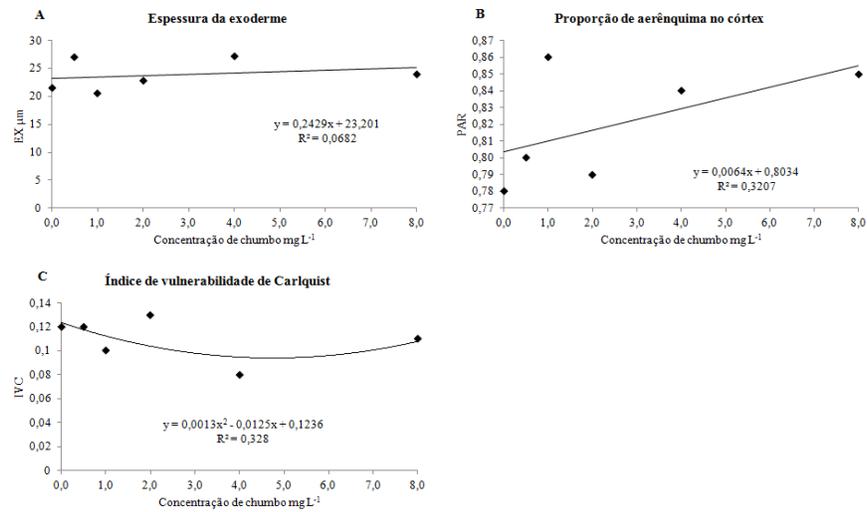


Figura 4 Espessura da exoderme (A), proporção de aerênquima no córtex (B) e índice de vulnerabilidade de Carlquist (C) de plantas de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo.

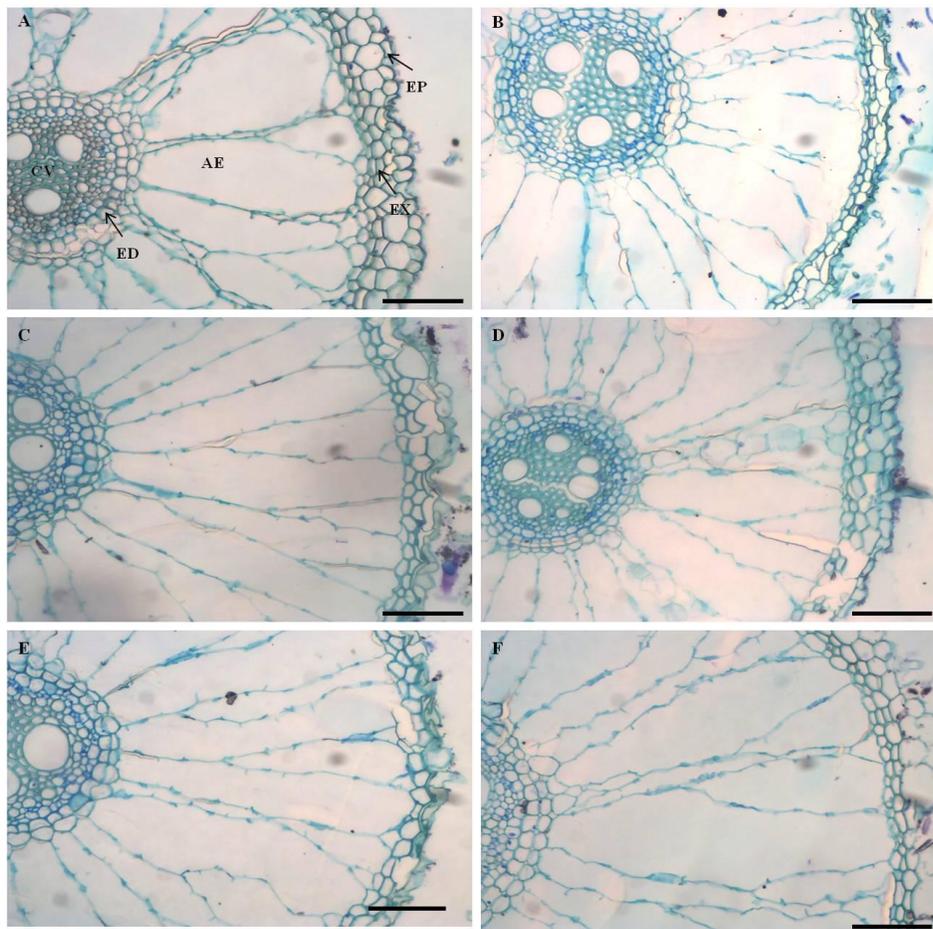


Figura 5 Secções transversais de raízes de *Panicum aquaticum* submetidas a crescentes concentrações de chumbo. EP= epiderme, EX= exoderme, ED= endoderme, AE= aerênquima, CV= cilindro vascular. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,50 mg L⁻¹, C= 1,00 mg L⁻¹, D= 2,00 mg L⁻¹, E= 4,00 mg L⁻¹, F= 8,00 mg L⁻¹. Barras= 100 μm.

Tabela 4 Características dos tecidos radiculares em secção transversal de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo (mg L^{-1})

Pb mg L^{-1}	EP (μm)	ED (μm)	ACAT	ECX (μm)
0,00	45,24 a	13,07 b	0,04 a	362,52 a
0,50	42,98 a	14,13 b	0,09 a	368,69 a
1,00	40,86 a	13,33 b	0,06 a	389,16 a
2,00	44,42 a	13,40 b	0,05 a	374,69 a
4,00	49,26 a	14,96 a	0,06 a	408,10 a
8,00	46,65 a	16,09 a	0,06 a	424,65 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%). EP= espessura da epiderme, EX= espessura da exoderme, ED= espessura da endoderme, ACAT= proporção entre a área do cilindro vascular e área total, PAR= proporção de aerênquima no córtex, ECX= espessura do córtex, IVC= índice de vulnerabilidade de Carlquist.

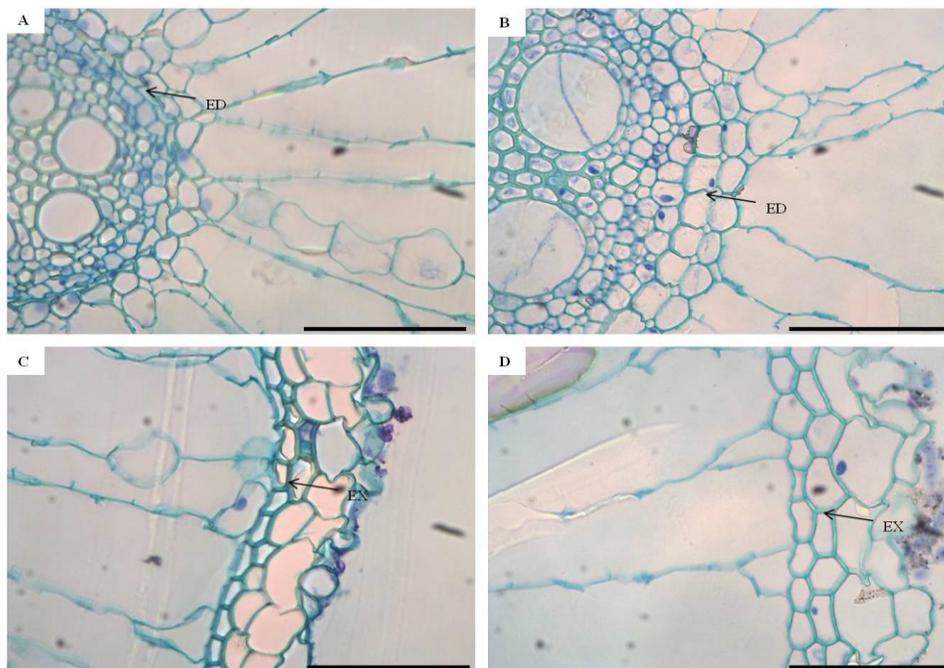


Figura 6 Detalhe da endoderme (A e B) e exoderme (C e D) da raiz de *Panicum aquaticum* sob contaminação por chumbo. A e C= 0,0 mg L⁻¹; B e D= 4,0 mg L⁻¹. Barras= 100 μm.

A presença do chumbo promoveu respostas diferenciadas entre as enzimas do sistema antioxidante de *P. aquaticum*. Apenas a atividade da catalase (CAT) na folha foi significativamente influenciada pelos tratamentos. Neste caso, a CAT apresentou um aumento em sua atividade até a concentração de 4,0 mg L⁻¹, sendo que a partir desse ponto observou-se uma queda na atividade (Figura 7). A atividade da peroxidase do ascorbato na folha (Fc= 2,095 e P= 0,1364) e na raiz (Fc= 0,269 e P= 0,8865), da CAT na raiz (Fc= 0,757 e P= 0,5971) e da dismutase do íon superóxido na folha (Fc= 1,747 e P= 0,1985) e na raiz (Fc= 1,003 e P= 0,4567) não foi afetada pelos tratamentos.

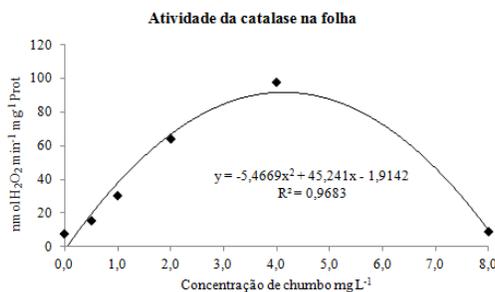


Figura 7 Atividade catalase em folhas de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo.

Um dos efeitos fitotóxicos do chumbo parece ser a indução de estresse oxidativo através da formação de EROs (SHARMA; DUBEY, 2005). As EROs produzidas causam uma variedade de efeitos nocivos nas células vegetais, tais como a inibição da atividade fotossintética, a inibição da produção de ATP, peroxidação lipídica e danos no DNA (RULEY et al., 2004). Nesse sentido, a atividade das enzimas do sistema antioxidante, principalmente CAT na folha desempenhou um papel fundamental nos mecanismos de tolerância apresentados por *P. aquaticum* na presença de chumbo, uma vez que nenhum efeito danoso das EROs foi detectado.

Considerando que a atividade da SOD e da APX não foi modificada ao longo dos tratamentos, infere-se que a eliminação das EROs foi mais eficiente pela atividade da CAT. Entretanto, a redução da atividade da CAT a partir da concentração de 4,0 mg L⁻¹ sugere que o estresse oxidativo pode ter ultrapassado a capacidade de controle de EROs pela CAT promovendo uma inibição por quantidade limitada da enzima disponível ou por inibição de sua síntese (OLIVEIRA, 2010). A ausência de detecção de danos em função das EROs mesmo nas maiores concentrações de chumbo sugere a participação de outros componentes do sistema antioxidante.

Em relação à quantidade de DNA de *P. aquaticum*, a análise de citometria de fluxo não demonstrou efeito significativo da presença de chumbo entre os tratamentos (Tabela 5 e Figura 8).

Tabela 5 Quantidade de 2C de DNA e coeficiente de variação obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo para *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo (mg L^{-1})

Pb mg L^{-1}	DNA (pg)	CV (%)
0,00	3,80 ^a	0,67
0,50	3,80 ^a	0,65
1,00	3,20 ^a	0,61
2,00	3,60 ^a	0,63
4,00	2,80 ^a	0,71
8,00	3,00 ^a	0,66

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si (Scott-Knott, 5%).

Sabe-se que o estresse oxidativo decorrente da exposição a metais pesados causa danos celulares, inclusive ao DNA (BHAT et al., 2011). Por outro lado, a extensão dos danos citotóxicos induzidos por EROs, em última análise, depende do equilíbrio entre mecanismos de produção e desintoxicação da célula (ROLDÁN-ARJONA; ARIZA, 2009). O fato, de não ter sido observado efeito do metal na quantidade de DNA analisada por citometria de fluxo, fornece mais uma evidência da eficiência do sistema antioxidante, corroborando a hipótese de tolerância de *P. aquaticum* ao chumbo.

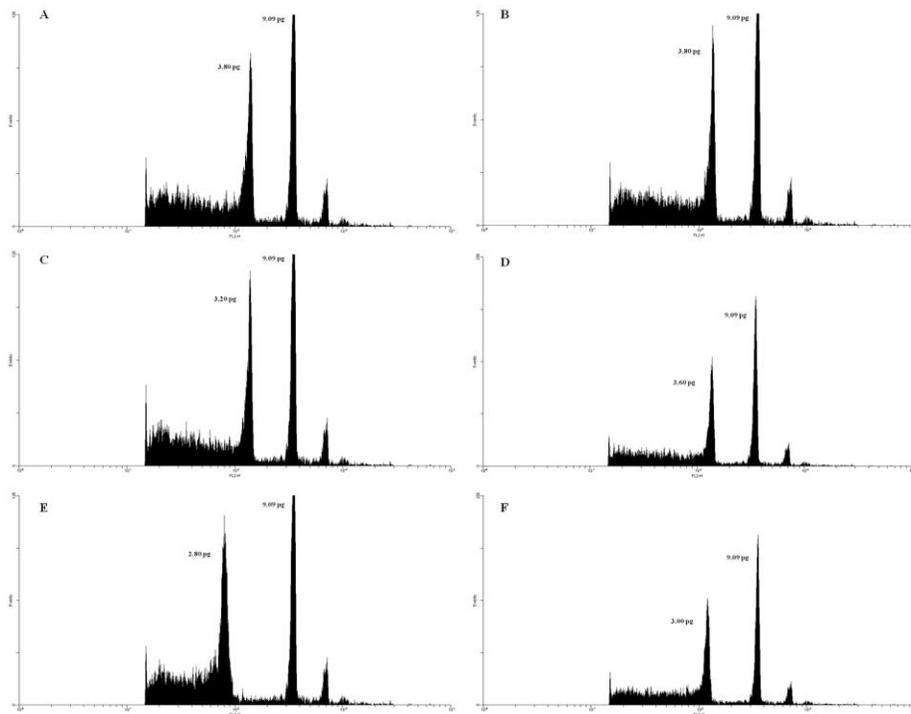


Figura 8 Histogramas de citometria de fluxo em núcleos de *Panicum aquaticum* sob concentrações crescentes de chumbo. A= 0,0 mg L⁻¹, B= 0,50 mg L⁻¹, C= 1,00 mg L⁻¹, D= 2,00 mg L⁻¹, E= 4,00 mg L⁻¹, F= 8,00 mg L⁻¹. As barras indicam o erro padrão. O primeiro pico em cada histograma é referente ao pico G1 das plantas de cada tratamento e o segundo pico G1 é da amostra de referência. Eixo das abscissas representa a quantidade de DNA e o das ordenadas, o número de núcleos.

De acordo com Marie e Brown (1993) o coeficiente de variação (CV) é um critério elementar na validação de métodos citológicos e definem uma gama de valores entre 1 e 2% para análises de alta qualidade e 3% como um valor de rotina. Por sua vez Galbraith et al. (1983) estabeleceram um CV <5 % como critério de aceitação. Desse modo os CVs observados nas análises de citometria em *P. aquaticum* podem ser considerados confiáveis.

5 CONCLUSÃO

O aumento na taxa de crescimento relativo das plantas, na área foliar específica e na razão de área foliar, assim como a manutenção da fotossíntese e da quantidade de DNA são evidências de não toxicidade do chumbo.

Além disso, o aumento na espessura das barreiras apoplásticas constitui uma característica fundamental de plasticidade e associado ao comportamento do sistema antioxidante, favorece a tolerância dessa espécie ao estresse por chumbo.

Desse modo, as respostas de *P. aquaticum* demonstram que a espécie sofre modificações favoráveis à tolerância ao metal nas concentrações avaliadas, sem prejuízo ao seu crescimento e desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. S. A. et al. Lead (Pb)-Induced regulation of growth, photosynthesis, and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants at early growth stages. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 144, p. 1229–1239, 2011.

AZMAT, R. et al. A viable alternative mechanism in adapting the plants to heavy metal environment. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 41, n. 6, p. 2729-2738, 2009.

BHAT, T. M. et al. **Synergistic cytotoxic stress and DNA damage in clover (*Trifolium repens*) exposed to heavymetal soil from automobile refining shops in Kashmir-Himalaya**. Disponível em: <<http://www.isrn.com/journals/toxicology/2011/109092/>>. Acesso em: 23 nov. 2011.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeratio following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Minneápolis, v.116, p. 651-658, 1998.

BRASIL. Congresso. Senado Federal. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Coleção de Leis da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 2005.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfarbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.

CARLQUIST, S. **Ecological strategies of xylem evolution**. Berkeley: University of California, 1975. 259 p.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.

DENG, H.; YE Z. H.; WONG, M. H. Lead, zinc and iron (Fe^{2+}) tolerances in wetland plants and relation to root anatomy and spatial pattern of ROL. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, p. 353–362, 2009.

DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 123-127, 2000.

DOLEŽEL, J.; BINAROVÁ, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 31, p. 113–120, 1989.

EICK, M. J. Kinetics of lead adsorption and desorption on goethite: residence time effect. **Soil Science**, Madison, v. 164, p. 28–39, 1999.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras; UFLA/FAEPE, 2005, 182 p.

FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 123-142, 1968.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.0**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2007.

GALBRAITH, D.W. et al. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. **Science**, Washington, v. 220, p. 1049-1051, 1983.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 59, p. 309-314, 1977.

GICHNER, T.; ZNIDAR, I.; SZ ÁKOVÁ, J. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 652, p. 186–190, 2008.

GOMES, M. P. et al. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 566-573, Sept./Oct. 2011.

GUGLIERI, A.; LONGHI-WAGNER H.M.; ZULOAGA, F. O. Panicum Sect. *Dichotomiflora* (Hitc. & Chase) Honda e P. sect. *Virgata Hitchc. & Chase* ex Pilg. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 21, n. 4, p. 785-805, 2007.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 450-455, 1987.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Califórnia: Califórnia Agricultural Experimental Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

HUNT, R. et al. A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 485-488, 2002.

ISLAM, E. et al. Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.154, p. 914–926, 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997.

LUX, A. A. et al. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity.

Physiologia Plantarum, Copenhagen, v.120, p. 537-545, 2004.

MARIE, D.; BROWN, S. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. **Biology of the Cell**, Paris, v. 78, p. 41-51, 1993.

MELO, H.C. et al. Anatomical and physiological alterations in *Setaria anceps* Stapf ex Massey and *Paspalum paniculatum* L. under water deficit conditions. **Hoehnea**, São Paulo, v. 34 p. 145-153, 2007.

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

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio.** 2010. 171 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PEREIRA, F. J. **Características anatômicas e fisiológicas de aguapé e índice de fitorremediação de alface d'água cultivados na presença de arsênio, cádmio e chumbo.** 2010. 116 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 12, p.1649-1656, 2008.

ROLDÁN-ARJONA, T.; ARIZA, R. R. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 681, p. 169-179, 2009.

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

SHU, X. et al. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzymeactivities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. 2011. Disponível em: <<http://sourcedb.wbg.cas.cn/zw/rck/200907/W020120112369123902425.pdf>>. Acesso em: 21 nov. 2011.

SINGH, R. et al. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 3025–3032, 2010.

SOOD, A. et al. **Phytoremediation potential of aquatic macrophyte, Azolla**. 2011. Disponível em: <<http://resources.metapress.com/pdf-preview.axd?code=k46651g86741x4q0&size=largest>>. Acesso em: 21 out. 2011.

TRIVEDI, S.; ERDEI, L. Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca^{2+} and K^{+} and on the influx and translocation of K^{+} in wheat of low and high K^{+} status. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 84, p. 94–100, 1992.

UTHSCSA image tool: image processing and analyses program: version 3.0. San Antonio: University of Texas, 2002. Disponível em: <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>>. Acesso em: 30 jan. 2012.

XIONG, Z. T. Lead Uptake and Effects on Seed Germination and Plant Growth in a Pb Hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 60, p. 285–290, 1998.

YADAV, S. K. et al. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, Chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 4616–4622, 2009.