



ALEJANDRO SANDRIA DÍAZ

**FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA RADICULAR E REDUÇÃO
DA TOXICIDADE PELO CÁDMIO EM PLANTAS DE MILHO
SARACURA SUBMETIDAS AO ÓXIDO NÍTRICO**

**LAVRAS – MG
2021**

ALEJANDRO SANDRIA DÍAZ

**FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA RADICULAR E REDUÇÃO DA TOXICIDADE
PELO CÁDMIO EM PLANTAS DE MILHO SARACURA SUBMETIDAS AO ÓXIDO
NÍTRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Fabrício José Pereira
Orientador

Dr. Evaristo Castro Mauro de Castro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Díaz, Alejandro Sandria.

Formação de aerênquima radicular e redução da toxicidade pelo cádmio em plantas de milho saracura submetidas ao óxido nítrico / Alejandro Sandria Díaz. – 2021.

97 p. : il.

Orientador: Fabrício José Pereira.

Coorientador: Evaristo de Mauro Castro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Anatomia vegetal. 2. Nitroprussiato de sódio. 3. Metal pesado. I. Pereira, Fabrício José. II. Evaristo de Mauro Castro. III. Título.

ALEJANDRO SANDRIA DÍAZ

**FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA RADICULAR E REDUÇÃO DA TOXICIDADE
PELO CÁDMIO EM PLANTAS DE MILHO SARACURA SUBMETIDAS AO ÓXIDO
NÍTRICO**

**FORMATION OF ROOT AERENCHYMA AND REDUCTION OF CADMIUM
TOXICITY IN SARACURA CORN PLANTS SUBMITTED TO NITRIC OXIDE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 12 de fevereiro de 2021.

Dra. Luzimar Campos da Silva	UFV
Dr. Vinícius Politi Duarte	UNIFEI
Dra. Cynthia de Oliveira	UFLA
Dra. Emanuella Garbin Martinazzo Aumonde	FURG

Dr. Fabrício José Pereira
Orientador

Dr. Evaristo de Mauro Castro
Coorientador

**LAVRAS – MG
2021**

À minha mãe Agueda Díaz Luis, por fazer de mim uma pessoa de bem, ser minha força, exemplo e inspiração para cumprir com meus objetivos de vida.

Aos meus sobrinhos, Alexón Zaid e Iker Yadiel, por serem a força de minha vida em cada dia.

Ao meu pai biológico Alberto Sandria Barradas † sei que ficaria orgulhoso de mim e, ao meu pai adotivo Enrique Romero, pela paciência e ensino.

Ao meu irmão Omar Romero Díaz, pela amizade e apoio.

Obrigado por serem parte de minha vida.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CONACYT), pela confiança de permitir-me a concessão da bolsa para lograr este objetivo de vida.

À Universidade Federal de Lavras / Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada (PPGBA), pela oportunidade e possibilidade de realização da formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos, ao Programa de Pós-Graduação e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento das análises nutricionais.

Aos Departamentos de Botânica Aplicada e Departamento de Fisiologia Vegetal – (UFLA), pela facilitação no uso dos laboratórios para a execução das análises da pesquisa.

Ao Dr. Fabricio José Pereira, pela orientação, paciência e ensinamentos fundamentais para a minha formação.

Ao Dr. Evaristo Mauro de Castro, pelas orientações e oportunidade concedida para formar parte dos doutorandos em Botânica Aplicada.

Aos amigos-integrantes do time de pesquisa, Yasmini Cruz Da Cunha (Doutoranda em Botânica Aplicada), Marcio Paulo Pereira e Vinícius Politi Duarte (Pós-doutorados em Botânica Aplicada) pela importante colaboração na execução do projeto de pesquisa.

À minha família - amigos estrangeiros: Adí Lazos (México), Marileydy Martínez (México), Santiago Villafuerte (Equador), Daniela Jiménez (Costa Rica), Carla de Pina, Lidiane Lopes, Anneth Varela, João Cesar, Alector Santos (Cabo Verde - África), Mónica Obregón, Fabio Tarazona (Colômbia), por nossa amizade que nos tornou uma família estrangeira. E a todos os amigos estrangeiros estudantes da UFLA e amigos brasileiros.

À minha família - amigos brasileiros: Diego Carvalho (pelos aprendizados), Veluma Santana (pela amizade e guia holística), Cleusa Santana (pelo carinho e amor incondicional), Dayanne Medrade (pela amizade e ajuda incondicional), Glória Medrade (pelo carinho e amor incondicional), Graciele Lurdes (pela amizade), César Santos (pela amizade), Wedem Sales (pelas correções de Português).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a formação de aerênquima radicular e redução da toxicidade pelo cádmio em plantas de milho saracura submetidas ao óxido nítrico. Plantas de milho Saracura foram submetidas a alagamento por 30 dias. Semanalmente, foram aplicados solução de nitrato de cádmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ a 0; 10 μM ; 50 μM , e nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como doador de óxido nítrico (NO) a 0,5 μM ; 0,1 μM ; 0,2 μM . Foram analisadas a biometria das raízes, indicadores de estresse oxidativo peróxido de hidrogênio H_2O_2 e malondialdeído MDA, enzimas do sistema antioxidante catalase-hidroperoxidase CAT, superóxido dismutase SOD, ascorbato peroxidase APX, além de análises anatômicas radiculares, análise de crescimento, trocas gasosas e análises anatômicas foliares. Lâminas semipermanentes com cortes transversais radiculares e região mediana da folha, seções paradérmicas da folha, foram confeccionadas e submetidas aos procedimentos usuais de microtécnica vegetal. As lâminas foram observadas em microscópio óptico com sistema de captura de imagens acoplado, as fotomicrografias foram analisadas no software UTHSCSA-ImageTool. Os parâmetros avaliados foram: espessura da epiderme, espessura do córtex, proporção do córtex, espessura da endoderme, diâmetro de vasos de xilema e proporção do cilindro vascular, área e espessura do mesofilo, espessura da epiderme abaxial e adaxial, área do feixe vascular, diâmetro dos vasos do xilema, diâmetro polar e equatorial dos estômatos, funcionalidade dos estômatos, densidade estomática, índice estomático e densidade das células estomáticas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott para $p < 0,05$. Contudo, apenas a massa fresca teve interação entre os tratamentos. Embora os indicadores de estresse oxidativo H_2O_2 não tivessem interação, observou-se uma queda gradual em maiores concentrações de NO, no entanto MDA apresentou interação nas concentrações de Cd. Na atividade de enzimas antioxidantes, a SOD reduziu em maiores concentrações de NO, enquanto a CAT observou-se interação nos tratamentos de Cd e NO. Nas análises anatômicas radiculares, o aerênquima cortical radicular, espessura da epiderme, espessura do córtex, proporção do córtex, espessura da endoderme, diâmetro de vasos de xilema e proporção do cilindro vascular apresentaram interação entre os tratamentos de Cd e NO, no entanto maiores concentrações de Cd e NO reduziram a massa seca total, massa seca da folha e do caule, porém a alocação de biomassa de raiz aumentou. Houve aumento das trocas gasosas em maiores concentrações de Cd e NO, entretanto, em menores concentrações de Cd e NO, observou-se aumento das variáveis anatômicas analisadas, porém, em maiores concentrações, essas variáveis foram reduzidas. Por conseguinte, o NO desenvolveu um papel como molécula antagônica ao Cd, diminuiu a concentração de H_2O_2 , por meio da redução da atividade da SOD e o aumento da CAT. O H_2O_2 está diretamente ligado à formação de aerênquima. Contudo o NO em baixas concentrações diminuiu a toxicidade do Cd e atribuíram-se às plantas de milho saracura características fisiológicas e anatômicas semelhantes às plantas tolerantes ao Cd. Maiores concentrações de NO podem contribuir a efeitos negativos ou toxidez nas plantas de milho saracura.

Palavras-chave: Anatomia vegetal. Nitroprussiato de sódio. Metal pesado. *Zea mays* L.

ABSTRACT

The work aimed to evaluate the formation of root aerenchyma and reduction of cadmium toxicity in saracura corn plants submitted to nitric oxide. Saracura corn plants were subjected to permanent flooding for 30 days. Weekly, cadmium nitrate solution was applied Cd (NO₃)₂ to 0; 10µM; 50µM, and sodium nitroprusside Na₂ [Fe (CN) 5NO].2H₂O as a 0.5 µM nitric oxide (NO) donor; 0.1 µM; 0.2 µM. To ensure seedling nutrition, a nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) was applied weekly at 40% of the ionic strength. Root biometrics, indicators of oxidative stress, hydrogen peroxide H₂O₂ and malondialdehyde MDA, enzymes of the CAT catalase-hydroperoxidase antioxidant system, superoxide dismutase SOD, ascorbate peroxidase APX were analyzed. In addition, root anatomical analyzes. As well as, growth analysis, leaf gas exchange and leaf anatomical analysis. Semi-permanent blades with root cross sections and median leaf region, paradermic sections of the leaf, were made and subjected to the usual plant microtechnical procedures. The slides were observed under an optical microscope with an image capture system attached, the photomicrographs were analyzed using the UTHSCSA-ImageTool software. The evaluated parameters were: epidermis thickness, cortex thickness, cortex proportion, endoderm thickness, xylem vessel diameter and vascular cylinder proportion, mesophyll area, mesophyll thickness, abaxial and adaxial epidermis thickness, bundle area vascular, diameter of xylem vessels, polar and equatorial diameter of stomata, stomata functionality, stoma density, stoma index and stoma cell density. The experimental design was completely randomized in a 3x3 factorial scheme with five replications. The data were subjected to analysis of variance and the Scott-Knott test for p <0.05. However, in root biometry only fresh mass had interaction between treatments, although the oxidative stress indicators H₂O₂ did not interact, but a gradual drop was observed in higher concentrations of NO, however, MDA showed interaction in concentrations of Cd. In the activity of antioxidant enzymes, SOD reduced in higher concentrations of NO, while CAT was observed interaction in the treatments of Cd and NO. Although, in the root anatomical analyzes, the root cortical aerenchyma, thickness of the epidermis, thickness of the cortex, proportion of the cortex, thickness of the endodermis, diameter of xylem vessels and proportion of the vascular cylinder showed interaction between the treatments of Cd and NO. However, higher concentrations of Cd and NO reduced the total dry mass, leaf and stem dry matter, however, root biomass allocation increased. However, there was an increase in gas exchange at higher concentrations of Cd and NO. Although, lower concentrations of Cd and NO, an increase in the analyzed anatomical variables was observed, however, in higher concentrations these variables were reduced. Consequently, NO has developed a role as a molecule antagonistic to Cd, decreases the concentration of H₂O₂, by reducing the activity of SOD and increasing CAT. H₂O₂ is directly linked to the formation of aerenchyma. However, NO in low concentrations decreased the toxicity of Cd and physiological and anatomical characteristics similar to Cd-tolerant plants. Higher concentrations of NO may contribute to negative effects or toxicity in saracura corn plants.

Keywords: Plant anatomy. Sodium nitroprusside. Heavy metal. *Zea mays* L.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 - Biometria das raízes de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd (A), óxido nítrico (B) e a interação desses fatores (C).49
- Figura 2 - Indicadores de estresse oxidativo em raízes de milho saracura submetidas a diferentes concentrações de Cd (A, C) e óxido nítrico (B, D).....50
- Figura 3 - Atividade de enzimas do sistema antioxidante em raízes de milho saracura submetidas a diferentes concentrações de Cd (A e C) e óxido nítrico (B e D) e a interação desses fatores (E).51
- Figura 4 - Modificações no aerênquima cortical em raízes de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.52
- Figura 5 - Modificações no aerênquima cortical em raízes de milho saracura submetidas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico. 0 Cd (A, B, C); 10 μ M Cd (D, E, F); 50 μ M Cd (G, H, I) e 0,05 μ M NO (A, D, G); 0,1 μ M NO (B, E, H); 0,2 μ M NO (C, F, I).53
- Figura 6 - Modificações anatômicas em raízes de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.54

ARTIGO 2

- Figura 1 - Crescimento de plantas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e NO.....78
- Figura 2 - Alocação de biomassa e área foliar em plantas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e NO.....79
- Figura 3 - Trocas gasosas e conteúdo de clorofila foliar em plantas de milho cultivadas sob diferentes concentrações de Cd e NO.80
- Figura 4 - Modificações em características anatômicas foliares em secção transversal de plantas de milho saracura expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.....82
- Figura 5 - Secções transversais em folhas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico. Barras= 100 μ m.83
- Figura 6 - Modificações na estrutura da epiderme da face abaxial das folhas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.....84

Figura 7 - Modificações na epiderme da face adaxial de plantas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.	86
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC oxidase	Aminociclopropano-carboxilato oxidase
ACC-synthase	Aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintase
APX	Ascorbato peroxidase
AsA	Ascorbato
CAT	Catalase
Cd	Cádmio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETs	Elementos-traço
F.A.A	Formaldeído: ácido acético
GSH	Glutationa
GSNO	S-nitrosoglutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IRT1	Transportador de ferro de alta afinidade
K	Potássio
Kg	Quilogramas
KNO ₃	Nitrato de potássio
L	Litros
LCT1	Transportador de cátions de baixa afinidade
MDA	Malondialdeído
mg	Miligramas
mg	Miligramas
min	Minutos
mM	Milimolar
MT1	Metalotioneína tipo 1
N	Nitrogênio
NADPHO-Oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH-oxidase	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-oxidase
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nitroso sintase
NR	Nitrato redutase

NSP	Nitroprussiato de sódio
O	Oxigênio
OH-	Hidroxila
P	Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S	Enxofre
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SOD	Dismutase do superóxido
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Zn	Zinco

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
•OH	Radical hidroxilo
¹ O ₂	Oxigênio de singleto
CH ₄	Metano
CO ₂	Dióxido de carbono
N ₂ L	Nitrogênio líquido
N ₂ O	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio atmosférico
O ₂ ⁻	Radicais de superóxido
O ₂ ^{·-}	Ânion-radical superóxido
O ₃	Ozônio
v v ⁻¹	% Volume/Volume
μM	Micrômetros

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Adubação fosfatada e sua relação com o cádmio	16
2.2	Cádmio	17
2.3	Absorção de cádmio nas plantas.....	17
2.4	Efeito do cádmio nos processos fisiológicos e anatômicos nas plantas.....	18
2.5	Cádmio na formação de aerênquima	20
2.6	Estresse oxidativo	22
2.7	Espécies reativas de oxigênio – ERO	22
2.8	H₂O₂ e MDA como parte do sistema não enzimático.....	23
2.9	SOD, CAT, APX como parte do sistema enzimático	24
2.10	Óxido nítrico e sua função nas plantas.....	26
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
	REFERÊNCIAS	30
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	41
	ARTIGO 1 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO NA FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA RADICULAR EM PLANTAS DE MILHO SARACURA	41
1	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3	RESULTADOS.....	49
4	DISCUSSÃO.....	55
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	ARTIGO 2 - PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE PELO CÁDMIO EM PLANTAS DE MILHO SARACURA	70
1	INTRODUÇÃO	73
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3	RESULTADOS.....	78
4	DISCUSSÃO.....	87
5	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	93

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Hoje em dia, uma das problemáticas no crescimento e desenvolvimento das plantas nas culturas tropicais se deve à contaminação ambiental pela ação antrópica, decorrente do aumento na concentração dos gases efeito estufa como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), ozônio (O₃) e das alterações no clima, aumento da temperatura, entre outros (GHINI et al., 2011). Dita problemática no meio-ambiental reflete no desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, na produção para fins agrícolas e na economia global (LI et al., 2019).

De acordo com Li et al., (2019), fatores abióticos, como metais pesados, por exemplo o cádmio (Cd), produto das atividades antropogênicas, alagamento, seca, entre outros e os fatores bióticos, são causa das constantes mudanças nas plantas, provocam um desvio significativo das suas condições ótimas para a vida, chamado estresse, causando o desequilíbrio em todos os níveis funcionais dos vegetais (LARCHER, 1995).

Em resposta a essas mudanças, as plantas podem reagir às agressões, por meio de respostas de defesa constitutiva que pode ser de maneira mecânica, química ou física (DIAS; RANGEL, 2007). As barreiras mecânicas consistem no aumento da produção e depósito de substâncias capazes de reter a penetração dos patógenos, enquanto as barreiras químicas são produzidas pelo aumento da síntese de compostos fenólicos e fitoalexinas, provocando o aumento da atividade de proteínas de defesa nas plantas (BRAGA E DIETRICH, 1987). As barreiras físicas incluem a presença de tricomas ou ceras na superfície dos órgãos, espessura e dureza da cutícula e da parede externa das células epidérmicas, do tamanho e forma dos estômatos, na presença e distribuição do esclerênquima (BRAGA E DIETRICH, 1987).

Entretanto, além dos fatores bióticos e abióticos, que alteram o estado fisiológico nas plantas, é importante levar em consideração que o fator tempo, intensidade da exposição da planta ao estresse, o genótipo, entre outros detêm um papel importante no desenvolvimento dos mecanismos ou estratégias para a adaptação (PUGNAIRE et al., 1999; SOTELO et al., 2008). Segundo Bhattacharjee and Saha (2014), quando as plantas estão submetidas ao estresse ambiental, reagem por meio de respostas celulares e moleculares que transmitem sinais subsequentes à maquinaria celular e modular e ativam as respostas adaptativas fundamentais para a sobrevivência da planta. Essas respostas adaptativas tanto bioquímicas como fisiológicas podem ocorrer em curto prazo e se caracterizam por se manifestar, como

uma rápida modificação reversível, o que é chamada como resposta fisiológica ou de modulação; a ação em meio prazo envolve mudanças tanto reversíveis como irreversíveis chamadas respostas de aclimação (PUGNAIRE et al., 1999). As respostas em longo prazo são chamadas de respostas de adaptação ou morfológicas, que incluem padrões fixos como aspectos geneticamente dependentes, como os anatômicos ou mecanismos fisiológicos complexos (PUGNAIRE et al., 1999; SOTELO et al., 2008).

Contudo, em resposta a essas situações desfavoráveis, as plantas ajustam homeostaticamente seu sistema, para minimizar os impactos negativos do estresse e se manterem vivas. Reagem desenvolvendo mecanismos, mediante as alterações nos processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos os quais permitirão lidar com o estresse ao qual estiverem submetidas (KOLB & JOLY, 2009).

Pesquisas feitas com relação à tolerância das plantas a diferentes estresses ambientais atribuem à produção do óxido nítrico (NO), seja pela produção de forma natural da planta em níveis muito baixos, ou pela aplicação exógena por doadores de NO que desenvolveram o papel do agente protetor sob essas condições ambientais (BELIGNI E LAMATINA, 2001). Tal molécula sinalizadora é capaz de impedir ou reduzir o estresse oxidativo causado pelos fatores abióticos como algum metal pesado, alagamento, seca, entre outros (WANG e YANG, 2005). No entanto, por se tratar de uma molécula com poucos anos de descobrimento e essencial à regulação de numerosos processos fisiológicos nas plantas e desempenhar um papel crucial na sinalização às respostas de defesa nas plantas quanto a fatores estressantes (BELIGNI E LAMATINA, 2001), ainda, é indispensável conhecer a fundo os mecanismos de funcionamento do óxido nítrico nas plantas sob diferentes estresses ambientais como é a toxicidade do cádmio.

Diante o exposto e para a contribuição com o conhecimento científico da função do óxido nítrico, na adaptação das plantas a fatores ambientais, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a formação de aerênquima radicular e redução da toxicidade pelo cádmio em plantas de milho saracura submetida ao óxido nítrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Adubação fosfatada e sua relação com o cádmio

Os fertilizantes fosfatados são utilizados intensamente na agricultura, os quais apresentam uma composição de elementos-traço ETs ou comumente denominados metais pesados como o cádmio (GONÇALVES, et al., 2008). Esses elementos estão naturalmente presentes nas rochas fosfáticas e são levados ao produto final pelo processo industrial (GUILERME & MARCHI, 2007). No entanto a concentração do cádmio nos fertilizantes fosfáticos vai depender do tipo da rocha fosfática da qual foram obtidos (BIZARRO et al., 2008). Segundo Edelstein & Bem-Hurt (2018), dentre as principais fontes de contaminação por Cd, estão as atividades antropogênicas, como agricultura, indústria, mineração, etc, além das fontes naturais. Segundo McBride & Spiers, (2001), os fertilizantes nitrogenados e potássicos, geralmente, também contêm concentrações de metais pesados em muito menores concentrações que as encontradas nos fertilizantes fosfatados, sendo os fertilizantes fosfatados a principal fonte de contaminação de Cd em solos agrícolas (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020).

A baixa disponibilidade de fósforo no solo limita o rendimento das culturas, nas regiões tropicais e subtropicais, nas quais os fertilizantes fosfatados são utilizados intensamente na agricultura (FREITAS et al., 2009). O uso de fertilizantes tem tido impacto positivo para a nutrição e produção dos cultivos, porém aplicações excessivas podem ter impactos negativos no ambiente (JIAO et al., 2012). Entretanto as adubações fosfatadas sucessivas podem contribuir ao incremento das quantidades de elementos altamente perigosos, como o cádmio, arsênio e chumbo que podem se acumular nos solos agrícolas e, conseqüentemente, causar danos por sua alta toxicidade ao ambiente, como na água, solo, plantas e pode ser transferido pela cadeia alimentar, prejudicando assim a saúde humana (GONÇALVES et al., 2008; JIAO et al., 2012). Contudo, hoje em dia, o conteúdo de cádmio no solo aumenta por atividades antropogênicas, entre elas, o uso excessivo de fertilizantes fosfatados na agricultura, o que torna o ambiente mais poluído com a liberação de metais tóxicos.

2.2 Cádmio

A contaminação do solo e do meio ambiente têm aumentado constantemente pelo uso inconsciente dos metais pesados. Esse problema tem se elevado dia a dia, e a contaminação por metais pesados tornou-se uma dificuldade meio-ambiental que reflete na produção agrícola e, por conseguinte, na economia global (LI et al., 2019). As atividades antropogênicas, como a indústria, mineração, agricultura, uso de hidrocarbonetos e as de origem natural (geogénica), dentre outras, são fontes de contaminação por cádmio (Cd) e outros metais pesados (EDELSTEIN & BEM-HUR, 20018). Diversos autores relatam que os metais pesados podem ser divididos em dois grupos principais, entre eles, os essenciais ao crescimento das plantas pelos tóxicos em concentrações excessivas, como é o boro, cobre, ferro, molibdênio, manganês, níquel e zinco e aqueles não essenciais a plantas ou animais e que, em concentrações muito baixas, são altamente tóxicos como é o arsênio, cádmio, mercúrio e chumbo (GUPTA et al., 2010; EDELSTEIN & BEM-HUR, 2018; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020).

O cádmio é um metal pesado não essencial e pouco abundante na crosta terrestre e, em baixas concentrações, é considerado como uns dos elementos mais tóxicos para todo ser vivo, assim como o mercúrio e chumbo (ISMAEL et al., 2019, RODRÍGUES-SERRANO et al., 2008). As fontes naturais do Cd na atmosfera advêm da atividade vulcânica, da erosão de rochas sedimentárias e fosfáticas (NORVELL et al., 2000). A contaminação por Cd pode causar sérios problemas por causa da acumulação nos organismos e se transferir aos níveis tróficos (PERNÌA et al., 2008), sendo altamente tóxico para o ser humano e todo ser vivo (RODRIGUEZ et al., 2008).

2.3 Absorção de cádmio nas plantas

As plantas podem absorver facilmente o Cd pelas raízes e acumulá-lo nos tecidos vegetais, em maiores concentrações nas raízes, já que se considera o primeiro órgão a ter contato com o Cd no solo (KÜPPER; ANDRESEN, 2016), em que é capturado, a princípio, no vacúolo das células das raízes e, posteriormente, translocado por intercâmbio iônico ao interior da planta até chegar à parte aérea, como caule, folhas, frutos e sementes (CHAN & HALE, 2004; LUX et al., 2011), afetando, assim, no crescimento, no rendimento e na produtividade das plantas. Por seu acúmulo, pode causar danos à saúde humana via cadeia alimentar (ISMAEL et al., 2019; ZENG, et al., 2020).

Dentre as proteínas responsáveis pela entrada do Cd à célula, atribui-se ao transportador específico de cálcio LCT1 (transportador de cátions de baixa afinidade) e à proteína IRT1, pertencente à família de transportadores de zinco e ferro (GUERINOT, 2000). Dubeaux et al., (2018) afirmam que o IRT1 é um transportador de amplo espectro em plantas pela condução e absorção de metais pesados essenciais não ferrosos, em quantidades mínimas, como manganês, zinco e cobalto, além da absorção de íons tóxicos de cádmio. Edelstein & Bem-Hur (2018) asseveram que a condução ou translocação do Cd na raiz, para o interior da planta, vai depender do pH, conteúdo de matéria orgânica, entre outros fatores. Assim, as raízes também podem atuar como barreiras contra a translocação do Cd, para a parte aérea da planta, por imobilização e acúmulo de íons tóxicos na parede celular (NOCITO et al., 2011).

Segundo Ismael et al., (2019), a acumulação de Cd nas plantas vai depender da entrada do Cd pelas raízes, do sequestro nos vacúolos das raízes ou por barreira apoplásticas, mediante as moléculas que formam os quelatos, como as fitoquelatinas, as quais são armazenadas nas células, da translocação no xilema e do floema e da diluição do Cd na planta ao longo de seu crescimento (RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020). Depende também das taxas de aplicação de fertilizantes fosfatados no solo e das características que possui cada planta para tolerar esse metal (JIAO et al., 2012). Segundo McGrth and Zhao, (2003), o Cd pode se acumular nas plantas, em níveis acima de 0.01% do peso seco da parte aérea, sem causar sintomas de toxicidade. Porém a sensibilidade das plantas ao cádmio pode variar, em razão de concentrações desse metal, concentrações de 5-10 g de Cd g⁻¹, peso seco da folha que se tornaram tóxicas para as plantas, mas plantas hiperacumuladoras podem tolerar concentrações de Cd 100 g Cd g⁻¹ peso seca da folha (VERBRUGGEN et al., 2009).

2.4 Efeito do cádmio nos processos fisiológicos e anatômicos nas plantas

Estudos têm demonstrado que as plantas expostas a estresse expressam respostas funcionais, por meio de ajustes estruturais, que contribuem a seu crescimento e sobrevivência (MELO JÚNIOR & BOEGER, 2016). A capacidade de apresentar diferentes características, em função das condições ambientais, é chamada como plasticidade fenotípica dentre as quais podem ser morfológicas, fisiológicas, fenológica ou comportamental (LIMA et al., 2017). No entanto a plasticidade fenotípica pode adotar uma forma modular e afetar meristemas, folhas, caules, em vez de a planta inteira (KROON et al., 2005). O ajuste morfológico, anatômico, fisiológico e bioquímico, porém permite às plantas e adaptarem e sobreviverem sob a

influência dos fatores abióticos, como metais pesados, entre eles, o cádmio, etc (MELO JÚNIOR & BOEGER, 2016). Segundo Dickison (2000), as folhas são consideradas como o órgão da planta com mais plasticidade, embora seu alto nível de plasticidade e adequação a diferentes condições ambientais permita melhores adaptações ao crescimento e sobrevivência das plantas (CABRAL et al., 2018).

Diversos estudos têm demonstrado que metais pesados como o cádmio interferem em muitas funções celulares e moleculares nas plantas (HALL, 2002), sendo a membrana plasmática a primeira estrutura viva a ser afetada (RODRIGUES et al., 2016). Dentre os primeiros danos fisiológicos causados pelo metal está a inativação de diversas enzimas citoplasmáticas (LASAT, 2002). Os processos fisiológicos, entretanto são afetados pelo dano nas enzimas do Ciclo de Krebs na mitocôndria (SHAW, et al., 2004); dissociação na RuBisCO (KURDZIEL et al., 2004), redução da fotossíntese, respiração, transpiração, mudança na taxa de clorofila, tornando o aparato fotossintético mais sensível ao efeito negativo do cádmio (GILL et al., 2012; LI et al., 2014, SACRAMENTO, et al., 2016); além das mudanças nas relações hídricas, como diminuição e pressão de turgência (BENAVIDES, et al., 2005), inibição do crescimento tanto das raízes quanto da parte aérea, reduzindo o acúmulo de matéria seca afetando, assim, o crescimento das plantas (VECCHIA et al., 2005, SOUZA et al., 2009, MARQUES et al., 2011). Dentre os sintomas visuais de toxidez de Cd em plantas, podem-se observar a clorose encarquilhamento, enrolamento de folhas (DA CUNHA et al., 2008), indução da senescência prematura em folhas (DJBALI, et al., 2005), redução da germinação de sementes (CHUGH & SAWHNEY, 1996; GUILERME; OLIVEIRA; SILVA, 2015), inibição do eixo embrionário e da radícula (KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2000; SHAW, et al., 2004).

Dentre os aspectos anatômicos, o Cd pode afetar na diminuição do mesofilo (SOUZA, et al., 2009), diminuição dos espaços intercelulares das folhas (SRIDHAR et al., 2005), redução do tamanho da epiderme (SRIDHAR et al., 2005), redução do índice estomático (MARQUES et al., 2011), indução do fechamento estomático (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002, além de alterações estruturais dos tecidos vasculares, células epidérmicas e colenquimáticas, entre outras alterações (DA CUNHA et al., 2008)).

Além da desnaturação de proteínas e redução da atividade enzimática (KURDZIEL et al., 2004; LÖSCH, 2004), redução da CAT, SOD (GUIMARÃES et al., 2008; ROMERO-PUERTAS et al., 2006), danos associados ao DNA (GICHNER, et al., 2004; KOPPEN & VERSCHAEVE, 1996), alterações nos sistemas antioxidantes, estimulando o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido (O_2^\cdot) e o

peróxido de H_2O_2 o que podem levar a uma morte celular ((DEVI & PRASAD, 2004; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001).

Contudo estudos têm demonstrado que os ajustes estruturais que as plantas apresentam são modularizados, dependendo da espécie e da intensidade do estresse, ao qual estão submetidas, sendo as alterações morfológicas, em geral, mais expressivas que as respostas anatômicas (MELO JÚNIOR & BOEGER 2016). Embora a plasticidade fenotípica que cada planta possui, permite lidar com possíveis mudanças ambientais de origem natural ou antrópica (VALLADARES et al., 2014).

2.5 Cádmio na formação de aerênquima

Autores relatam que a deficiência de oxigênio promove a produção de etileno pelos estímulos anaeróbicos, o que causa um aumento na atividade da produção de espécies reativas de oxigênio ERO, levando à desintegração de células pela morte celular, que, em consequência, estimula o desenvolvimento de aerênquima (FAHN, 1982, GEISLER-LEE et al., 2010; PIRES et al., 2015). Nesse caso, o desenvolvimento de aerênquima nas plantas é indispensável, para tolerar ambientes sob hipóxia, que funciona como uma estratégia alternativa para a obtenção de CO_2 (SOUZA et al., 2009; 2011). No entanto autores têm relatado que a presença de Cd estimula a produção de etileno, em espécies vegetais, além do acúmulo de espécies reativas de oxigênio como o H_2O_2 , o que desencadeia uma morte celular estimulando assim o desenvolvimento de aerênquima (SCHÜTZENDÜBEL et al. 2001; TOPPI et al., 1998). Segundo Souza et al., (2009), a presença e as alterações das concentrações de Cd podem desenvolver modificações nas lacunas do aerênquima das raízes e da nervura central foliar em plantas de *P. ferrugineum*.

De acordo com Armstrong et al., (1979; 2000), o aerênquima é um tecido vegetal parenquimático, constituído com espaços intercelulares interligados longitudinalmente, que facilita a difusão de gases pelos tecidos internos das plantas entre a parte área e raiz, permitindo sua sobrevivência em ambientes com pouca disponibilidade de oxigênio. Esse tecido pode ser formado em órgãos, como raízes, brotações e folhas, principalmente em plantas aquáticas e algumas espécies terrestres sob condições adversas (EVANS, 2003). Dentre as principais funções do aerênquima, estão o armazenamento de ar entre as células, transporte de gases (O_2 , CO_2 , etileno e metano), metabolismo aeróbio, respiração, funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, redução dos custos metabólicos, entre outros (COLMER, 2003; DANTAS et al., 2001; DIAZ et al., 2018; EVANS, 2003). Autores

têm relatado que a formação desse tecido é uma adaptação nas plantas para tolerar diferentes fatores/estresses ambientais, geralmente, associados à hipóxia como alagamento (PEREIRA et al., 2010; STEFFENS & RASMUSSEN, 2016), seca (DÍAZ et al., 2018; GONÇALVES & LYNCH, 2014), deficiência e excesso de nutrientes (DÍAZ et al., 2018; POSTMA & LYNCH, 2011;), compactação do solo (SCAPINELLI et al., 2016; SOUZA et al., 2013), metais pesados como é o cádmio, entre outros (SOUZA et al., 2009).

Segundo Drew et al., (2000) a aerênquima lisígeno é formada pela morte e lise das células corticais nas raízes, e esse processo ocorre, quando fatores como a hipóxia (redução do oxigênio) ou impedância mecânica (resistência que o solo exerce à passagem da raiz) ativam a ACC-synthase (enzima que desempenha um papel significativo na síntese de etileno) e a ACC oxidase (enzima catalizadora), que estimulam a formação de etileno, reagindo como uma cascata de sinalização, desenvolvendo assim a morte celular levando à formação de aerênquima. Pesquisa mais recente feita por Yamauchi et al., (2018), estudando a regulação das características da raiz, para a aeração interna e tolerância ao estresse de inundação e alagamento do solo, demonstra que, em solos alagados, as plantas sofrem deficiência de oxigênio que reduz a respiração. Porém a entrada de oxigênio da atmosfera para o solo é impedida, o que leva ao avanço dos níveis de etileno nas raízes. Aumentando os genes, codificam-se das enzimas biossintéticas de etileno 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO), tendo como resultado o crescimento dos níveis de enzimas e a biossíntese de etileno nas raízes (STEFENS and RASMUSSEN, 2016; YAMAUCHI et al., 2018). Além disso, há um aumento da biossíntese de ácidos graxos (VLCFA), nas células do córtex da raiz; o etileno aumenta a expressão de um gene, que codifica a isoforma H (RBOHH) do homólogo da oxidase de explosão respiratória (RBOH), que converte o oxigênio no radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) no apoplasto. O influxo de Ca^{2+} citosólico do apoplasto é estimulado nas raízes hipóxicas. A RBOHH é fosforilada e ativada por proteínas quinases, dependentes de Ca^{2+} do grupo I (CDPKs), como CDPK5 e CDPK13. O apoplástico $O_2^{\cdot-}$ - produção mediada por RBOH (por exemplo, RBOHH) resulta em um aumento no peróxido de hidrogênio (H_2O_2), níveis no apoplasto e/ou citosol. Além disso, a redução da expressão de genes que codificam a metalotioneína tipo 1 (MT1), que atua como um necrófago de ROS, pode contribuir para promover o acúmulo de ROS nas células corticais da raiz. Juntos, as quantidades aumentadas de ROS apoplástico e/ou intracelulares ($O_2^{\cdot-}$ e/ou H_2O_2) induzem PCD e subsequente formação de aerênquima lisígeno no córtex da raiz (YAMAUCHI et al. 2015, 2017a; YAMAUCHI et al., 2018). As ROS, entretanto desempenham um papel importante ao desenvolvimento de aerênquima, cujo aumento dessas

espécies reativas de oxigênio, por meio de mudanças na atividade das enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e peroxidase), aumenta o etileno, o que desencadeia a formação de aerênquima lisígeno (STEFENS and RASMUSSEN, 2016).

2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um fator que ocorre em nível da célula, produto do estresse abiótico e biótico e ocorre, quando há um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres em detrimento da velocidade da remoção (FOYER & NOCTOR, 2003). A formação dos radicais livres ocorre, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (BARBOSA, et al., 2010). Dito processo conduz a oxidação de biomoléculas com conseqüente perda das suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático (BARBOSA et al. 2010), cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e nos tecidos, gerando oxidação das moléculas biológicas (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo celular, respondendo à produção de radicais livres de forma natural ou por disfunção biológica, que, conseqüentemente, origina a formação de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio nas plantas (ERO) (BARREIROS et al., 2006).

2.7 Espécies reativas de oxigênio – ERO

As espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), são moléculas com instabilidade física e altamente reativas, pois possuem, em seu orbital, um elétron desemparelhado, que inclui as moléculas precursoras de radicais livres, como: radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (1O_2) que são as formas mais comuns de serem encontradas nas células (MITTLER, 2002; SÁNCHEZ et al., 2011). A ROS é um termo usado para indicar produtos que são gerados como intermediários nos processos redox (oxidação – redução) (GAMALEY & KLYUBIN, et al., 1999).

A ROS inclui íons de oxigênio, radicais livres e peróxidos tanto inorgânicos como orgânicos, são moléculas altamente reativas, formadas de maneira natural, como subproduto do metabolismo normal do oxigênio e servem como sinalização celular, porém o aumento dos níveis dessas moléculas sob estresse ambiental pode causar danos significativos às estruturas

celulares, conhecidos como estresse oxidativo (NASCIMENTO & BARRIGOSI, 2014). Geralmente as ROS são produzidas, especificamente pelo sistema do complexo enzimático NADPHO-Oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase), na membrana plasmática, desencadeando uma variedade de funções celulares como crescimento celular, desenvolvimento, síntese, secreção e locomoção de proteínas (GAMALEY & KLYUBIN et al., 1999).

Todos os tipos de estresse ambiental, em geral, geram o estresse oxidativo nas plantas, podem causar danos aos componentes das células e inativar suas funções (NASCIMENTO & BARRIGOSI, 2014). Quando as plantas estão expostas ao estresse, causado por fatores bióticos ou abióticos, estimula a produção de ERO que é a forma parcialmente reduzida ou ativada do oxigênio atmosférico (O_2), no qual a excitação do O_2 forma o oxigênio singlete (1O_2) e, a partir da transferência de um a três elétrons ao O_2 , forma o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxilo ($\bullet OH$) (CABRERA et al., 2007). Porém, para a proteção das plantas dessas moléculas tóxicas subprodutos do O_2 , as células e orgânulos citoplasmáticos, como os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, desenvolvem um sistema de defesa antioxidante que consiste em enzimas e outras moléculas não enzimáticas reagindo na decomposição das espécies reativas de oxigênio (DAVAR et al., 2013; NASCIMENTO & BARRIGOSI, 2014). Contudo, segundo Cabrera et al., (2007), além de considerar as ERO como subproduto tóxico no metabolismo aeróbico, em baixas concentrações, essas moléculas podem atuar como sinais reguladores de processos biológicos, como o crescimento, respostas a hormônios nos diversos tipos de estresses tanto biótico e abióticos. Sendo assim, inclusive, seu acúmulo nos tecidos pode levar à toxicidade e resultar na morte celular (FORMAN et al., 2010).

2.8 H_2O_2 e MDA como parte do sistema não enzimático

O peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio produzido pelo metabolismo aeróbico em situações de estresse. No estresse oxidativo tem a função de transpor membranas celulares e gerar o radical de hidroxila (BARREIROS et al. 2006). É composto *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010). É produzido, predominantemente, nas células vegetais, durante a fotossíntese e fotorrespiração e, em menor grau, nos processos de respiração (SLESACK et al., 2007).

Segundo Sun et al., (2020), o H_2O_2 tornou-se uma molécula de grande importância como sinalizadora nas células, é funcionalmente classificada como ROS de função dupla com comunicação de organela e ativação de inflamassoma (moléculas de ativação enzimática). Todavia é pouco reativo quanto às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto são de extrema importância no estresse oxidativo, pela sua capacidade de translocar as membranas celulares e gerar radical de hidroxila (BARREIROS et al., 2006).

O malondialdeído (MDA), considerado como subproduto da peroxidação lipídica, é o único aldeído mensurável, sendo amplamente usado como biomarcador do estresse oxidativo (POMAR et al., 2017), além de ter grande importância na saúde humana; estudos atribuem sua função aos processos de aclimação e defesa nas plantas (SLESÁK et al., 2007).

O MDA é gerado *in vivo* pela peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, durante a peroxidação; os peróxidos se descompõem em aldeídos como o MDA que são considerados altamente tóxicos (MUÑIZ et al., 2014). Possuem uma vida média e alta reatividade, o que lhes permite atuar tanto no interior como no exterior da célula interagindo com proteínas e DNA, resultando em diferentes processos fisiopatológicos (DEL RIO et al., 2005; MUÑIZ et al., 2014).

Contudo o sistema não enzimático, além de causar degradação de fosfolipídios nas membranas celulares, caracteriza-se em inativar enzimas e danificar os componentes celulares (HENDGES et al., 2015). É de grande importância por desempenhar o papel crucial como uma molécula sinalizadora nos processos fisiológicos das plantas (SLESÁK et al., 2007).

2.9 SOD, CAT, APX como parte do sistema enzimático

As plantas continuamente produzem erro, em suas diferentes organelas celulares e sucessivamente são removidas pelo complexo do sistema antioxidante, no qual interagem enzimas, proteínas e outros metabolitos que permitam manter a homeostase celular (SALDIVAR et al., 2016). Considera-se que o aumento da produção das ERO nas plantas causa grandes prejuízos (CABRERA et al., 2007). Uma das formas das plantas reagirem e diminuir esses prejuízos é mediante a ativação do sistema antioxidante enzimático. O sistema enzimático é composto pela dismutase do superóxido (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), dentre outras (MITTLER, 2002; NASCIMENTO & BARRIGOSI, 2014). Por conseguinte, o ascorbato (AsA), glutatona (GSH), β -caroteno e o α -tocoferol, vitamina E, ceruloplastina são antioxidantes não enzimáticos, a que se atribuem ações protetoras contra as espécies reativas de oxigênio (CARVAJAL, 2019). A atividade desse sistema atua na

proteção contra danos oxidativos causados pelas ERO derivado pelo estresse ambiental. Desta forma, os níveis das ERO são controlados pelo complexo enzimático impedindo que danos sejam causados na célula (SALDIVAR et al., 2016).

De acordo com Nascimento & Barrigossi (2014), o superóxido dismutase (SOD) é uma das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficazes, está presente em todos os organismos aeróbicos e compartimentos subcelulares propensos a uma explosão oxidativa em razão de um estresse abiótico ou biótico. É considerada a primeira linha de defesa contra as ROS, catalisam a dismutação de dois radicais $O_2^{\bullet-}$, gerando H_2O_2 e O_2 . Essas enzimas participam da modulação do nível de H_2O_2 , em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010).

A catalase é uma das principais enzimas na eliminação do H_2O_2 , atua nos peroxissomos e glioxissomas e pode ser encontrada também em mitocôndrias (DUBEY, 2011). É responsável pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo o peróxido gerado nos peroxissomos por oxidases envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo de purinas (GILL & TUTEJA, 2010). Entretanto pode oxidar substratos, tais como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (SHARMA et al., 2012). Em concentrações altas de H_2O_2 (mM), a atividade da CAT é muito efetiva, por isso, é considerada indispensável para a desintoxicação de ROS em condições de estresse severo (DUBEY, 2011). Segundo Prasad et al., (1994), concentrações baixas podem reagir na transdução de sinal nas plantas atacadas por fungos e insetos.

A ascorbato peroxidase é uma heme-proteína, da classe I da superfamília das peroxidases, com distintas formas isoenzimáticas, diversamente reguladas. Suas isoformas podem ser encontradas em citosol, mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos (estroma e ligadas às membranas dos tilacoides) e parede celular. A APX é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, catalisa a decomposição do H_2O_2 no citosol e cloroplastos (DABROWSKA et al., 2007; De GARA, 2004).

A ativação do sistema antioxidante pode evitar a formação de radicais livres, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (SERKEDIEVA, 2011). Porém o acúmulo de ROS pode causar danos irreversíveis que podem levar à morte celular, que ocorre, quando reagem com moléculas biológicas (BARBOSA et al., 2014). Segundo Barbosa et al., (2014), muitos pesquisadores têm associado o nível de ROS e as atividades de enzimas antioxidantes a processos de sinalização e defesa contra o estresse, nos quais se podem incluir respostas ao déficit hídrico, temperaturas extremas, metais pesados, salinidade, patógenos e à indução de vias morfogênicas (BARBOSA et al., 2014). O sistema de defesa enzimático,

porém funciona como um mecanismo de prevenção, impedindo ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais, evitando a ocorrência de danos oxidativos à planta (BARBOSA et al., 2010).

2.10 Óxido nítrico e sua função nas plantas

Os estudos sobre o NO são recentes, datam de 1980, produto dos resultados das pesquisas. Como um importante mensageiro no sistema cardiovascular, identificou-se como a pressão sanguínea é regulada (CENTELLES et al., 2004). Mostrou-se a forma como as células sintetizam o NO, a partir do aminoácido L-arginina, pesquisa que, em 1990, permitiu o prêmio Príncipe de Astúrias ao científico hondurenho Salvador Moncada. Nesse momento, as pesquisas do NO cresceram de maneira exponencial, tanto nos aspectos da saúde humana, como nos animais e plantas (CENTELLES et al., 2004).

O óxido nítrico (NO, por suas siglas em inglês, Nitric Oxide) é caracterizado, como uma molécula gasosa essencial à regulação de numerosos processos fisiológicos vegetais. Aloca-se nas células vegetais e tem estímulo em resposta ao sistema imunológico da planta, é importante para o crescimento, resposta de defesa a patógenos e em situações de estresse (LAMATTINA et al., 2003). O NO está formado por dois átomos, um átomo de oxigênio (O) e outro de nitrogênio (N), quando esses dois átomos se encontram, seus elétrons se entrelaçam para formar uma molécula de NO, contendo um elétron separado (BENEZER-BENEZER et al., 2008). A união do NO nas proteínas ou outras moléculas é conhecida como nitrosação. A presença do elétron desemparelhado permite ao NO interatuar rapidamente com outros átomos que são abundantes, nos sistemas biológicos, como o nitrogênio (N) ou enxofre (S), que formam parte das proteínas (BENEZER-BENEZER et al., 2008). As proteínas são fundamentais na regulação de diversas funções biológicas, como a produção de energia, transporte e armazenamento do oxigênio e tradução de sinais (GOW & ISCHIROPOULOS, 2001). Contudo o NO reage rapidamente com o oxigênio molecular (O₂) e suas diferentes formas altamente reativas, como os radicais superóxido (O₂⁻) e hidroxilo (OH[·]), os quais são altamente tóxicos (SÁNCHEZ et al., 2011). A interação do NO com o O₂⁻ gera peroxinitrito e outras formas reativas do N que também são altamente tóxicas, porém a combinação do NO com outras formas reativas de O₂ constitui o principal mecanismo no qual o NO não dana as células, o que é de interesse como mecanismo de defesa em diferentes processos fisiológicos nas plantas (BENEZER-BENEZER et al., 2008; ROMERO-PUERTAS et al., 2004; WENDEHENNE et al., 2004).

A produção do NO se dá pelos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos; as enzimas na sua produção são óxido nítrico sintase (NOS) e nitrato redutase (NR), a NOS catalisa a oxidação em duas fases da L-arginina para produzir NO e citrulina (BOUCHER et al., 1992; LAMATTINA et al., 2003). A NR gera NO de nitrito utilizando NADPH como doador de elétrons (KAISER et al., 2002; BENEZER-BENEZER et al., 2008).

Os autores relatam que as plantas podem produzir determinados níveis de NO, em seu ambiente natural, como uma resposta generalizada quanto ao estresse ambiental (MAGALHAES et al., 1999; AGUIAR et al., 2015). Segundo Aguiar et al., (2015), pesquisas feitas no estudo do NO com o uso de doadores químicos do NO, tem compostos que eliminam ou inibem as enzimas envolvidas na produção de NO, porém há poucos estudos da produção do NO de forma natural. Dentre os compostos doadores de NO mais utilizados são o SNP (nitroprussiato de sódio), nitrato de potássio (KNO_3), e os S-nitrosotióis, como SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) e GSNO (S-nitrosoglutationa). No entanto a resposta biológica ao NO aplicado exogenamente vai ser determinada, em grande parte, pela concentração e pelo tempo de exposição ao NO produzido pelos diferentes doadores (BELIGNI E LAMATTINA, 2001; ATAÍDE et al., 2015).

Nas últimas duas décadas, o óxido nítrico vem sido atribuído à regulação dos processos fisiológicos e patofisiológicos nas plantas (RODRÍGUEZ-GONZÁLES et al., 2020). Nas primeiras pesquisas feitas por Delledonne et al., (1998); Durner et al., (1998); Hong et al., (2008), eles comprovaram que o NO atua como uma molécula de tradução de sinais nas vias que conduzem a indução de respostas de defesas contra patógenos e da morte celular programada. Nos processos fisiológicos, participa da complexa rede de sinalização celular que induz o fechamento estomático em resposta ao hormônio vegetal ácido abscísico (ABA), em condições de estresse hídrico (DESIKAN et al., 2004; BRIGHT et al., 2006; RIBERO et al., 2009); atua como estimulador na germinação de sementes tanto em condições normais ou sob estresse (ATAÍDE et al. 2015; BELIGNI e LAMATTINA, 2000;); na floração (SELIGMAN et al., 2008), organogênese nas raízes (PAGNUSSAT et al. 2003), formação de raízes adventícias (PAGNUSSAT et al. 2003), desenvolvimento de raízes laterais (CORREA-ARAGUNDE et al. 2004) e formação de pelos radiculares (LOMBARDO et al. 2006) e senescência (MISHINA et al., 2007). Além disso, reage na regulação de múltiplas respostas a outros tipos de estresse abióticos, como salinidade (ZHANG et al., 2006; ZHAO et al., 2007), temperatura, intensidade luminosa, danos mecânicos (CORPAS et al., 2004), radiação UV-B (HE et al., 2007; MACKERNESS et al., 2001), metais pesados (SINGH et al., 2008), estresse por alumínio (TIAN et al., 2007; WANG et al., 2010), hipóxia, entre outros

(IGAMBERDIEV Y & HILL, 2004). Estudos recentes mostraram que o NO é importante na função das interações benéficas planta-microorganismo (CANOVAS et al. 2016; MARTINEZ-MEDINA et al. 2019).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O constante progresso das pesquisas na funcionalidade do óxido nítrico em plantas tem sido um avanço, hoje em dia, tanto em nível bioquímico, genético, molecular e quanto à biologia estrutural. Sendo assim, é importante a realização de mais pesquisas nessas áreas e a sua associação para entender e conhecer outras fontes de produção, interação e função do óxido nítrico nas plantas.

Dentre as plantas domesticadas e cultivadas pelo homem, o milho tem sido utilizado em muitos estudos de poluição como planta modelo. No entanto, apesar de um número considerável de investigações dos efeitos tóxicos e mecanismos de estresse causados pelo cádmio nas plantas, ainda são escassos os estudos envolvidos ao óxido nítrico em função da toxidez do cádmio e relacionado aos aspectos anatômicos, fisiológicos e bioquímicos nas plantas. Esta investigação permitirá conhecer a funcionalidade do óxido nítrico à toxicidade do cádmio, que, no futuro, poderá estabelecer bases como uma alternativa do uso como inibidor de toxidez por metais pesados em cultivos agrícolas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Y. V.; MÁRQUEZ, A. P.; GARCÍA, L. F. Nitric oxide and its role in plant responses to water stress. **Cultivos tropicales**, v. 36, n, especial, p. 51-58, 20015.
- ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Adv. Bot. Res**, v. 7, p. 225-332, 1979.
- ARMSTRONG, W.; COUSINS, D.; ARMSTRONG, J.; TURNER, D. W.; BECKETT, P. M. Oxygen distribution in wetland plant roosts and permeability barriers to Gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modelling study with *Phragmites australis*. **Annals of Botany**, v. 86, n. 3, p. 687-703, 2000.
- ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L.; FLORES, A. V.; CASTRO, R. V. O. Nitric oxide on the germination of *Dalbergia nigra* seeds with low vigor. **Rev. de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 38, n. 3, p. 438-444, 2015.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; PAULA, S. O. de; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative estress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant, Cell and Environment**, v. 24, p. 267-278, 2001.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Goytacazes, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.
- BENEZER-BENEZER, M.; CASTRO-MERCADO, E.; GARCÍA-PINEDA, E. Production of reactive oxygen species during the resistance expression of plants to diseases. **Rev, mex. Fitopatol**, v. 26, n. 1, p. 56-61, 2008.
- BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: **Science Publishers**, p.1-30, 2010.
- BHATTACHARJEE, S.; SAHA, A. K. Plant wáter-stress response mechanisms. **Springer India**, p. 149-172, 2014.
- BIZARRO, V. G.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P. Cadmium contents of phosphate fertilizers marketed in Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, p. 247-250, 2008.

BOUCHER, J. L, et al. Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N-omegahydroxy- L-arginine by NADPH and O₂ to nitric oxide and citrulline. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 187, p. 880-886, 1992.

BRAGA, M. R; DIETRICH, S. M. Defesas químicas de plantas: Fitoalexinas. **Acta. Bras**, v. 1, n. 1, p. 3-16, 1987.

BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; WEIR, I. S.; NEIL, S. J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 1, p. 113-122, 2006.

CABRAL, R. D. C.; MELO JUNIOR, J. C. F.; MATILDE-SILVA, M. Plasticidade morfoanatômica foliar em *Smilax campestris* (Smilacaceae) em gradiente ambiental de restinga, SC, Brasil. **Hoehnea**, v. 45, n. 2, p. 173-183, 2018.

CABRERA, F. R.; VOLANTE, B. B.; SÁNCHEZ, F. D. L.; PÉREZ-FLORES, L. J. Especies reactivas de oxígeno en las plantas. **Konisberg**, v. 34, p. 493-516, 2007.

CÁNOVAS, D., MARCOS, J.F., MARCOS, A.T., STRAUSS, J. . Nitric oxide in fungi: is there NO light at the end of the tunnel? **Current Genetics**, v. 62, n. 3, p. 513–518, 2016.

CARVAJAL, C. C. Reactive oxygen species: training, function and oxidative stress. **Revista Medicina Legal de Costa Rica**, v. 36, n. 1, p. 91-100, 2019.

CENTELLES, J. J.; ESTEBAN, C.; IMPERIAL, S. Óxido nítrico: un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. **Bioquímica**, v. 23, n. 11, p. 96-102, 2004.

CHAN, D.Y.; HALE, B. A. Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 2571-2579, 2004.

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

COLMER, T.D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell Environ.** V. 26, p.17-36,2003.

CORPAS, F. J. et al. Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Nitric Oxide in Young and Senescent Pea Plants. **Plant Physiol**, v. 136, p. 2722-2733. 2004.

CORREA-ARAGUNDE, N., GRAZIANO, M., LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v. 218, p. 900–905, 2004.

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.

DA CUNHA, K. P. V. Cadmium and zinc availability, accumulation and toxicity in maize grown in a contaminated soil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 32, n. 3, p. 1319-1328, 2008.

- DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C.A.; ALVES, J.D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, p.251-257, 2001.
- DAVAR, R.; DARVISHZADEH, R.; MAJD, A. Changes in antioxidant systems in sunflower partial resistant and susceptible lines as affected by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologia**, v. 68, p. 821-829, 2013.
- DE GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, v.3, n.1-2, p.195-205, 2004.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v. 394, p. 585-588, 1998.
- DEL RIO, D. STEWART, A. J. PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Card Dis**, v. 15, p. 316-328, 2005.
- DESIKAN, R.; CHEUNG, M.K.; BRIGHT, J.; HENSON, D.; HANCOCK, J.; NEILL, S. J. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, p. 205-212.
- DEVI, S.R.; PRASAD, M.N.V. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**. 2nd ed. Springer, printed in India, 2004. p. 127-145.
- DJEBALI, W. et al. Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon esculentum*) chloroplast membranes. **Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 358-368, 2005.
- DIAS, G. B.; RANGEL, T. B. A. Indução de resistência em plantas: o papel do óxido nítrico, **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, Vitória, n. 3, p.1-8, 2007.
- DÍAZ, A. S. et al. Aerenchyma development in different root zones of maize genotypes under water limitation and different phosphorus nutrition. **Biologia plantarum**, v. 62, n. 3, p. 561-568, 2018.
- DICKISON, W. C. **Integrative plant anatomy**. San Diego: Harcourt Academic Press; 2000. p. 129-141.
- DREW, M. C.; HE, C. J.; MORGAN, P. W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. **Elsevier Science Ltd**, v. 5, n. 3, p. 123-127.
- DUBEAUX, G.; NEVEU, J.; ZELAZNY, E.; VERT, G. Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition. **Molecular Cell**, v. 69, p. 953-964, 2018.
- DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, 2011. Chap.9, p.178-203.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSING, D. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 10328-10333, 1998.

EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M. Heavy metals and metalloids: sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 234, n. 2, p. 431-444, 2018.

EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, v. 161, p. 35-49, 2003.

FAHN, A. **Plant Anatomy**. Oxford, Pergamon Press. p.544, 1982.

FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v.49, p.835-842, 2010.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v. 119, p. 355-364, 2003.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; GOULART, D. F.; SILVA, J. P. Cadmium and lead availability to corn in soil amended with phosphorus fertilizers. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 33, p. 1899-1907, 2009.

GAMALEY, I. A.; KLYUBIN, I. V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. **Science Direct**, v. 188, p. 203-255, 1999.

GEISLER-LEE, J.; CALDWELL, C.; GALLIE, D.R. Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.857-871, 2010.

GHINI, R.; BETTIOL, W.; HAMADA, E. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives. **Plant Pathology**, v. 60, p. 122-132, 2011.

GICHNER, T.; PATKOVA, Z.; SZKOVA, J.; DOMNEROVA, K. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.559, p.49-57, 2004.

GILL, S. S.; KHAN, N. A.; TUTEJA, N. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Sci**, v. 182, p.112-120, 2012.

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

GONÇALVES, S.L; LYNCH, J.P. Raízes de plantas anuais: tolerância a estresses ambientais, eficiência na absorção de nutrientes e métodos para seleção de genótipos. **Embrapa Soja**, ISSN: 2176-2937; n.357, 2014.

GOLÇALVES, V. C.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P.; CARVALHO, S. A.; NETO, O. A. S. Biodisponibilidade de cádmio em fertilizantes fosfatados. **R. Brass. Ci. Solo**, v. 32, p. 2871-2875, 2008.

GOW, A. J.; ISCHIROPOULOS, H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. **Journal of Cellular Physiology**, v. 187, p. 277-282, 2001.

GUERINOT, M. L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes**, v. 1465, p. 190-198, 2000.

GUILHERME, L. R. G. & MARCHI, G. Metais em fertilizantes inorgânicos: Avaliação de risco à saúde após a aplicação. **1. ed. São Paulo: ANDA**, v. 1. 154 p. 2007.

GUILHERME, M. F. S.; OLIVEIRA, H. M.; SILVA, E. Cadmium toxicity on seed germination and seedling growth of wheat *Triticum aestivum*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 499, 2015.

GUIMARÃES, M. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 3, p. 58-68, 2008.

GUPTA, N.; KHAN, D. K.; SANTRA, S. C. Determination of public Health hazerd potential of wastewater reuse in crop production. **Worls Review of Science, Technology and Sustainable Development**, v. 7, n. 4, p. 328-340, 2010.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1-11, 2002.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidantive damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HI, H.; GENOVESE, K. J.; NISBET, D. J; KOGUT, M. H. Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I:C) on nitric oxide induction in chicken peripheral blood monocytes. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 12, p. 3234-3242, 2007.

HENDGES, F. et al. Avaliação enzimática e fisiológica de plântulas de milho submetidas à seca. **Rev. Bra. De Energias Renováveis**, v.4, p. 52-63, 2015.

HONG, J. K. et al. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance, **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, 2008.

IGAMBERDIEV, A. U.; HILL R. D. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: na alternativa to classic fermentation pathways. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2473-2482, 2004.

ISMAEL, M.; ELYAMINE, A.; MOUSSA, M.G.; CAI, M.; ZHAO, X.; HU, C. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. **Metallomics**, v. 11, n. 2, p. 255–277, 2019.

JIAO, X.; CHEN, W.; CHANG, A. C.; PAGE, A. L. Environmental risk of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 44-52, 2012.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace Elements in Soils and Plants**. 3rd ed. CRC Press, London, 2000. p.123 – 167.

KAISER, W. M, et al. 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 875-882, 2002.

KOLB, R. M.; JOLY, C. A. Flooding tolerance of *Tabebuia cassinoides*: metabolic, morphological and growth responses. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, Oxford, v. 204, n. 7, p. 528-535, 2009.

KOPPEN, G.; VERSCHAEVE, L. The alkaline comet test on plant cell: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.360, p.193–200, 1996.

KROON, H.; HUBER H, STUEFER, J. F.; GROENENDAEL, J. M. A modular concept of phenotypic plasticity in plants. **New Phytol**, v. 166, n. 1, p. 73-82, 2005.

KÜPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics, Cambridge**, v. 8, n. 3, p. 269-285, 2016.

KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**. 2nd ed. Springer, printed in India, 2004. p.146-181.

LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 54, p. 109-136, 2003.

LARCHER, W. **Physiological Plant Ecology**. Springer-Verlag, New York. 1995.

LI, C, et al. A review on heavy metals contamination in soil: effects, sources, and remediation techniques. **Soil and Sediment Contamination**, v. 28, n. 4, p. 380–394, 2019. 2009.

LASAT, M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n, 1, p. 109-120, 2002.

LI, S.; YANG, W.; YANG, T.; CHEN, Y.; NI, W. Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi* – a cadmium accumulating plant. **International Journal of Phytoremediation**, v. 17, p. 85-92, 2014.

LIMA, N. R. W et al. Plasticidade fenotípica. **Rev. Ciência Elem**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2017.

LOMBARDO, M.C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J.C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signaling and Behaviour**, v.1, p. 28–33, 2006.

LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULÍK, P. J. White, Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review, **J. Exp. Bot.**, v. 62, p. 21–37, 2011.

MACKERNESS, S. A. H.; JOHN, C. F.; JORDAN, B.; THOMAS, B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Letters**, v. 489, n. 2-3, p. 237-242, 2001.

MAGALHAES, J. R.; PEDROSO, M. C.; DURZAN, D. “Nitric Oxide Apoptosis and Plant Stresses”. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, vol. 5, p. 115–125, 1999.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SOARES, A. M.; GOMES, M. P.; MARTINS, G. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 35, n. 5, p. 997-1006, 2011.

MARTÍNEZ-MEDINA, A.; PESCADOR, L.; TERRÓN-CAMERO, L.C.; POZO, M.J.; ROMERO-PUERTAS, M.C. Nitric oxide in plant–fungal interactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, p. 4489–4503, 2019.

McBRIDE, M.B. & SPIERS, G. Trace element content of selected fertilizers and dairy manures as determined by ICP-MS. **Comm. Soil Sci. Plant Anal.**, v.32, p. 139-156, 2001.

McGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Science Direct**, v. 14, n. 3, p. 277-282, 2003.

MELO JÚNIOR, J. C. F. & BOEGER, M. R. T. Leaf traits and plastic potential of plant species in a lightedaphic gradient from a restinga in southern Brazil. **Acta Biológica Colombiana**, v. 21, p. 51-62, 2016.

MISHINA, T. E.; LANB, C.; ZEIER, J. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces senescence programme in Arabidopsis. **Plan Cell and Environment**, v. 30, p. 39-52, 2007.

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

MUÑIZ, P.; COMA, M. J.; TERÁN, J. Estrés oxidativo y daño vascular en procesos de hipoxia. Malondialdehido (MDA) como biomarcador de daño oxidativo. **Electron J Biomed**, v. 2, p. 46-49, 2014.

NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v.1, n.01; p.234, 2014.

NOCITO, F. F.; LANCILLI, C.; DENDENA, B.; LUCCHINI, B.; SACCHI, G. Cadmium retention in rice roots is influenced by cadmium availability chelation and translocation. **Plant, Cell and Environment**, v. 34, p. 994-1008, 2011.

NORVELL, W.A., WU, J., HOPKINS, D.G., WELCH, R. Association of cadmium in durum wheat grain with soil chlorine and chelate-extractable soil cadmium. **Soil Science Society of America Journal**. v. 64, p. 2162-2168, 2000.

- PAGNUSSAT, G.C.; LANTERI, M.L.; LAMATTINA L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. **Plant Physiology**, v. 132, p. 1241–1248, 2003.
- PEREIRA, F. J., MAGALHÃES, P. C., SOUZA, T. C., CASTRO, E. M., ALVES, J. D. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesq. Agrop. Bras**, 45: 450-456, 2010.
- PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Plant Journal**, v. 32, n. 4, p. 539–548, 2002.
- PERNÍA, B.; DE SOUSA, A.; REYES, R.; CASTRILLO, M. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. **INCI**, v. 33, n. 2, p. 112-119, 2008.
- PIRES, M. F.; CASTRO, E. M.; MAGALHÃES, P. C.; NETA, I. C.; MONTEIRO, A. G. D. P. Etileno e peróxido de hidrogênio na formação de aerênquima em milho tolerante a alagamento intermitente. **Pesq. Agropecuária. Bras.**, Brasília, v. 50, n. 9, p. 779-787, 2015.
- POMAR, I. G. M.; ERQUICIA, E. B.; COLMENA, L. T.; BARRERA, S. Q.; VARGAS, P. L. Concentration of malondialdehyde in subjects living at high altitudes: exploratory study. **Rev. Peru. Med. Exp Salud Publica**, v. 34, n. 4, p. 677-681, 2017.
- POSTMA, J. A and LYNCH, J. P. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. **Plant Physiology**, v.156, p. 1190-1201, 2014.
- PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**. 2nd ed. Springer, printed in India, 2004. p.182-200.
- PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; MARTIN, B. A.; STEWART, C. R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **The Plant Cell**, v. 6, p. 65-74, 1994.
- PUGNAIRE, F. I., SERRANO, L., PARDOS, J. Constraints by water stress on plant growth. In: Pessaraki M (ed) Hand book of plant and crop stress, 2nd edn. Marcel Dekker, Inc., **New York**, pp 271–283, 1999.
- RODRIGUES, A. C. D.; SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidades de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. **Rev. Virtual Quim**, v. 8, n. 1, p. 262-276, 2016.
- RODRIGUEZ, M. S.; MARTINEZ, N. D.; ROMERO, M. C. P.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Toxicidad del cadmio en plantas. **Ecosistemas**, v. 17, n. 3, p. 139-146, 2008.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A.; TERRÓN-CAMERO, L. C.; ROMERO-PUERTAS, M. C. Funciones del óxido nítrico en la respuesta de la planta a la toxicidad por cadmio. **Ecosistemas**, v. 29, n. 2, p. 1-12, 2020.

- ROMERO-PUERTAS, M.C. et al., Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. **New Phytologist**, v.170, p.43-52, 2006.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; PERAZZOLLI, M.; ZAGO, E. D.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling functions in plant-pathogen interactions. **Cell Microbiology**, v. 6, p. 795-803, 2004.
- RODRÍGUES-SERRANO, M.; MARTÍNEZ- DE LA CASA, N.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Toxicidad del cadmio en plantas. **Ecosistemas**, v. 17, n. 3, p. 139-146, 2008.
- SACRAMENTO, B. L.; NETO, A. D. A.; ALVES, A. T.; MOURA, S. C.; RIBAS, R. F. photosynthetic parameters as physiological indicators of tolerance to cadmium stress in sunflower genotypes, **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4, p. 907-916, 2016.
- SALDIVAR, R. H. L.; ARGÜELLO, B. M.; REYES, I. V. Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas elicidadas con nanopartículas. **UAAAN**, p. 80-92, 2016.
- SÁNCHEZ, C.; MATAMOROS GALINDO, M. Á.; BEDMAR, E. J.; DELGADO, M. J.; BECANA AUSEJO, M. **Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en nódulos de leguminosas**. 2011.
- SCAPINELLI, A., DEINA, F. R., JUNIOR, D. D. V., VALADAO, F. C. A., PERERIRA, L. B. Sistema radicular e componente produtivos do girassol em solo compactado. **Pesq. Agrop. Bras**, 75:474-486, 2016.
- SCHÜTZENDÜBEL, A et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, v. 127, p. 887-898, 2001.
- SELIGMAN, K.; SAVIANI, E.E.; OLIVEIRA, H.C.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; SALGADO, I. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, p. 1112–1121, 2008.
- SERKEDIEVA, J. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: Gupta, S.D. (Ed.) - **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield, Science Publishers, p. 275-293, 2011.
- SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-26, 2012.
- 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: From biomolecules to ecosystems**. 2nd ed. Springer, printed in India, 2004. p.84-126.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, G.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, p. 158-167, 2008.

SLESIAK, I.; LIBIK, M.; KARPINSKA, B.; KARPINSKI, S.; MISZALSKI, Z. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. **Acta Biocimica Polonica**, Warszawa, v. 54, N. 1, p. 39-5, 2007.

SOTELO, P. A. et al. Sublethal effects of antibiosis resistance on the reproductive biology of two spittlebug (Hemiptera: Cercopidae) Species affecting *Brachiaria* spp., **Journal of Economic Entomology**, v. 101, Ed 2,1, p. 564-568, 2008.

SOUZA, F. R.; BERGAMIN, A. C.; VENTUROSIO, L. R.; VIERA, M. C.; PELLIN, D. M. P.; MONTANARI, R. Estrutura anatomia de raízes de cana de açúcar cultivada em solo compactado. **Pesq. Agrop. Bras**, 6:423-428, 2013.

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

SOUZA, T.C. de; MAGALHÃES, P.C.; PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M. de; PARENTONI, S.N. Morpho-physiology and maize grain yield under periodic soil flooding in successive selection cycles. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.1877-1885, 2011.

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

SRIDHAR, B. B. M.; DIEHL, S.V.; HAN, F. X.; MONTS, D. L. & SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 131-141, 2005.

STEFFENS, B.; RASMUSSEN, A. The Physiology of adventitious roots. **Plant Physiology**, 170: 603-617, 2016.

SUN, et al. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. **Redo Biología**, p. 01-21, 2020.

TIAN, Q. Y.; SUN, D. H.; ZHAO, M. G.; ZHANG, W. H. Inhibición of nítrico oxide sentase (NOS) hundirles aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. **New Phytologist**, v. 174, p. 322-331, 2007.

TOPPI, L.S.; LAMBARDI, M.; PAZZAGLI, L.; CAPUGGI, G.; DURANTE, M. & GABBRIELLI, R. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. **Plant Science**, v. 137, p.119-129, 1998.

VALLADARES, F et al. The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. **Ecology Letters**, v. 17, p. 1351-1364, 2014.

- VECCHIA, F. D.; LA ROCCA, N.; MORO, I.; DE FAVERI, S.; ANDREOLI, C.; RASCIO, N. Morphogenetic ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**, v. 168, p. 329-338, 2005.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants, *Curr. Opin. Plant Biol*, v. 12, p. 364–372, 2009.
- WANG, Y. S.; YANG, Z. M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, v. 46, p. 1915-1923, 2005.
- WANG, H. H.; HUANG, J. J.; BI, Y. R. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 281-288, 2010.
- WENDEHENNE, D.; DURNER, J.; KLESSIG, D.F. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, p. 449-455, 2004.
- YAMAUCHI T, et al. Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots. **Plant Physiol**, v. 169, p. 180–193, 2015.
- YAMAUCHI T.; FUKAZAWA A.; ANAKAZONO M. METALLOTHIONEIN genes encoding ROS scavenging enzymes are down-regulated in the root cortex during inducible aerenchyma formation in rice. **Plant Signal & Behavior**, v. 12, n. 11, p. 1-4, 2017a.
- YAMAUCHI, T.; COLMER, T. D.; PEDERSEN, O.; NAKAZONO, M. Regulation of root for internal aeration and tolerance to soil waterlogging-flooding stress. **Plant Physiology**, v. 176, n. 2, p.1118-1130, 2018.
- ZENG, F. et al., Cadmium accumulation in plants: Insights from physiological/molecular mechanisms to evolutionary biology. **Authorea**, p. 1-25, 2020.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHANG, Q.; WEI, Q.; ZHANG, W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺ / H⁺ antiport in the tonoplast. **Planta**, v. 224, p. 545-555, 2006.
- ZHAO, M. G.; TIAN, Q. Y.; ZHANG, W. H. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 144, p. 206-217, 2007.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO NA
FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA RADICULAR EM PLANTAS DE MILHO
SARACURA**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da
UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

O desenvolvimento de aerênquima radicular é importante, para plantas sobreviverem a diferentes tipos de estresses ambientais, como o alagamento, seca, alterações nutricionais e metais pesados. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel do cádmio (Cd) e do óxido nítrico (NO), no desenvolvimento de aerênquima radicular, em plantas de milho saracura e outras modificações anatômicas e do sistema antioxidante associadas ao processo. As plantas de milho foram submetidas ao alagamento permanente por 30 dias e sob diferentes concentrações de nitrato de cádmio Cd (NO₃)₂ sendo 0, 10 e 50 µM; e nitroprussiato de sódio Na₂[Fe (CN)₅NO].2H₂O, como doador de óxido nítrico (NO), nas concentrações de 0,05; 0,1 e 0,2 µM. As plantas foram mantidas em solução nutritiva de Hoagland e Arnon a 40% da força iônica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 com cinco repetições. As seguintes variáveis foram analisadas: biometria das raízes, quantificação do H₂O₂ e malondialdeído, a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, desenvolvimento de aerênquima e outros parâmetros da anatomia radicular. O aumento das concentrações tanto de Cd quanto do NO reduziram a massa seca das raízes. O Cd promoveu estresse oxidativo nas raízes aumentando a produção de malondialdeído, contudo o NO não teve efeito neste parâmetro. O NO reduziu a quantidade de H₂O₂ nas raízes. O Cd não promoveu modificações na atividade da peroxidase do ascorbato, mas aumentou a atividade da catalase. O NO reduziu a atividade da superóxido dismutase e aumentou a atividade da catalase, mas não teve efeito na peroxidase do ascorbato. O Cd estimulou o desenvolvimento de aerênquima com o aumento da área e proporção deste tecido no córtex radicular, enquanto o NO teve efeito contrário, inibindo a formação desse tecido. O Cd e o NO promoveram modificações nas espessuras das barreiras apoplásticas e outros tecidos radiculares. O Cd estimula a produção de espécies reativas de oxigênio que estimulam o desenvolvimento de aerênquima radicular no milho saracura, o NO reduz a formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente o H₂O₂, reduzindo o desenvolvimento de aerênquima.

Palavras-chave: Anatomia radicular. Nitroprussiato de sódio. Metais pesados. *Zea mays* L.

ABSTRACT

The development of root aerenchyma is important for plants to survive different types of environmental stresses such as flooding, drought, nutritional changes and heavy metals. This study aimed to evaluate the role of cadmium (Cd) and nitric oxide (NO) in the development of root aerenchyma in saracura corn plants and other anatomical and antioxidant changes associated with the process. The corn plants were subjected to permanent flooding for 30 days and under different concentrations of cadmium nitrate Cd (NO₃)₂ being 0, 10 and 50 μM; and sodium nitroprusside Na₂ [Fe(CN)₅NO].2H₂O as donor of nitric oxide (NO) in concentrations of 0.05; 0.1 and 0.2 μM. The plants were maintained in Hoagland and Arnon nutrient solution at 40% of ionic strength. The experimental design was completely randomized in a 3x3 factorial scheme with five replications. The following variables were analyzed: root biometry, quantification of H₂O₂ and malondialdehyde, the activity of the enzymes catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase, development of aerenchyma and other parameters of the root anatomy. Increased concentrations of both Cd and NO reduced the dry mass of the roots. Cd promoted oxidative stress in the roots, increasing malondialdehyde production, however NO had no effect on this parameter. NO reduced the amount of H₂O₂ in the roots. The Cd did not promote changes in the activity of ascorbate peroxidase but increased the activity of catalase. NO reduced superoxide dismutase activity and increased catalase activity but had no effect on ascorbate peroxidase. Cd stimulated the development of aerenchyma by increasing the area and proportion of this tissue in the root cortex while NO had the opposite effect, inhibiting the formation of this tissue. Cd and NO promoted changes in the thickness of apoplastic barriers and other root tissues. Cd stimulates the production of reactive oxygen species that stimulate the development of root aerenchyma in corn, NO reduces the formation of reactive oxygen species, mainly H₂O₂, reducing aerenchyma development.

Keywords: Root anatomy. Sodium nitroprusside. Heavy metal. *Zea mays* L.

1 INTRODUÇÃO

Estudos têm relatado o desenvolvimento de aerênquima cortical radicular, em plantas sob a influência de alagamento (PEREIRA et al., 2008; 2010), compactação de solo (BERGAMIN et al., 2010; SCAPINELLI et al., 2016; SOUZA et al., 2013), seca e restrição de fósforo (DÍAZ et al., 2018), nutrição mineral (COELHO et al., 2006; POSTMA and LYNCH, 2011; STEFFENS and RASMUSSEN, 2016) e contaminação por Cd (LI et al., 2019). O desenvolvimento de aerênquima é uma adaptação que permite às plantas ter maior tolerância a baixas disponibilidades de oxigênio (COAN et al., 2002), facilita a difusão interna de gases (COLMER, 2003) e reduz custos metabólicos para o crescimento (DIAZ et al., 2018). A formação desse tecido pode ser induzida pela morte celular das células corticais (YAMAUCHI, et al., 2017).

A formação de aerênquima lisígeno é estimulada pela hipóxia, mediante a produção de etileno, que induz a morte celular programada (PIRES et al., 2015; YAMAUCHI, et al., 2017). No entanto a redução do oxigênio induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020). Em baixos níveis, as EROs agem como sinalizadoras, em respostas ao estresse, porém geram estresse oxidativo em altas concentrações (ROMERO-PUERTAS et al., 2019). Os estresses ambientais promovem um desequilíbrio metabólico às plantas (FORMsAN et al., 2010; LIU, et al., 2020), produzindo moléculas instáveis e altamente reativas, como o peróxido de hidrogênio H_2O_2 e óxido nítrico (NO) (BARREIROS et al., 2016).

As plantas podem reagir ao aumento excessivo das EROs, ativando o sistema antioxidante, que as protege contra danos celulares (SALDIVAR et al., 2016). Enzimas, como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), são parte do sistema antioxidante enzimático e reduzem o estresse oxidativo (NASCIMENTO & BARRIGOSSI, 2014; SALVIDAR et al., 2016). A presença de estresse oxidativo, causado por fatores abióticos como o Cd, produto do resultado de atividades antropogênicas (EDELSTEIN & BEM-HUR, 2018), afeta processos fisiológicos, metabólicos e bioquímicos, provocando alterações estruturais nas plantas (KASIM, 2006).

O NO é uma molécula gasosa capaz de se difundir por intermédio das membranas celulares (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020), atuando na proteção contra estresse oxidativo e sinalização e em respostas aos estresses ambientais (BELIGNI & LAMATTINA, 2001; DOMINGO et al., 2015). O NO pode reduzir a toxicidade por metais pesados (ARASIMOWICZ-JELONEK et al., 2011; NABAEI & AMOOAGHAEI, 2020), reduzindo o

acúmulo de chumbo em gergelim (AMOOAGHAEI et al., 2017) e de arsênio em arroz (SINGH et al., 2017). O NO desenvolve importante função na regulação da toxicidade das EROs (PIRES et al., 2016), pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes (TERRÓN-CAMERO et al., 2019). As EROs e o NO são necessários ao desenvolvimento da morte celular programada (DELLEDONNE et al., 1998). Segundo Wany et al. (2017), o NO e o etileno desempenham um papel importante na formação de aerênquima lisígeno. Níveis reduzidos de NO podem reduzir a formação de aerênquima em plantas cultivadas sob amônio (Wang, et al., 2013).

Em razão da importância do óxido nítrico, como uma molécula multifuncional e citoprotetora, é de importância nos processos fisiológicos, anatômicos e bioquímicos nas plantas. A hipótese deste trabalho é que o H_2O_2 pode estimular a formação de aerênquima enquanto o NO atua como um antagonista no processo por reduzir a formação de EROs. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do Cd na produção de H_2O_2 e a relação com a formação de aerênquima e crescimento radicular, utilizando o NO como um antagonista do estresse oxidativo nas raízes de milho e do processo de formação de aerênquima cortical.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal consistiu em plântulas de milho BRS 4154 - Saracura, considerado como uma variedade de milho tolerante a alagamento. As sementes foram fornecidas pela Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, Minas Gerais. O experimento foi executado na casa de vegetação do departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil (21°14'43''S, 45°59'59''W).

As sementes foram germinadas em vermiculita sob temperatura ambiente, luz constante, e irrigadas à capacidade de campo. Plântulas de aproximadamente 10 cm de altura foram transferidas para vasos plásticos, preenchidos com 3 L de vermiculita e irrigados à capacidade de campo por 15 dias, para a aclimação das plântulas. Após esse tempo, o substrato foi alagado, formando uma lâmina de 1 cm acima do nível da vermiculita. De sete em sete dias, foram aplicados: Cd (NO₃)₂ a 0, 10 e 50 µM; e Na₂ [Fe (CN)₅NO].2H₂O como doador de NO a 0,05; 0,1 e 0,2 µM e, também, foi aplicada solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950) a 40% da força iônica. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 com cinco repetições.

Após 30 dias de experimento, raízes foram coletadas e a massa fresca foi medida em balança analítica, posteriormente, as raízes foram secas em estufa a 60°C por 72 horas e a massa seca foi mensurada em balança analítica. Parte das raízes ainda frescas foi coletada em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a data das análises bioquímicas, e raízes completas foram coletadas aos 30 dias e fixadas em F.A.A. 70% (formaldeído: ácido acético: etanol 70%, 0,5: 0,5: 9,0 v v⁻¹), por 72 h (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em etanol 70% até a análise anatômica.

Posteriormente, 200 mg de raízes foram maceradas em solução de 1500 µL, contendo polivinilpirrolidona (PVPP) e ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Em seguida, foi centrifugada a 12000 g por 15 min, a 4°C; o sobrenadante foi coletado e mantido a -20° C até a data das análises.

Para a quantificação do H₂O₂, foram retirados 45 µL do sobrenadante e adicionados a 45 µL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7, 90 µL iodeto de potássio 1 M. Uma curva padrão de peróxido de hidrogênio foi preparada com uma solução 250 µM de H₂O₂. As amostras foram avaliadas em duplicata em espectrofotômetro a 390 nm (VELIKOVA et al., 2000).

Para a quantificação do malondialdeído (MDA), 125 µL do sobrenadante foram adicionadas a 250 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% e ácido tricloroacético 10% a

95° C por 30 min. As amostras foram colocadas em placa em duplicata e a reação paralisada por esfriamento rápido e realizada a leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm (BUEGE e AUST, 1978).

Para a extração CAT, APX e SOD, 200 mg de raízes foram macerados em nitrogênio líquido e PVPP, o material foi adicionado a 1.500 µL de tampão de extração: fosfato de potássio 400 mM, pH 7.8 (375 µL); EDTA 10 mM (15 µL); ácido ascórbico 200 mM (75 µL), água destilada (1.035 µL). A solução foi centrifugada a 13.000 g por 10 min e 4° C, coletando-se o sobrenadante que foi armazenado a -20° C (BIEMEL et al., 1998).

A atividade da CAT foi avaliada, utilizando-se tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7.0 (90 µL), água destilada (72 µL) e H₂O₂ 250 mM (9 µL), por reação. Foram pipetados 6 µL da amostra, em triplicata, e a absorbância foi avaliada em espectrofotômetro a 240 nm de 15 em 15 segundos durante 3 min (HAVIR E MCHALE, 1987).

A atividade da APX foi avaliada, utilizando-se tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7.0 (90 µL), ácido ascórbico 10 mM (9 µL), água destilada (63 µL) e peróxido de hidrogênio 2 mM (9 µL). Foram pipetados 6 µL da amostra e avaliada em espectrofotômetro a 290 nm de 15 em 15 segundos por três minutos (NAKANO e ASADA, 1981).

A atividade da SOD foi avaliada, utilizando-se tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7.8 (100 µL); metionina 70 mM (40 µL); EDTA 10 µM (3 µL); água destilada (30 µL); NBT 1 mM (15 µL) e riboflavina 0,2 mM (2 µL). Foram adicionados 6 µL da amostra, em triplicata, logo depois, as amostras foram iluminadas durante 7 min, e a absorbância avaliada em espectrofotômetro a 560 nm (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977).

Para as análises anatômicas, cortes transversais da região pilífera das raízes (10 cm distante do ápice) foram realizados manualmente. Os cortes foram clarificados em hipoclorito de sódio 50% (v v⁻¹), lavados em água destilada, durante 10 minutos e corados em safrablau (1% de safranina e 0,1% de azul de astra na proporção de 3:7), sendo confeccionadas lâminas semipermanentes em glicerol 50% (KRAUS E ARDIUM, 1997).

Foi confeccionada uma lâmina por repetição, na qual nove campos de nove seções diferentes foram analisados. Imagens foram obtidas em microscópio Olympus CX31 (Olympus, Tokyo, Japão) e analisados no programa de imagens ImageTool, versão 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, EUA). Os parâmetros avaliados foram: espessura da epiderme, espessura do córtex, proporção do córtex, espessura da endoderme, diâmetro de vasos de xilema e proporção do cilindro vascular e proporção de aerênquima radicular.

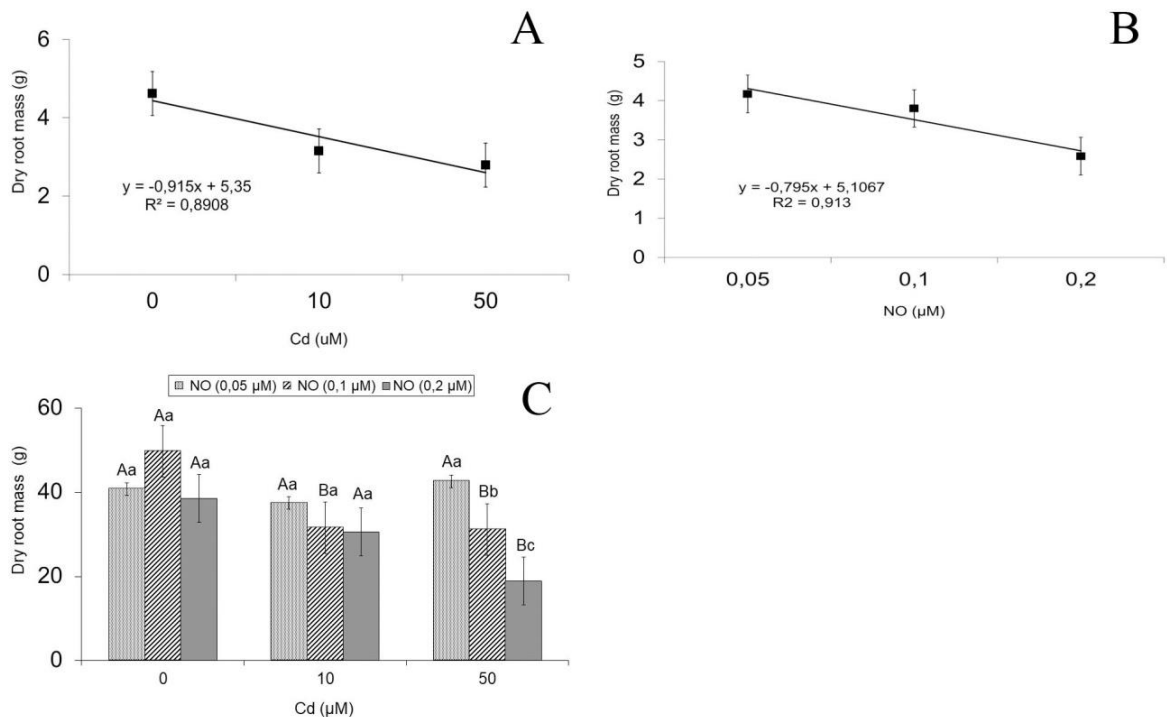
A média foi calculada para cada repetição, quando os dados foram obtidos por duplicada, triplicata ou para os diferentes campos avaliados para os dados anatômicos. Os

dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05 ou regressão, utilizando-se o software Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

Não houve interação para a massa seca radicular entre os fatores avaliados ($p > 0.05$), sendo que o Cd e o NO promoveram redução na massa seca radicular do milho (Fig. 1A e B). Para a massa fresca, ocorreu interação entre Cd e NO. Na concentração de $0.05 \mu\text{M}$ de NO, não houve efeito do Cd na massa fresca, contudo, nas maiores concentrações de NO, maiores concentrações de Cd reduziram esse parâmetro nas raízes de milho (Fig. 1C). Além disso, nas concentrações de 0 e $10 \mu\text{M}$ de Cd, maiores concentrações de NO não afetaram a massa fresca radicular, mas, na concentração de $50 \mu\text{M}$ de Cd, maiores concentrações de NO reduziram esse parâmetro nas raízes do milho (Fig. 1C).

Figura 1 - Biometria das raízes de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd (A), óxido nítrico (B) e a interação desses fatores (C).

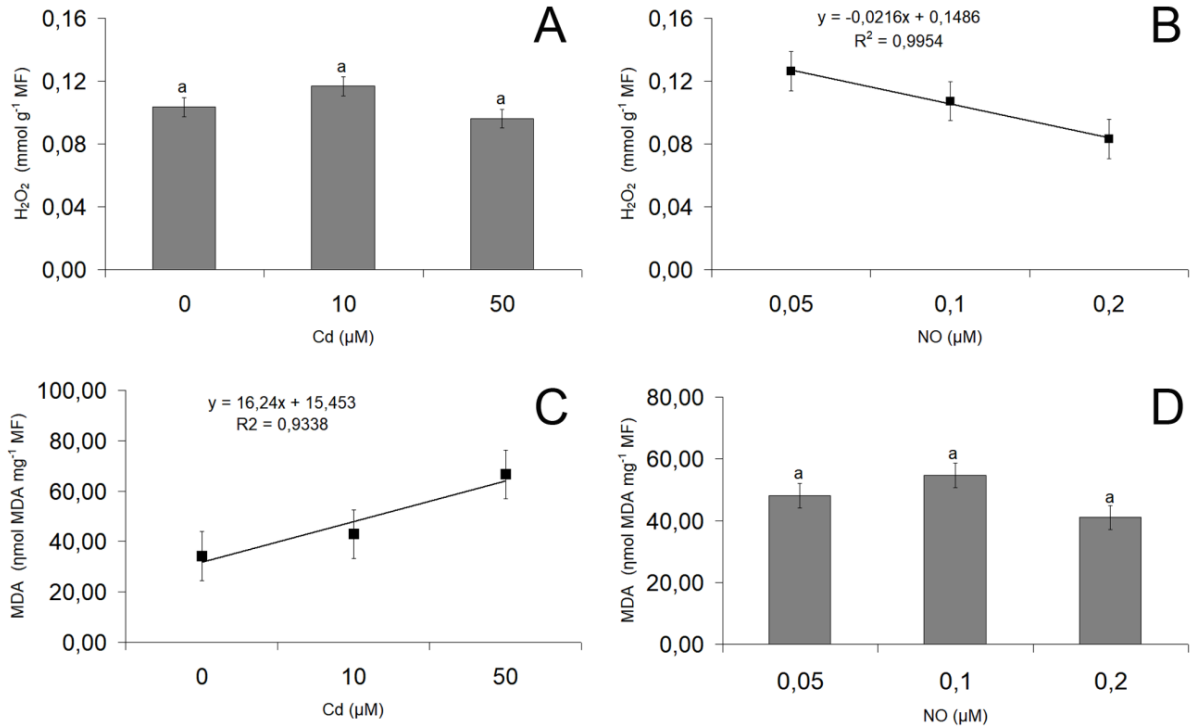


Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$ (A e B). As médias seguidas de mesma letra maiúscula (Cd) e minúscula (NO) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$ (C). Barras: o erro padrão.

Não houve interação das concentrações de Cd e NO para o conteúdo de H_2O_2 ou MDA ($p \geq 0.22$). O Cd não promoveu modificações significativas no conteúdo de H_2O_2 (Fig. 2A), contudo maiores concentrações de NO reduziram gradualmente esse parâmetro (Fig. 2B). O Cd aumentou o conteúdo de MDA proporcionalmente à concentração do metal (Fig.

2C) enquanto o NO não teve efeito significativo nesse parâmetro nas raízes de milho (Fig. 2D).

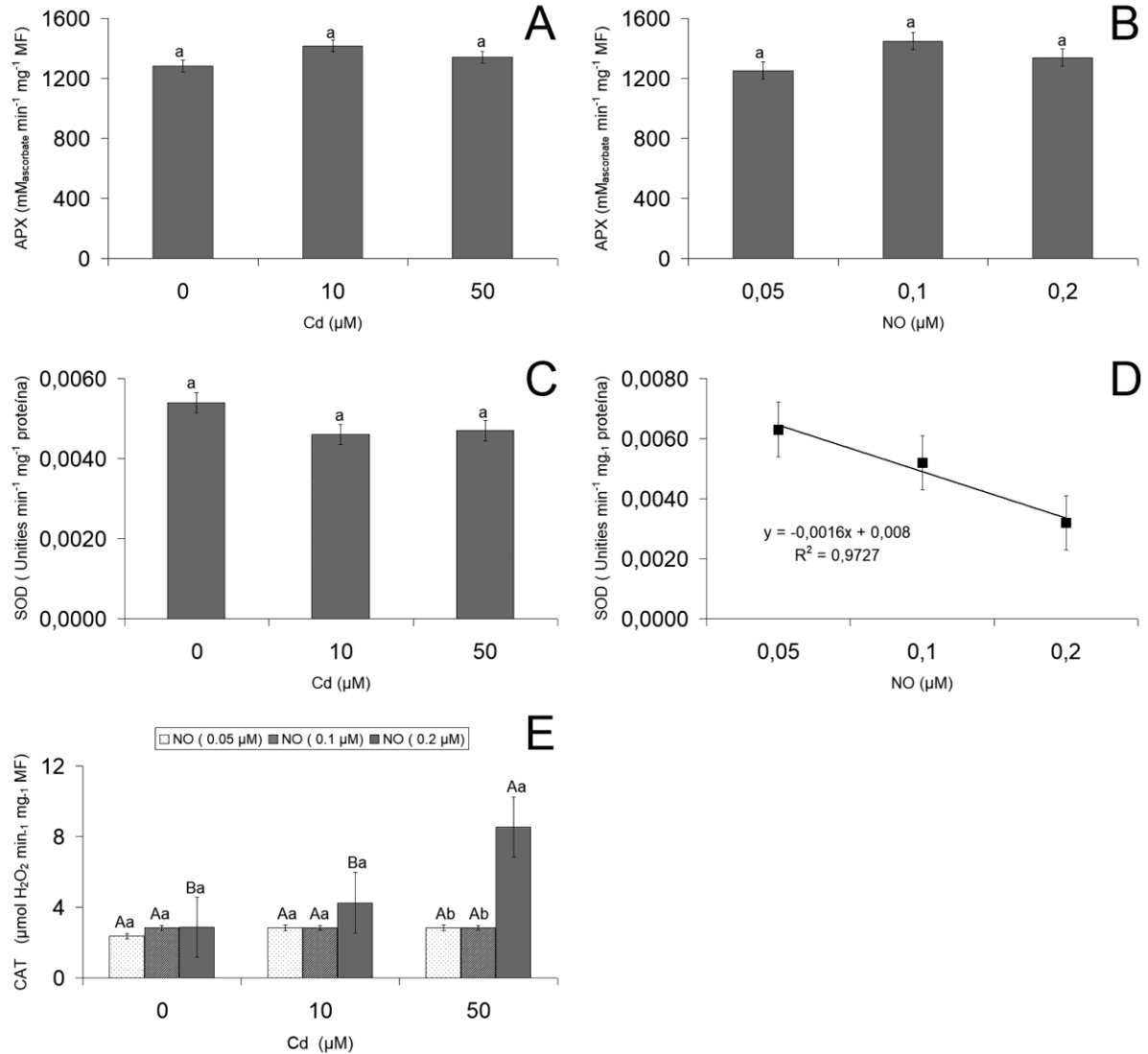
Figura 2 - Indicadores de estresse oxidativo em raízes de milho saracura submetidas a diferentes concentrações de Cd (A, C) e óxido nítrico (B, D).



Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. Barras: o erro padrão.

Não houve interação entre as concentrações de Cd e NO, para a atividade da APX e SOD ($p \geq 0,59$), mas houve interação para a atividade da CAT ($p < 0,0001$). O Cd e NO não promoveram modificações significativas na atividade da APX (Fig. 3A e B). O Cd também não modificou significativamente a atividade da SOD (Fig. 3C), mas o NO promoveu uma redução na atividade dessa enzima proporcional à concentração do composto (Fig. 3D). Além disso, o Cd não promoveu modificações significativas na atividade da CAT, nas concentrações de 0,05 e 0,1 μM de NO, mas aumentou a atividade da enzima na concentração de 0,02 μM de NO (Fig. 3E). Nas concentrações de 0 e 10 μM de Cd, o aumento das concentrações de NO não promoveu modificações significativas na atividade da CAT, mas sob 50 μM de Cd, 0,02 μM de NO aumentou a atividade da enzima (Fig. 3E).

Figura 3 - Atividade de enzimas do sistema antioxidante em raízes de milho saracura submetidas a diferentes concentrações de Cd (A e C) e óxido nítrico (B e D) e a interação desses fatores (E).

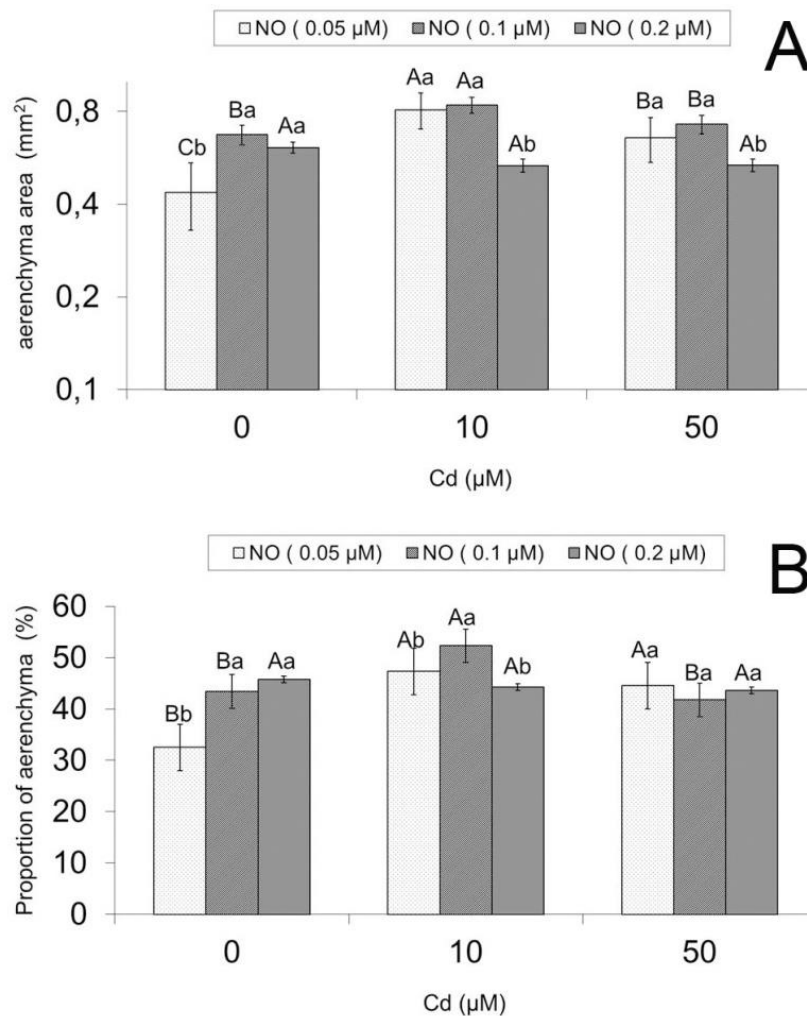


Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$ (A, B, C e D). As médias seguidas de mesma letra maiúscula (Cd) e minúscula (NO) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$ (E). Barras: o erro padrão.

Todas as variáveis anatômicas apresentaram interação entre Cd e NO. Na concentração de 0,05 NO, o Cd promoveu um aumento na área de aerênquima em relação ao tratamento sem esse metal (Fig. 4A). A concentração de 10 μM de Cd aumentou a área de aerênquima, na concentração de 0,1 μM de NO, mas 50 μM de Cd reduziu esse parâmetro para valores semelhantes aos encontrados em 0 μM de Cd (Fig. 4A). É interessante notar que, na ausência de Cd, maiores concentrações de NO aumentaram a área de aerênquima, mas, na presença de Cd, o 0,2 μM de NO reduziu a área de aerênquima (Fig. 4A). Maiores

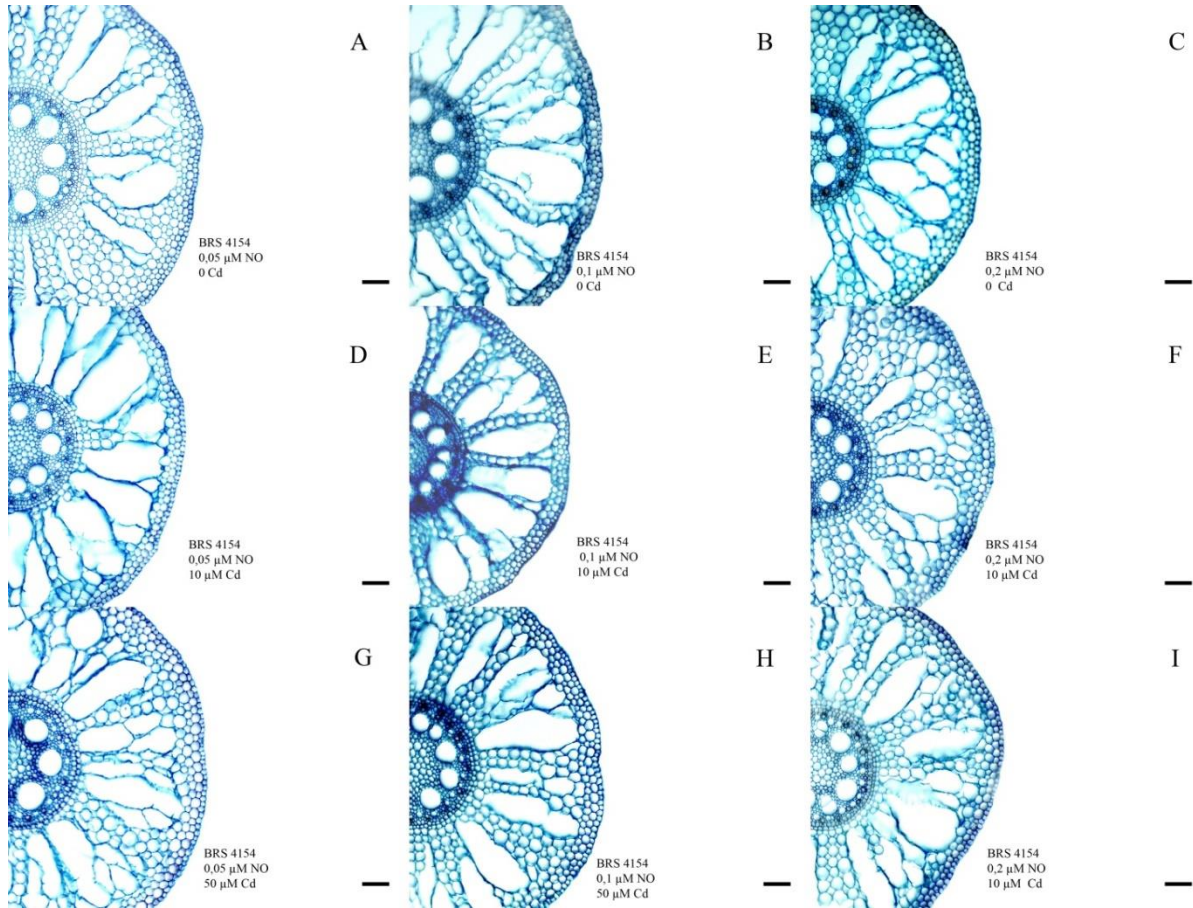
concentrações de Cd também aumentaram a proporção de aerênquima nas menores concentrações NO (0,05 e 0,1), contudo 0,2 μM de NO impediram o aumento na proporção de aerênquima promovido pelo Cd (Fig. 4B). O aumento no NO aumentou a proporção de aerênquima, na ausência de Cd, porém, na presença de 10 μM de Cd, apenas a concentração de 0,1 μM de NO aumentou a proporção de aerênquima, enquanto sob 50 μM de Cd o NO não teve efeito nesse parâmetro (Fig. 4B).

Figura 4 - Modificações no aerênquima cortical em raízes de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.



Nota: As médias seguidas de mesma letra maiúscula (Cd) e minúscula (NO) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$ (E). Barras: o erro padrão.

Figura 5 - Modificações no aerênquima cortical em raízes de milho saracura submetidas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico. 0 Cd (A, B, C); 10 μM Cd (D, E, F); 50 μM Cd (G, H, I) e 0,05 μM NO (A, D, G); 0,1 μM NO (B, E, H); 0,2 μM NO (C, F, I).

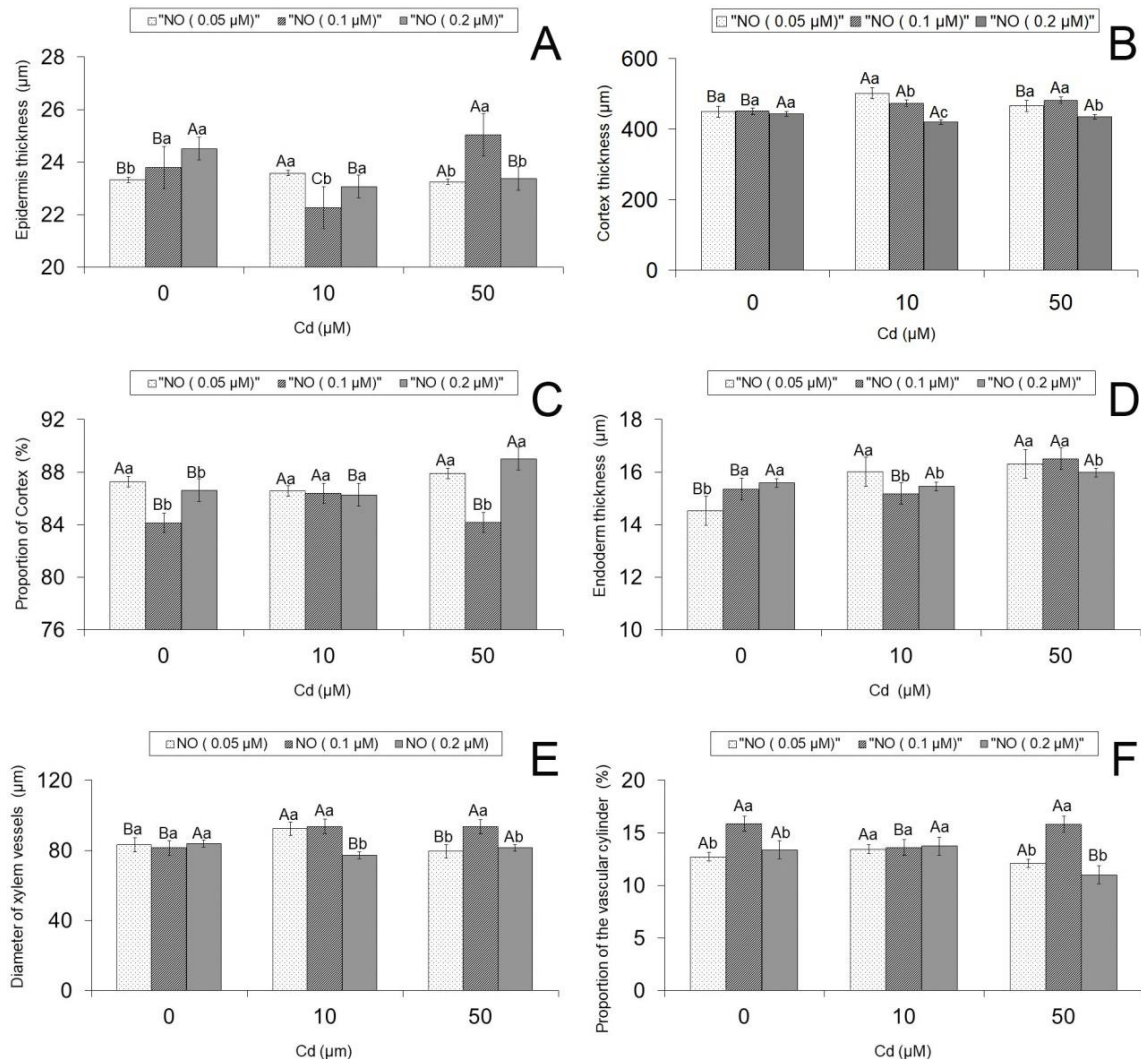


Nota: As barras indicam o erro padrão. A barra corresponde a 100 μm .

O Cd aumentou a espessura da epiderme, nas menores concentrações de NO, todavia, sob 0,2 μM de NO, o Cd reduziu esse parâmetro nas raízes de milho (Fig. 6A). Maiores concentrações de NO aumentaram a espessura da epiderme, na ausência de Cd, enquanto promoveram oscilações na presença do metal, mas com valores semelhantes ao controle (Fig. 6A). Maiores concentrações de Cd aumentaram a espessura e proporção do córtex, nas menores concentrações de NO, entretanto, sob 0,2 μM de NO, o metal não teve efeito significativo (Fig. 6B e C). Sob 0,05 μM de NO, o aumento do Cd não modificou significativamente a espessura do córtex, mas o metal reduziu este parâmetro nas maiores concentrações de NO (Fig. 6B e C). A concentração de 50 μM de Cd aumentou a espessura da endoderme, nas raízes de milho nas menores concentrações de NO, contudo, sob 0,02 μM de NO, não houve efeito significativo do Cd (Fig. 6D). Na ausência de Cd, as maiores concentrações de NO aumentaram a espessura da endoderme, contudo, na presença do metal,

maiores concentrações de NO reduziram esse parâmetro (Fig. 6D). O Cd aumentou o diâmetro dos vasos de xilema, nas menores concentrações de NO, mas reduziu esse parâmetro na concentração de 0,2 μM de NO (Fig. 6E). O NO não modificou o diâmetro de vasos do xilema na ausência de Cd, mas 0,2 μM de NO reduziram esse parâmetro sob 10 μM do metal e 0,1 μM de NO aumentou essa variável sob 50 μM de Cd (Fig. 6E). O Cd não promoveu modificações, na proporção do cilindro vascular na menor concentração de NO, mas reduziu esse parâmetro nas maiores concentrações (Fig. 6F). O NO promoveu um aumento seguido de redução na proporção do cilindro vascular, nas concentrações de 0 e 50 μM de Cd, mas não teve efeito na concentração de 10 μM do metal (Fig. 6F).

Figura 6 - Modificações anatômicas em raízes de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.



Nota: As médias seguidas de mesma letra maiúscula (Cd) e minúscula (NO) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$ (E). Barras: o erro padrão.

4 DISCUSSÃO

A redução da massa fresca e massa seca do sistema radicular de plantas de milho saracura pode-se considerar como um indicador do estresse oxidativo causado pela presença de altas concentrações de Cd e NO. Segundo Willinghoefer et al. (2020), o Cd prejudica a estrutura celular e o metabolismo das plantas, provocando problemas no crescimento e desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea da planta. Contudo o Cd é alocado, em maiores concentrações no sistema radicular, reduzindo a quantidade desse poluente que é transportado para as folhas (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2009). A toxicidade do Cd afeta a produção de biomassa tanto radicular e da parte aérea das plantas, limitando seu crescimento e desenvolvimento (BOFFE et al., 2017). Portanto a redução do crescimento radicular pela adição de Cd é uma resposta esperada no milho, porém o NO promoveu efeito semelhante na massa seca quando em altas concentrações.

É importante ressaltar que o NO, na concentração de 0,05 μM , inibiu a toxicidade do Cd na massa fresca radicular do milho. Dessa forma, baixas concentrações de NO demonstram exercer proteção aos efeitos do Cd, enquanto altas concentrações de NO podem atuar como agente estressante para as raízes de milho. A redução de crescimento promovida pelo NO pode estar relacionada à menor formação de aerênquima radicular, nas plantas de milho, o que promove estresse por hipóxia. Conforme Kotapati et al. (2017), a utilização do nitroprussiato de sódio, como doador de NO, inibiu a toxicidade do níquel e aumentou a proporção de massa fresca e seca nas raízes e brotos de milheto. Estudos feitos com arroz, Singh et al. (2017) e trigo, Tian e Lei. (2006), têm demonstrado que baixas concentrações de NO estimulam o crescimento e o aumento de biomassa radicular por reduzir a produção de EROs. Segundo Dusse et al. (2003), as altas concentrações de NO geram toxicidade nas plantas. Dessa forma, a literatura corrobora os resultados obtidos, para o presente experimento com o milho, mostrando que, em baixas concentrações, o NO pode reduzir a toxicidade do Cd para a raiz, mas também causa estresse em altas concentrações.

O Cd não aumentou significativamente o conteúdo de H_2O_2 nas raízes de milho, no entanto esse resultado é interessante e está relacionado com outras das características avaliadas. O estresse oxidativo é causado por diferentes EROs, como o superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e não apenas pelo H_2O_2 . O $\text{O}_2\cdot^-$ é considerado como uma das principais EROs produzidas indiretamente pelo Cd (GUPTA et al., 2016). O Cd gera radicais livres de forma indireta, pela ligação de resíduos sulfrídricos, produzindo indiretamente espécies reativas de oxigênio (WAALKES 2003). As EROs inibem enzimas e causam danos a membranas, prejudicando a

cadeia respiratória e o crescimento (GUPTA et al., 2016; SANDALIO et al., 2012). O Cd certamente promoveu estresse oxidativo nas raízes de milho, pois o MDA aumentou significativamente e esse composto está relacionado com a destruição das membranas celulares pelo estresse oxidativo e houve significativa redução de crescimento do órgão. Segundo Gutiérrez-Martínez et al. (2020), o Cd aumenta os níveis de MDA e H_2O_2 , em plantas de feijão, em função do estresse oxidativo. No caso das raízes de milho, a ausência efeito do Cd, no acúmulo de H_2O_2 , pode estar relacionado com a presença de NO em todos os tratamentos.

O NO reduziu o conteúdo de H_2O_2 nas raízes de milho e não promoveu acúmulo de MDA. É importante destacar que o NO reduz o estresse oxidativo por diminuir o conteúdo de H_2O_2 nas raízes de milho, indicando que o aumento nos níveis de MDA promovido pelo Cd tem relação com outras EROs. Segundo Gadelha et al. (2017), em *Jatropha curcas*, o NO também reduz o conteúdo de H_2O_2 . O NO pode reduzir a produção de EROs induzidas por metais pesados de duas maneiras: primeira, por ser um radical livre, o NO pode neutralizar as EROs reagindo com elas; a segunda forma é realizando uma sinalização que estimula o sistema antioxidante (SINGH et al., 2017). No caso das raízes de milho, o NO parece ter agido diretamente na redução de H_2O_2 por estimular a atividade da CAT que reduz essa substância.

A atividade da APX não foi alterada pelo Cd ou NO e a SOD não foi modificada pelo Cd. O NO, contudo reduziu a atividade da SOD o que pode ter tido efeito também na redução do conteúdo de H_2O_2 . A ausência de efeito do Cd na SOD foi também observada em rabanete (VITÓRIA et al., 2001), girassol (LASPINA et al., 2005), café (GOMES-JUNIOR et al., 2006), entre outras espécies. A SOD consome $O_2^{\cdot-}$ como substrato, produzindo H_2O_2 (Moller et al. 2007), e isso indica que, como o NO reduziu a atividade da SOD, promoveu a redução no conteúdo de H_2O_2 . Além disso, o NO atuou na redução do conteúdo de H_2O_2 por aumentar a atividade da atividade da CAT, que consome H_2O_2 como substrato, produzindo água e oxigênio (Moller et al., 2007). Portanto o NO gerou duas respostas que claramente reduziram o conteúdo de H_2O_2 que foram a redução da atividade da SOD e aumento na CAT. É possível atribuir aumento no MDA nas raízes de milho a um acúmulo de $O_2^{\cdot-}$ ou outras EROs e não ao H_2O_2 .

É importante destacar que o desenvolvimento de aerênquima cortical, nas raízes do milho, demonstrou ter sido diretamente influenciada pelo conteúdo de H_2O_2 neste experimento. Neste contexto, a formação de aerênquima foi aumentada pelo Cd e reduzida pelo NO, mas pela influência desses compostos na produção de H_2O_2 . A formação de

aerênquima radicular, nas plantas de milho saracura, é indispensável para tolerar ambientes sob hipóxia (PEREIRA et al., 2008, 2010). Entende-se que a formação desse tecido é induzida por estresses ambientais que estimulam a produção de etileno, que regula a produção de EROs levando à morte celular programada (GEISLER-LEE et al., 2010; PIRES et al., 2015). O presente trabalho não questiona essa formação, mas acrescenta uma importante novidade que é o papel direto do H_2O_2 na formação do tecido, e metais pesados ou outros fatores, que geram esse composto, estimulam a formação de aerênquima radicular, enquanto moléculas inibidoras reduzem a formação do tecido. A formação de H_2O_2 pode ocorrer nas mitocôndrias, transferindo elétrons para o O_2 e formando $O_2^{\cdot-}$ que, posteriormente, recebe mais elétrons e é convertido para H_2O_2 ou é usado pela SOD que também gera H_2O_2 como produto (RAJHI and MHADHBI, 2019; Moller et al., 2007). O H_2O_2 atua como sinalizador necessário, para a morte celular programada induzida por etileno e é suficiente para promovê-la (STEFFENS & SAUTER, 2009; STEFFENS, et al., 2011; NI et al., 2019). Segundo Steffens et al., (2011), o H_2O_2 pode influenciar a morte celular programada e, conseqüentemente, o aerênquima lisígeno em caules de arroz. Segundo BASU et al. (2020), EROs e espécies reativas de nitrogênio podem regular a morte celular programada, facilitando a formação de aerênquima lisígeno em raízes de arroz. Dessa forma, a formação de aerênquima radicular nas plantas de milho está diretamente relacionada com a concentração de H_2O_2 nas raízes da planta e é estimulada pelo Cd e reduzida pelo NO.

O aumento da espessura da epiderme e endoderme, na presença do Cd e NO, mostra plasticidade da raiz para a redução da absorção de Cd. A epiderme pode atuar como tecido de acúmulo de cádmio e evitar sua alocação nos tecidos internos da raiz. Segundo Marques et al. (2011), o aumento na espessura da epiderme pode ampliar o papel de filtro biológico para os íons metálicos como o Cd. Portanto o aumento da espessura da epiderme funciona como barreira, para diminuir o fluxo de Cd para o interior da planta, sendo uma modificação benéfica às raízes de milho saracura. Segundo Li et al., (2019), quando a endoderme apresenta um aumento da suberina, retém mais Cd nas raízes, reduzindo o transporte desse metal. É importante ressaltar que maiores concentrações de NO reduziram a espessura da epiderme e endoderme, demonstrando um efeito antagônico à sinalização pelo Cd que estimula o espessamento desses tecidos. Como a espessura da epiderme tende a aumentar apenas na presença de maiores concentrações de NO e ausência do Cd, isso indica que o NO adota uma função protetora na presença de Cd, mas causa estresse, em altas concentrações, na ausência desse metal.

O córtex, além de ser a maior região na raiz, serve como uma barreira para a absorção de Cd, pois é um local para a alocação do metal nas células da raiz. A presença de Cd tende a aumentar a espessura do córtex, com o propósito de ter maior distância ao movimento de íons pela raiz, reduzindo a absorção de poluentes, além de permitir e se alocar o Cd na raiz, evitando problemas na parte aérea. Efeito semelhante foi observado em plantas sob contaminação por Cd (QI et al., 2020), mercúrio (WANG et al., 2015) e chumbo (RIBEIRO et al., 2015). O espessamento das barreiras apoplásticas está relacionado com o acúmulo de metais pesados no sistema radicular (SHARMA & DUBEY, 2005). Porém as maiores concentrações de NO atuam como inibidor do estresse causado pelo Cd e, conseqüentemente, reduziu as espessuras das barreiras apoplásticas, podendo favorecer a absorção de Cd. A redução da proporção do córtex pode beneficiar no aumento do fluxo de água e nutrientes, tornando-o mais funcional (CORRÊA et al., 2017), contudo isso facilita a absorção de Cd. Estudos demonstram que o NO pode reduzir a toxicidade por Cd, além de incrementar a tolerância das plantas a esse metal (RODRÍGUEZ-GONZÁLES et al., 2020; ROMERO-PUERTAS et al., 2019). Nas concentrações menores de Cd, o NO estimulou o aumento da proporção e espessura do córtex, com o objetivo de diminuir a absorção e transporte de grandes quantidades de Cd. Segundo Qi et al. (2020) observaram, em plantas de arroz, ocorre maior acúmulo de Cd nas barreiras apoplásticas radiculares. Percebe-se que, em função do NO possuir um efeito antagônico ao Cd, as respostas radiculares que, normalmente, evitariam a absorção do poluente (aumento da espessura do córtex, epiderme e endoderme) são revertidos pelo NO, permitindo maior entrada de Cd nas plantas em altas concentrações de NO. Dessa forma, parte da redução de crescimento radicular, promovido por maiores concentrações de NO, também, decorre desse efeito, que pode ser evitado, aplicando-se menores concentrações dessa molécula.

A função das barreiras apoplásticas é bloquear o transporte radial de água e de solutos, reduzindo assim a translocação de íons dissolvidos ao xilema e, posteriormente, seu transporte para a parte aérea da planta (KRESZIES et al., 2018; QI et al., 2020). Embora maiores concentrações de Cd aumentam a proporção do córtex, que significa que a raiz apresenta uma estrutura mais fina com um córtex maior, esse aumento do córtex serve como uma estratégia de defesa, para reduzir o fluxo de Cd ao interior das plantas de milho saracura. No entanto maiores concentrações de NO diminuíram a proporção do córtex. O NO desenvolveu um papel antagônico na presença do Cd, no qual funcionou como um agente inibidor dos efeitos do Cd deixando mais susceptíveis as raízes de milho saracura. Pesquisas têm relatado a função do NO como agente protetor e inibidor dos danos da toxicidade do Cd e outros metais

altamente contaminantes (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020). É importante a regulação dos níveis de NO exógeno, já que, dependendo da quantidade moderada ou em excesso, pode reagir como molécula sinalizadora ou molécula estressora nas plantas de milho saracura. Em nossos resultados da endoderme, à medida que aumentavam as concentrações de Cd, em função a menores concentrações de NO, a espessura desse tecido aumentava com o propósito de evitar o passo do Cd ao cilindro vascular e protegendo, assim, contra a toxicidade do Cd. Resultados similares foram relatados por Qi et al., (2020), em plantas de arroz, em que observaram um aumento da endoderme e barreiras apoplásticas sub estresse de Cd. No entanto esse aumento da espessura da endoderme exerce uma função importante à retenção do Cd na raiz, diminuindo o transporte desse metal para os órgãos aéreos da planta (KRESZIES et al., 2018; QI et al., 2020), além disso, esse tecido pode apresentar espessamento em condições de estresse (PEREIRA et al., 2008). Essas modificações da espessura nas barreiras apoplásticas são adaptações importantes para a tolerância das plantas a fatores de estresse (MARQUES et al., 2011).

Em maiores concentrações de Cd e NO, a endoderme não apresenta aumento da espessura, o que facilita maior transporte de Cd para os tecidos de condução, como é o xilema, que, por sua vez, aumentou os níveis de estresse tóxico na planta, afetando o crescimento e desenvolvimento radicular nas plantas de milho saracura. Caso contrário é relatado por Qi et al., (2020), no estudo de plantas de arroz sob estresse de Cd, em que a endoderme causa um aumento de lignina e suberina, embora a presença de uma endoderme mais lignificada e suberizada é para evitar a entrada do Cd, ao cilindro vascular, o qual não pode ser transportado à parte aérea pelos tecidos de condução (KRESZIES et al., 2018). Todavia a presença do óxido nítrico, como único fator nas plantas de milho saracura, sem a presença de Cd, atua como fator estressante que aumenta a espessura das barreiras apoplásticas. Tem-se demonstrado que o NO em excesso pode causar toxicidade em plantas (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020), no entanto o aumento das barreiras apoplásticas pode estar relacionado ao acúmulo de metais pesados (RIBEIRO et al., 2015). Maiores concentrações de NO, na presença de Cd, a espessura da endoderme tende a reduzir, entretanto, na redução das barreiras apoplásticas, há menos tecidos radiculares em que o Cd pode alocar, o que, provavelmente, permitiu maior absorção e maior fluxo de Cd, para a parte aérea da planta e, conseqüentemente, afetou no crescimento radicular em plantas de milho saracura.

A presença de Cd, na função de NO, o diâmetro de vasos de xilema aumentou, o que permite um maior fluxo de transporte de Cd para a parte aérea da planta, segundo Gomes et

al., (2011), em estudos de brachiaria, no acúmulo de metais pesados. Os elementos traqueais do xilema e parênquima cortical radicular apresentam paredes celulares mais grossas com a finalidade de ligar metais pesados na parede celular, como uma ação de proteção. Contudo menores concentrações de NO podem-se considerar suficientes, para inibir algum estímulo do Cd, nas plantas de milho saracura. De fato, a redução das barreiras apoplásticas permitiria maior translocação do Cd no cilindro vascular para a parte aérea das plantas de milho saracura. Esse tecido é considerado um importante transportador e controlador do carregamento na translocação de Cd, também, é considerado um fator determinante da variação no acúmulo de Cd nas plantas (HUANG et al., 2020). Estudos recentes feitos por Qi et al., (2020) relatam que menor diâmetro de xilema e barreiras apoplásticas mais suberizadas e lignificadas diminuem o fluxo do xilema e menos Cd é transferido para as partes aéreas em plantas de arroz. O óxido nítrico, em maiores concentrações, estimula uma queda no diâmetro de vasos de xilemas, em função das maiores concentrações de Cd, o que mostra como o NO está funcionando como uma molécula inibidora de estresse, causado pelo Cd, nas raízes de milho saracura, mas a redução do diâmetro de vasos de xilema permite controlar o fluxo de água para a parte superior da planta. Hacke & Sperry (2001) atribuem essa resposta como uma forma de evitar a cavitação, que diminui os espaços propícios para a formação de bolhas de ar.

A proporção do cilindro vascular foi reduzida a maiores concentrações de Cd, em função do NO, no qual a redução do cilindro vascular pode afetar a capacidade de transporte hídrico da raiz, contudo o mesmo comportamento da redução do cilindro vascular observou-se em plantas de *Schinus molle* sob estresse de Cd (BARONI et al., 2020), embora apenas doses maiores de NO também reduzem a proporção do cilindro vascular, possivelmente, com a finalidade de reduzir o transporte desse metal para parte aérea da planta. Segundo LI et al., (2020), o cilindro vascular pode ter maior capacidade de armazenamento tanto para acumular, quanto isolar Cd, além disso, é uns dos tecidos mais importantes responsáveis pela tolerância ao Cd nas raízes. Nas concentrações de NO, em função do Cd, o óxido nítrico desenvolve um papel como uma molécula antagonista na presença do Cd, no qual reage como molécula sinalizadora, fingindo que não há estresse na planta, evitando, assim, a diminuição do cilindro vascular, dessa forma, a participação antagonista do NO evita a absorção de Cd e a produção de ROS, entre elas, o H_2O_2 .

5 CONCLUSÕES

O cádmio aumenta a produção de aerênquima cortical radicular, em plantas de milho saracura, mas essa função pode ser inibida pela ação do óxido nítrico.

O peróxido de hidrogênio está diretamente ligado à formação de aerênquima, embora maiores concentrações de H_2O_2 sejam necessárias para desenvolver a formação de aerênquima cortical radicular em plantas de milho saracura.

O óxido nítrico reduz a produção de H_2O_2 , porém, ainda, reduz o desenvolvimento na produção de aerênquima cortical radicular em plantas de milho saracura. No entanto desenvolve um papel como molécula antagônica ao Cd, diminuindo a concentração de H_2O_2 , por meio da redução da atividade da SOD e pelo aumento da CAT em plantas de milho saracura.

O óxido nítrico, além ter uma função como molécula sinalizadora, desenvolve a função como molécula estressora quando tem a presença de Cd em plantas de milho saracura. Reduz as barreiras apoplásticas e células do sistema radicular destinadas à alocação de metais pesados, podendo deixar a raiz mais susceptível a esses fatores estressantes como é o cádmio.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnológica (CONACYT) – México, por financiar a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AMOOAGHAIE, R; ZANGENE-MADAR, F; ENTESHARI S. Role of two-sided crosstalk between NO and H₂S on improvement of mineral homeostasis and antioxidative defense in *Sesamum indicum* under lead stress. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 139, p.210–218, 2017.
- ARASIMOWICZ-JELONEK, J.; FLORYSZAK-WIECZOREK, E.; GWOZDZ A. The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. **Plant Sci**, v. 181, p. 612–620, 2011.
- BARONI, G. R.; PEREIRA, M. P.; CORRÊA, F. F.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J. Cadmium tolerance during seed germination and seedling growth of *Schinus molle* (Anacardiaceae). **Floresta e Ambiente**, v. 27, n. 2. p, 1-6, 2020.
- BARREIROS, A. L. B. S; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative estress: relations between the formation of reactive species and the organism´s defense. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BASU, S et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species induce lysigenous aerenchyma formation through programmed cell death in rice roots under submergence. **Environmental and Experimental Botany**, v. 177, p. 104-118, 2020.
- BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. Nitric Oxide: **Biol. Chem.**, v. 3, n. 3, p. 199-208, 1999b.
- BERGAMIN, A. C., VITORINO, A . C. T., LEMPP, B., SOUZA, C. M .A. de., SOUZA, F. R. de. Anatomia radicular de milho em solo compactado. **Pesq. Agrop. Bras**, 45: 299-305, 2010.
- BHATTACHARJEE, S.; SAHA, A. K. Plant wáter-stress response mechanisms. **Springer India**, p. 149-172, 2014.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 651-658, 1998.
- BOFFE, P. M et al. Phytoextractor potencial of plant species *Helianthus annuus* I. in soil contaminated with lead. **Revista espacios**, v. 38, n. 09, p. 8, 2017.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol**, v. 52, p. 302-309, 1978.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estrutura e Função de Órgãos Vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CLARK, D.; DURNER, D. A.; NAVARRE, D. A.; KLESSIG, D. F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 13, n. 12, p. 1380-1384, 2000.

- COAN, A. I.; SCATENA, V. L.; GIULIETTI, A. M. Anatomia de algumas espécies aquáticas de eriocaulaceae brasileiras. **Acta bot. Bras.** V.16, n.4, p. 371-384,2002.
- COELHO, G. T. C. et al. Formação de aerênquima em raízes de milho sob estresse de fósforo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 5, n. 3, p. 443-449, 2006.
- COLMER, T. D. Long-distance transport of gases in plants: a perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant Cell Environ**, n. 26, p. 17–36, 2003.
- CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Lead-induced stress, which triggers the production of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O₂^{·-}) in Arabidopsis peroxisomes, affects catalase activity. **ScienceDirect**, v. 68, p. 103-110, 2017.
- CORRÊA, F. F., et al. Anatomical traits related to stress in high density populations of *Typha angustifolia* L. (Typhaceae). **Braz. J. Biol.**, v, 77, n. 1, p. 52-59, 2017.
- DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, p.7-17, 2007.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v. 6, n. 394, p. 585-588, 1998.
- DÍAZ, A. S. et al. Aerenchyma development in diferente root zones of maize genotypes under wáter limitation and different phosphorus nutrition. **Biologia plantarum**, v. 62, n. 3, p. 561-568, 2018.
- DOMINGOS, P.; PRADO, A. M.; WONG, A.; GEHRING, C.; FEIJÓ, J. A. Nitric oxide: A multitasked signaling gas in plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p. 506-520, 2015.
- DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-3450, 2003.
- EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M. Heavy metals and metalloids: sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 234, n. 2, p. 431–444, 2018.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FORMAN, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v.49, p.835-842, 2010.
- GADELHA, C. G et al. Exogenous nitric oxide improves salt tolerance during establishment of *Jatropha curcas* seedlings by ameliorating oxidative damage and toxic ion accumulation. **Journal of Plant Physiology**, v. 212, p. 69-79, 2017.
- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. Notric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant physiol**, v. 128, p. 790-792, 2002.

- GEISLER-LEE, J.; CALDWELL, C.; GALLIE, D.R. Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.857-871, 2010.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; NOGUEIRA, M. O. G.; CASTRO, E. M.; SOARES, Â. M. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*, **Sci. Agric**, v. 68, n. 5, p. 566-573, 2011.
- GOMES-JUNIOR, R. A et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, p. 1330–1337, 2006.
- GUIMARÃES, M. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 3, p. 58-68, 2008.
- GUPTA, D. K et al. NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. **Plant, Cell and Environment**, v. 40, p. 509-526, 2017.
- GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P. B et al. Assessment of antioxidante enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cádmium stress. **Biotecnia**, v. 12, n. 2, p. 110-118, 2020.
- HACKE, U. G.; SPERRY, J. S. Functional and ecological xylem anatomy. Perspectives in Plant Ecology, **Evolution and Sistematics**,v. 4, p. 97-115, 2001.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Washington, v.67, n.3, p.450-455, 1987.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agr. Expt. Sta**, v. 347, p.1-39, 1950.
- HSU, Y. T.; KAO, C. H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul**, v. 42, p. 227–238, 2004.
- HUANG, X.; DUAN, S.; WU, Q.; YU, M.; SHABALA, S. Reducing cádmium accumulation in plants: structure function relations and tissue-specific operation of trabsporters in the spotlight. **Plants**, v. 223, n. 9, p. 1-18. 2020.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.
- KASIM, W. A. Changes induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Int. J. Agric. Biol**, v. 8, p.123-128, 2006.
- KASTEN, D et al. Nitrite is the driver, phytohormones are modulators while NO and H₂O₂ act as promoters of NO₂ –induced cell death. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 22, p. 6337-6349, 2016.

KOTAPATI, K. V.; PALAKA, B. K.; AMPASALA, D. R. Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. **The crop journal**, v. 5, p. 240-250, 2017.

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

KRESZIES, T.; SCHREIBER, L.; RANATHUNGE, K. Suberized transport barriers in Arabidopsis, barley and rice roots: from the model plant to crop species. **Journal of Plant Physiology**, v. 227, p. 75-83, 2018.

KUMARI, A.; SHEOKAND, S.; SWARAJ, K. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in chickpea. **Brazilian J. Plant Physiol**, v. 22, p. 271–284, 2010.

LASPINA, N. V.; GROPPA, M. D.; TOMARO, M. L.; BENAVIDES, M. P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Sci**, v. 169, p. 323–330, 2005.

LI, H.; ZHENG, X.; TAO, L.; YANG, Y.; GAO, L.; XIONG, J. Aeration increases cádmium (Cd) retention by enhancing iron plaque formation and regulating pectin synthesis in the roots of rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Rice**, v. 12, n. 28, p. 1-14, 2019.

LI, J et al. Analysis of anatomical changes and cádmium distribuiton in *Aegiceras corniculatum* (L.) blanco roots under cádmium stress. **Marine Pollution Bulletin**, v. 149, p. 1-8, 2019.

LIU, T.; XU, J.; LI, J.; HU, X. NO in involved in JA- and H₂O₂-mediated ALA-induced oxidative stress tolerance at low temperatures in tomato. **Enviromental and Experimental botany**, v. 161, p. 334-343, 2019.

MARKOVSKA, Y. K.; GORINOVA, N. I.; NEDKOVSKA, M. P.; MITEVA, K. M. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. **Biologia Plantarum**, v. 53, n.1, p. 151-154, 2009.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SOARES, A. M.; GOMES, M. P. MARTINS, G. Physiological and anatomical responses of eucalyptus seedlings exposed to cádmium. **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 997-1006, 2011.

MOLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007.

NABAEI, M & AMOOAGHAIE, R. Melatonin and nitric oxide enhance cádmium tolerance and phytoremediation efficiency in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 6891-6994, 2020.

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

NASCIMENTO, J.B.; BARRIGOSI, J.A. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v.1, n.01; p.234, 2014.

NI, X. L et al. Programmed cell death and aerenchyma formation in water-logged sunflower stems and its promotion by ethylene and ROS. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. 1928, p. 1-16, 2019.

NOUAIRI, I et al. Antioxidant defense system in leaves of indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 237-247, 2009.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, 2008.

PEREIRA, F.J.; MAGALHÃES, P.C.; SOUZA, T.C. de; CASTRO, E.M. de; ALVES, J.D. Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.451-456, 2010.

PIRES, M. F.; CASTRO, E. M.; MAGALHÃES, P. C.; NETA, I. C.; MONTEIRO, A. G. D. P. Etileno e peróxido de hidrogênio na formação de aerênquima em milho tolerante a alagamento intermitente. **Pesq. Agropecuária. Bras.**, Brasília, v. 50, n. 9, p. 779-787, 2015.

PIRES, R. M. O.; DE SOUZA, G. A.; CARDOSO, A. Á.; DOS SANTOS DIAS, D. C. F.; BORGES, E. E. L. Action of nitric oxide in sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) submitted to stress by cadmium. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 1, p. 022-029, 2016.

POSTMA, J. A.; LYNCH, J. P. Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, n. 3, p. 1190-1201, July 2011.

QI, X.; TAM, N. F.; LI, W. C.; YE, Z. The role of root apoplastic barriers in cadmium translocation and accumulation in cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) with different Cd-accumulating characteristics. **Environmental Pollution**, v. 264, p. 1-11, 2020.

RAJHI, I.; MHADHBI, H. Mechanisms of aerenchyma formation in maize roots. **Afr. J. Agric. Res**, v. 14, n. 14, p. 680-685, 2019.

RIBEIRO, E. S et al. Relações de anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. **R. Bras. Eng. Agric. Ambiental**, v. 19, n. 6, p. 605-612, 2015.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A.; TERRÓN-CAMERO, L. C.; ROMERO-PUERTAS, M. C. Funciones del óxido nítrico en la respuesta de la planta a la toxicidad por cadmio. **Ecosistemas**, v. 29, n. 2, p. 1-12, 2020.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M et al. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. **Plant physiology**, v. 150, p. 229-243, 2009.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; TERRÓN-CAMERO, L.C.; PELÁEZ-VICO, M.A.; OLMEDILLA, A.; SANDALIO, L. M. Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. **Environmental Experimental Botany**, v. 161 p. 107-199, 2019.

SALDIVAR, R. H. L.; ARGÜELLO, B. M.; REYES, I. V. Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas elicidadas con nanopartículas. **UAAAN**, p. 80-92, 2016.

SANDALIO L.M., RODRÍGUEZ-SERRANO M., GUPTA D.K., ARCHILLA A., ROMERO-PUERTAS M.C. & DEL RÍO L.A. Reactive oxygen species and nitric oxide in plants under cadmium stress: from toxicity to signalling. In *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change* (eds P. Akhtar & M.N.V. Prasad), p. 199– 215. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, 2012.

SCAPINELLI, A., DEINA, F. R., JUNIOR, D. D. V., VALADAO, F. C. A., PERERIRA, L. B. Sistema radicular e componentes produtivos do girassol em solo compactado. **Pesq. Agrop. Bras**, 75:474-486, 2016.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol**, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SINGH, A. P et al. Nitric oxide alleviated arsenic toxicity by modulation of antioxidants and thiol metabolism in rice (*Oryza sativa* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 01-14, 2017.

SINGH, H. P.; BATISH, D.R.; KAUR, G.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environ. Exp. Bot**, v. 63, p. 158–167, 2008.

SINGH, P.; INDOLIYA, Y.; CHAUHAN, A.; SINGH, S. P.; SINGH, A. P. Nitric oxide mediated transcriptional modulation enhances plant adaptive responses to arsenic stress. **Sci Report**, v. 7, n. 3592, p. 1-13, 2017.

SOUZA, T.C. de; CASTRO, E.M. de; MAGALHÃES, P.C.; LINO, L. de O.; ALVES, E.T.; ALBUQUERQUE, P.E.P. de. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.35, p.3201-3211, 2013.

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

SOUZA, T.C. de; MAGALHÃES, P.C.; PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M. de; PARENTONI, S.N. Morpho-physiology and maize grain yield under periodic soil flooding in successive selection cycles. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.33, p.1877-1885, 2011.

STEFFENS B.; SAUTER M. Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified signal pathway. **Plant Cell**, v. 21, p. 184-196, 2009.

STEFFENS, B., RASMUSSEN, A. The Physiology of adventitious roots. **Plant Physiology**, v. 170, p. 603-617, 2016.

STEFFENS, B.; GESKE, T.; SAUTER, M. Aerenchyma formation in the rice stem and its promotion by H₂O₂. **New Phytologist**, v. 190, p. 369-378, 2011.

STEFFENS, B.; SAUTER, M. Epidermal cell death in rice is confined to cells with a distinct molecular identity and is mediated by ethylene and H₂O₂ through an autoamplified pathway. **Plant Cell**, v. 21, p. 184-196, 2009.

TERRÓN-CAMERO, L. C.; PELÁEZ-VICO, M. Á.; DEL VAL, C.; SANDALIO, L. M.; ROMERO-PUERTAS, M. C. Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: exogenous application versus endogenous production. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 17, p. 4477-4488, 2019.

TIAN, X.; LEI, Y. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. **Biol. Plant**, v. 50, p. 775-778, 2006.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants : protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Clare, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

VITÓRIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, v. 57, p. 701-710, 2001.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, p. 107-120, 2003.
WANG, D et al. Effect of exogenous nitric oxide on antioxidative system and S-nitrosylation in leaves of *Boehmeria nivea* (L.) gaud under cadmium stress. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, p. 3489-3497, 2015.

WANG, X.; TAM, N. F.; HE, H.; YE, Z. The role of root anatomy, organic acids and iron plaque on mercury accumulation in rice. **Plant and Soil**, v. 394, p. 301-313, 2015.

WANG, Y.; LOAKE, G. J.; CHU, C. Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. **Front Plant Sci**, v. 4, n. 314, p.1-7, 2013.

WANY, A.; KUMARI, A.; GUPTA, K. J. Nitric oxide is essential for the development of aerenchyma in wheat roots under hypoxic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 40, n. 12, p. 3002-3017, 2017.

WILLINGHOEFER, R. O et al. Cadmium toxicity in different soybean cultivars. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 7, p. 46202-46221, 2020.

XIANG, J.; WAN, C.; GUO, R. G, D. Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types?. **BioMed Research Internationall**, v. 2016, p. 1-6, 2016.

YAKIMOVA, E. T.; KAPCHINA-TOTEVA, V. M.; LAARHOVEN, L. J.; HARREN, F. M.; WOLTERING, E. J. Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. **Plant Physiol. Biochem**, v. 44, p. 581-589, 2006.

YAMAUCHI, T, et al. An NADPH oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. **Plant Cell**, v. 29, p. 775-790, 2017.

**ARTIGO 2 - PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE PELO
CÁDMIO EM PLANTAS DE MILHO SARACURA**

**Artigo redigido conforme a NBR 6022 (ABNT, 2018) e formatado de acordo com o Manual da
UFLA de apresentação de teses e dissertações.**

RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal pesado altamente tóxico para plantas e animais e pode se acumular no ambiente em função de atividades industriais e agrícolas com alguns tipos de adubação fosfatada. Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel do óxido nítrico (NO) na atenuação do estresse por Cd em plantas de milho saracura. Plantas de milho foram mantidas, em solo saturado com solução nutritiva a 40% da força iônica, em casa de vegetação e foram aplicadas diferentes concentrações de nitrato de cádmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, sendo: 0; 10 e 50 μM e nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, como doador de óxido nítrico (NO) nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2 μM . Foram realizadas análises de crescimento, trocas gasosas foliares e anatomia das folhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott-Knott para $p < 0,05$. As maiores concentrações de Cd e NO reduziram a massa seca total, massa seca da folha e do caule, mas aumentaram a alocação de biomassa para as raízes, reduziram a alocação para o caule, mas mantiveram esse parâmetro para as folhas. A aplicação de Cd e NO promoveram aumento das trocas gasosas e da área foliar, além do aumento na espessura dos tecidos foliares e da densidade estomática. A presença do NO, em baixas concentrações, atenuou a toxicidade do Cd, mas, em altas concentrações, esse composto pode gerar efeitos negativos ou toxicidade nas plantas de milho saracura.

Palavras-chave: Anatomia foliar. Metal pesado. Nitroprussiato de sódio. *Zea mays* L.

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a heavy metal highly toxic to plants and animals and can accumulate in the environment due to industrial and agricultural activities with some types of phosphate fertilizer. This work aimed to evaluate the role of nitric oxide (NO) in the attenuation of Cd stress in saracura corn plants. Corn plants were kept in soil saturated with nutrient solution at 40% of ionic strength in a greenhouse and different concentrations of cadmium nitrate Cd (NO₃)₂ were applied, being: 0; 10 and 50 μM, and sodium nitroprusside Na₂[Fe (CN)₅NO] · 2H₂O as donor of nitric oxide (NO) in concentrations of 0.05, 0.1 and 0.2 μM. Growth analysis, leaf gas exchange and leaf anatomy were performed. The experimental design was completely randomized in a 3x3 factorial scheme with five replications. The data were subjected to analysis of variance and the Scott-Knott test for p <0.05. The highest concentrations of Cd and NO reduced the total dry mass, dry mass of the leaf and stem, but increased the allocation of biomass to the roots, reduced the allocation to the stem, but maintained this parameter for the leaves. The application of Cd and NO promoted an increase in gas exchange and leaf area, in addition to an increase in leaf tissue thickness and stomatal density. The presence of NO in low concentrations attenuated the toxicity of Cd, but in high concentrations, this compound can generate negative effects or toxicity in the saracura corn plants.

Keywords: Leaf anatomy. Heavy metal. Sodium nitroprusside. *Zea mays* L.

1 INTRODUÇÃO

Regiões tropicais e subtropicais apresentam uma baixa concentração de fósforo no solo, o que é considerado como um dos fatores limitantes para o desenvolvimento e produção das plantas (SOUSA et al., 2012). No entanto aplicações sucessivas de fertilizantes fosfatados aumentam as quantidades de Cd nos solos e plantas, causando impactos pela alta toxicidade desse metal (BIZARRO et al., 2008; RAVEN & LOEPPERT, 1997). Segundo Bizarro (2008), os fertilizantes fosfatados contêm Cd, em concentrações variáveis, que dependerão da rocha fosfática da qual foram produzidos. O Cd é um metal tóxico altamente solúvel em água que se acumula facilmente na cadeia trófica (ZHAO et al., 2013), sendo considerado como o terceiro maior contaminante ambiental quanto à toxicidade, ficando atrás apenas do Hg e Pb (ISMAEL et al., 2018). A contaminação do ambiente pelo Cd é constante, em razão dos processos litogênicos e antropogênicos (NEVES et al., 2016).

O Cd não é um elemento essencial para as plantas, é altamente tóxico, mesmo em baixas concentrações, podendo causar grandes danos aos organismos (SHAID et al., 2017). No entanto a toxicidade do Cd inibe processos fisiológicos e promove problemas no desenvolvimento e morfologia das plantas (ZHAO et al., 2013). Embora os nutrientes sejam absorvidos pelas membranas, esse sistema de captação de elementos não é seletivo (MARIA et al., 2011), absorvendo também poluentes como o Cd. Os elementos são absorvidos pelas raízes, e a endoderme atua como o primeiro filtro, retendo os poluentes nas raízes (RODRIGUEZ et al., 2020), contudo, quando os poluentes chegam ao cilindro vascular, são transportados via xilema até chegar às folhas (SOARES et al., 2001). A toxicidade do Cd nas plantas é evidente, reduzindo a fotossíntese e a espessura dos tecidos fotossintéticos (SOARES et al., 2001; Pereira et al., 2016), pode ocorrer ainda diminuição da transpiração; aumento da taxa respiratória e clorose foliar (VECCHIA et al., 2005); redução no crescimento e desequilíbrio nutricional (HERNÁNDEZ-BARANDA et al., 2019); inativação de atividades enzimáticas e acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (CLEMENS et al., 2013), entre outros danos.

Estudos demonstraram que a aplicação exógena de óxido nítrico reduz a toxicidade de metais pesados em plantas, promovendo a eliminação direta de espécies reativas de oxigênio ou ativando enzimas do sistema antioxidante (JELONEK-ARASIMOWICZ et al., 2011; ZHAO et al., 2013). O NO é uma molécula sinalizadora gasosa multifuncional de grande importância para as plantas, desempenhando um papel fundamental na mediação de uma ampla gama de processos fisiológicos e respostas a estresses bióticos e abióticos (JELONEK-

ARASIMOWICZ et al., 2011; ZHAO et al., 2013). Pesquisas associam o NO com a redução da toxicidade de metais pesados em plantas. Neste sentido, o NO reduz a toxicidade do Cd em *Typha angustifolia* (ROMERO-PUERTAS et al., 2019), *Oriza sativa* (XIONG et al., 2009), *Helianthus annuus* (LASPINA, et al., 2005), *Glycine max* e *Zea mays* (FERREIRA et al., 2010; SUN et al., 2007). O NO pode ser gerado de forma endógena e atua na sinalização em uma serie de respostas fisiológicas nas plantas (HANCOCK, 2020). A aplicação de NO exógeno ocorre pelos doadores de NO, em que o mais comumente utilizado é o nitroprussiato de sódio SNP (YAMAMOTO & BING, 2000; DUARTE et al., 2020). As respostas ao NO aplicado exogenamente é determinada, em grande parte, pela concentração e o tempo de exposição ao NO produzido, que são variáveis nos diferentes doadores (EDERLI et al., 2009). A aplicação exógena de NO estimula o sistema antioxidante, enquanto a produção endógena está relacionada com a regulação da síntese de enzimas, hormônios e fatores de transcrição (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020).

A adubação fosfatada é intensamente utilizada para o cultivo de milho que pode promover aumento dos níveis de Cd nos solos. Sendo o milho sensível aos efeitos do Cd com intensa redução de crescimento e produtividade (ANJUM et al., 2015), é muito importante conhecer o efeito de possíveis atenuantes para o estresse. A hipótese deste trabalho é de que a adição de NO exógeno irá promover a atenuação do estresse por Cd em milho por promover modificações favoráveis às trocas gasosas e anatomia foliar, favorecendo o crescimento das plantas. Portanto o presente trabalho teve como objetivo avaliar as modificações na anatomia e trocas gasosas foliares, em plantas de milho saracura, submetidas ao Cd sob diferentes concentrações de óxido nítrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A execução do experimento foi em casa de vegetação do departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais, Brasil (21°14'43''S, 45°59'59''W). O material vegetal consistiu de plântulas de milho BRS4154. O genótipo BRS4154 foi escolhido por ser tolerante ao alagamento (PEREIRA et al., 2008; PEREIRA et al., 2010) e os experimentos deste trabalho serem planejados, para utilizar solução nutritiva, saturando o substrato, para permitir melhor difusão e absorção do NO pelas raízes do milho. As sementes foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA MILHO-SORGO) de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil.

Foram utilizadas plântulas de milho saracura obtidas de sementes germinadas em bandejas contendo vermiculita como substrato. Após atingirem aproximadamente 10 cm de altura, as plântulas foram transferidas, para vasos plásticos preenchidos com 3 L de vermiculita, mantidas à capacidade de campo por 15 dias para a aclimação das plântulas. A capacidade de campo da vermiculita utilizada equivale a 40% do volume do substrato, portanto foram utilizados 1,2 L de água por vaso. Após esse tempo, o substrato foi alagado de maneira permanente um centímetro acima do nível da vermiculita. Foram aplicados os tratamentos que se constituíram de concentrações de solução de nitrato de cádmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, sendo 0, 10 e 50 μM e nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, conhecido como SNP, sendo doador de NO nas concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2 μM . A reposição da água perdida pela evapotranspiração foi feita diariamente e a solução nutritiva (Hoagland e Arnon 1950) reposta semanalmente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 com cinco repetições que se constituíram de uma planta por vaso. As plantas permaneceram nessas condições por 30 dias.

Ao final do experimento, as plantas foram amostradas e separadas em folhas, caule e raízes. As folhas foram escaneadas, e as imagens usadas para medir a área foliar com o software UTHSCSA-ImageTool (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, EUA). Posteriormente, as partes das plantas foram colocadas em estufa a 60°C até massa constante e pesadas em balança analítica (AY220, Shimadzu, Japão), para se obter peso seco dos órgãos. A alocação de biomassa foi calculada, segundo a equação: $\text{Alocação (\%)} = (\text{DMO} / \text{DMP}) * 100$, em que: DMO = massa seca do órgão (folhas, caule ou raízes) e DMP = massa seca da planta).

As análises das trocas gasosas foliares foram avaliadas, após 30 dias de experimento, utilizando o analisador de troca gasosa por infravermelho (IRGA) modelo LI-6400XT (Li-

COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). As análises foram realizadas, no período da manhã, a partir das 7 h. A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos foi fixada na câmara do aparelho para $1.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o déficit de pressão de vapor foi 2.66 kPa, o fluxo da bomba foi $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ e a temperatura do bloco foi mantida a 25 °C. As variáveis avaliadas foram: taxa fotossintética, a condutância estomática e a taxa transpiratória. Foram avaliadas as duas primeiras folhas completamente expandidas em cada repetição. O teor de clorofila foi avaliado, usando um medidor de clorofila SPAD-502 (Konica-Minolta, Japão), calibrado de acordo as recomendações do fabricante. As folhas foram as mesmas utilizadas para a análise das trocas gasosas, sendo avaliadas na base, meio e ápice das folhas, e a média das leituras foi utilizada por folha. Em seguida, a média dos dados foi calculada para cada repetição.

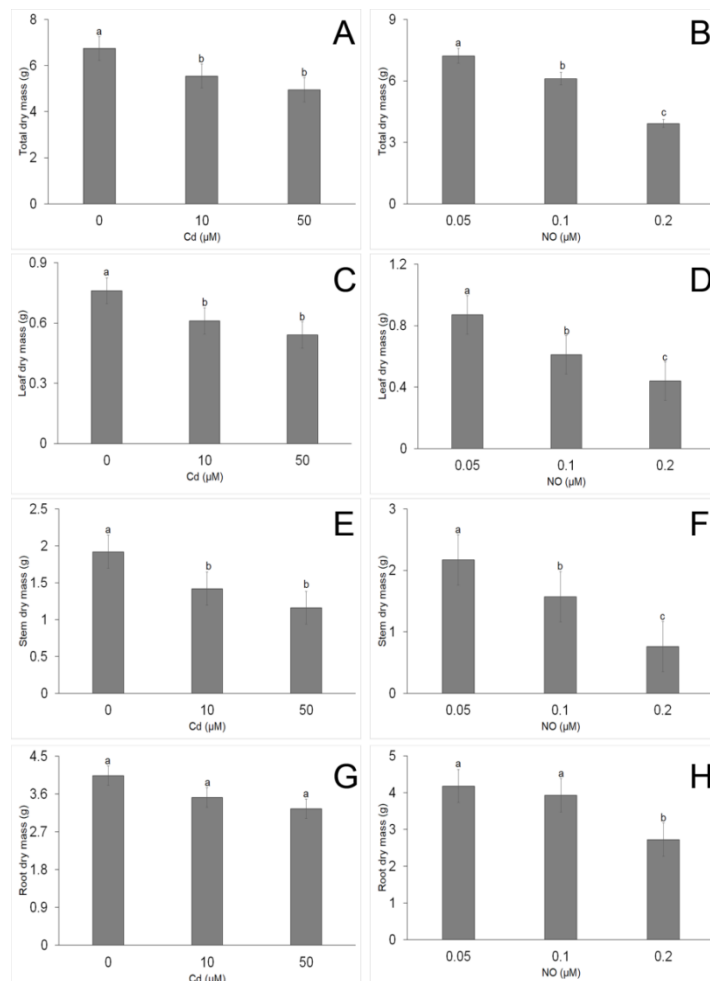
Para as análises anatômicas foliares, foram coletados fragmentos de aproximadamente 10 cm, na região mediana da primeira folha, completamente desenvolvida e, logo depois, fixadas em F.A.A. 70 % (formaldeído: ácido acético: etanol 70%, 0,5: 0,5: 9.0 v v⁻¹) por 72h (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em etanol 70% até a análise posterior. Foram realizadas secções transversais da região mediana e paradérmicas das faces abaxial e adaxial foliares. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 50% (v v⁻¹), lavadas em água destilada por três vezes, durante 10 minutos, coradas em solução safrablau (1% de safranina e 0,1% de azul de Astra na proporção de 3:7), para os cortes transversais, e solução de safranina hidroalcoólica 1% para os cortes paradérmicos, sendo confeccionadas lâminas semipermanentes em glicerol 50% (v v⁻¹) (KRAUS E ARDUIM, 1997). Foi confeccionada uma lâmina por repetição, nas quais nove campos de nove secções diferentes foram analisados, a média foi calculada para cada repetição. As imagens foram obtidas em microscópio Trinocular Olympus CX31 (Olympus, Tokyo, Japão) e analisadas no programa de imagens ImageTool, versão 3.0. (University of Texas Health Science Center in San Antonio, San Antonio, TX, EUA). Os parâmetros avaliados nas secções transversais foram: área do mesofilo, espessura do mesofilo, espessura da epiderme abaxial, espessura da epiderme adaxial, área do feixe vascular, diâmetro dos vasos do xilema. Nas secções paradérmicas, foram avaliados: comprimento dos estômatos, largura dos estômatos, funcionalidade dos estômatos, densidade estomática, índice estomático e densidade de células epidérmicas. Foi calculada a funcionalidade dos estômatos em que: funcionalidade dos estômatos ($F = \text{diâmetro polar} / \text{diâmetro equatorial}$); a densidade estomática ($DE = \text{número de estômatos} / \text{unidade de área}$); índice estomático ($IE\% = [\text{número de estômatos} / (\text{número de estômatos} + \text{número de células epidérmicas})] \times 100$).

Para as análises estatísticas, os dados foram submetidos à análise estatística no software Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011). Foi realizada análise de variância (ANAVA) e as médias foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 0,05%. Antes da ANAVA, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para testar a distribuição normal dos dados e todos obtiveram significativa distribuição normal.

3 RESULTADOS

As diferentes concentrações de cádmio e óxido nítrico não causaram mortalidade das plantas. Nas análises de crescimento, o total de massa seca, massa seca das folhas e massa seca do caule não apresentaram interação entre os tratamentos $P= 0.0929$; 0.5589 ; 0.074 , respectivamente. A massa seca total foi reduzida de forma semelhante nas concentrações de 10 e 50 μM de Cd, enquanto o NO promoveu uma redução desse parâmetro proporcionalmente à concentração do composto (Fig. 1A e B). A massa seca das folhas (Fig. 1C e D) e do caule (Fig. 1E e F) demonstraram respostas semelhantes à massa seca total. No entanto o Cd não promoveu modificações significativas na massa seca radicular (Fig. 1G) e apenas observou-se uma redução desse parâmetro na maior concentração de NO (Fig. 1H).

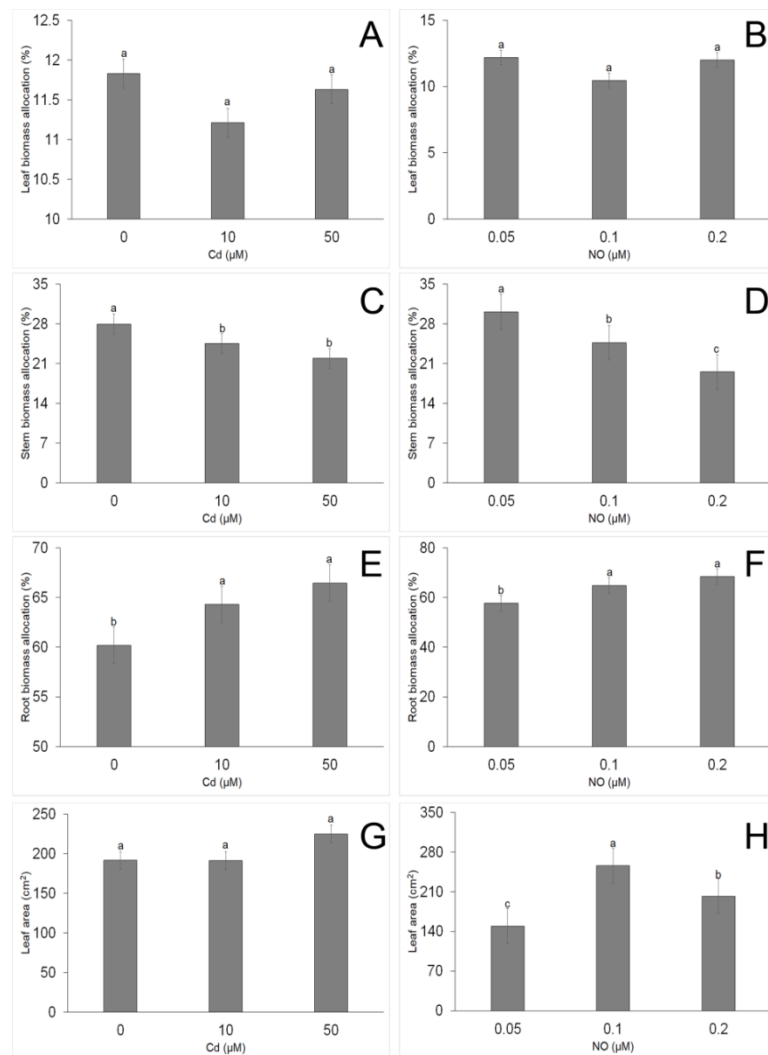
Figura 1 - Crescimento de plantas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e NO.



Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. As barras indicam o erro padrão.

Não ocorreu interação entre as concentrações de Cd e NO, para a alocação de biomassa no caule, folhas ou raízes de milho ou para a área foliar ($p \geq 0,16$). O Cd ou NO não promoveram diferenças significativas para a alocação de biomassa nas folhas (Fig. 2A e B). No entanto a alocação da biomassa do caule foi reduzida, nas concentrações de 10 e 50 μM de Cd, enquanto o NO promoveu uma queda nesse parâmetro proporcional à concentração (Fig. 2C e D). As maiores concentrações de Cd e NO aumentaram a alocação de biomassa para as raízes (Fig. 2E e F). A área foliar do milho não foi modificada pelo Cd (Fig. 2G), contudo a concentração de 0,1 μM de NO promoveu as maiores médias para esse parâmetro, que foi reduzido na concentração de 0,2 μM de NO, mas ainda ficando acima da menor concentração utilizada (Fig. 2H).

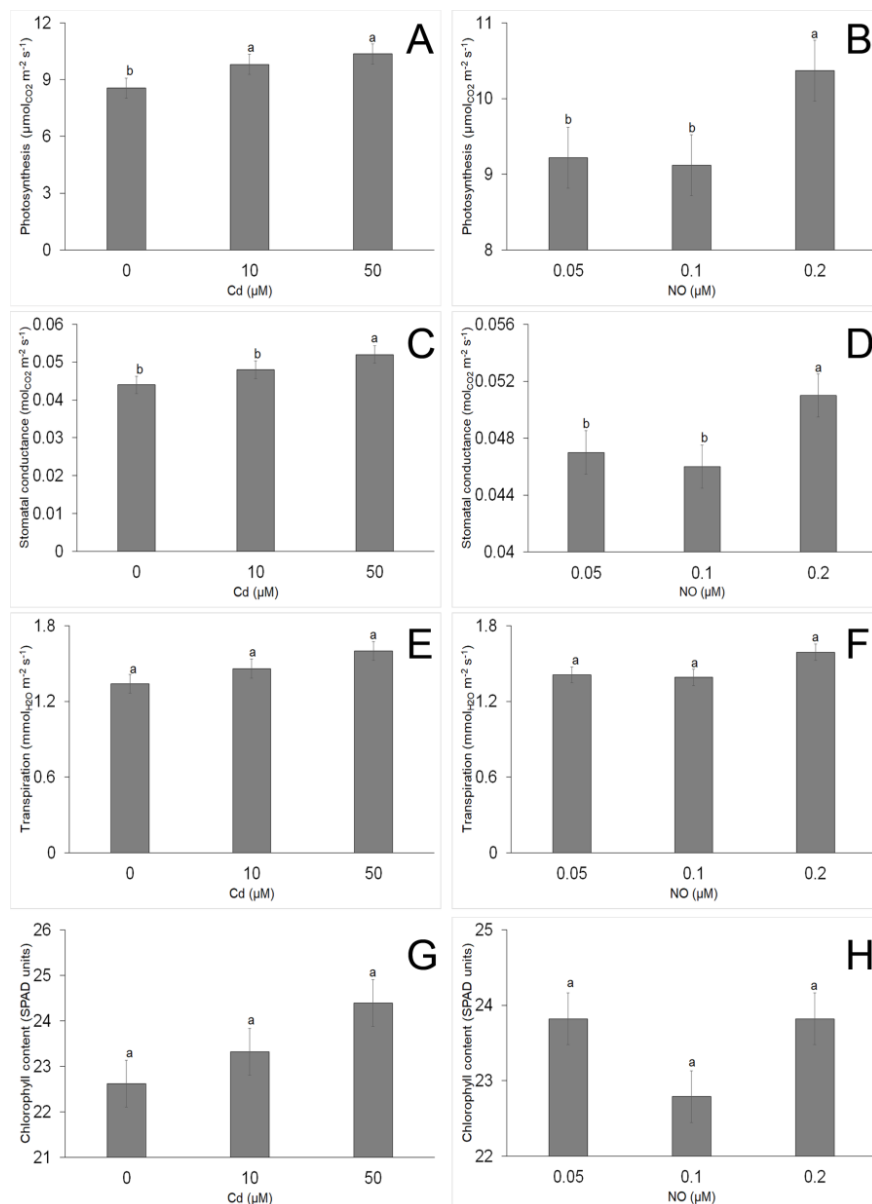
Figura 2 - Alocação de biomassa e área foliar em plantas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e NO.



Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. As barras indicam o erro padrão.

A taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração e conteúdo de clorofila não demonstraram efeito significativo para a interação entre Cd e NO ($P \geq 0,061$). O Cd não promoveu modificações na taxa fotossintética (Fig. 3A), entretanto a maior concentração de NO aumentou esse parâmetro (Fig. 3B). A maior concentração de Cd (50 μM) e de NO (0,2 μM) aumentou a condutância estomática do milho (Fig. 3C e D). A transpiração não foi modificada de forma significativa pelo Cd (Fig. 3E) ou NO (Fig. 3F). O Cd (Fig. 3G) e o NO (Fig. 3H) não promoveram modificações significativas no conteúdo de clorofila.

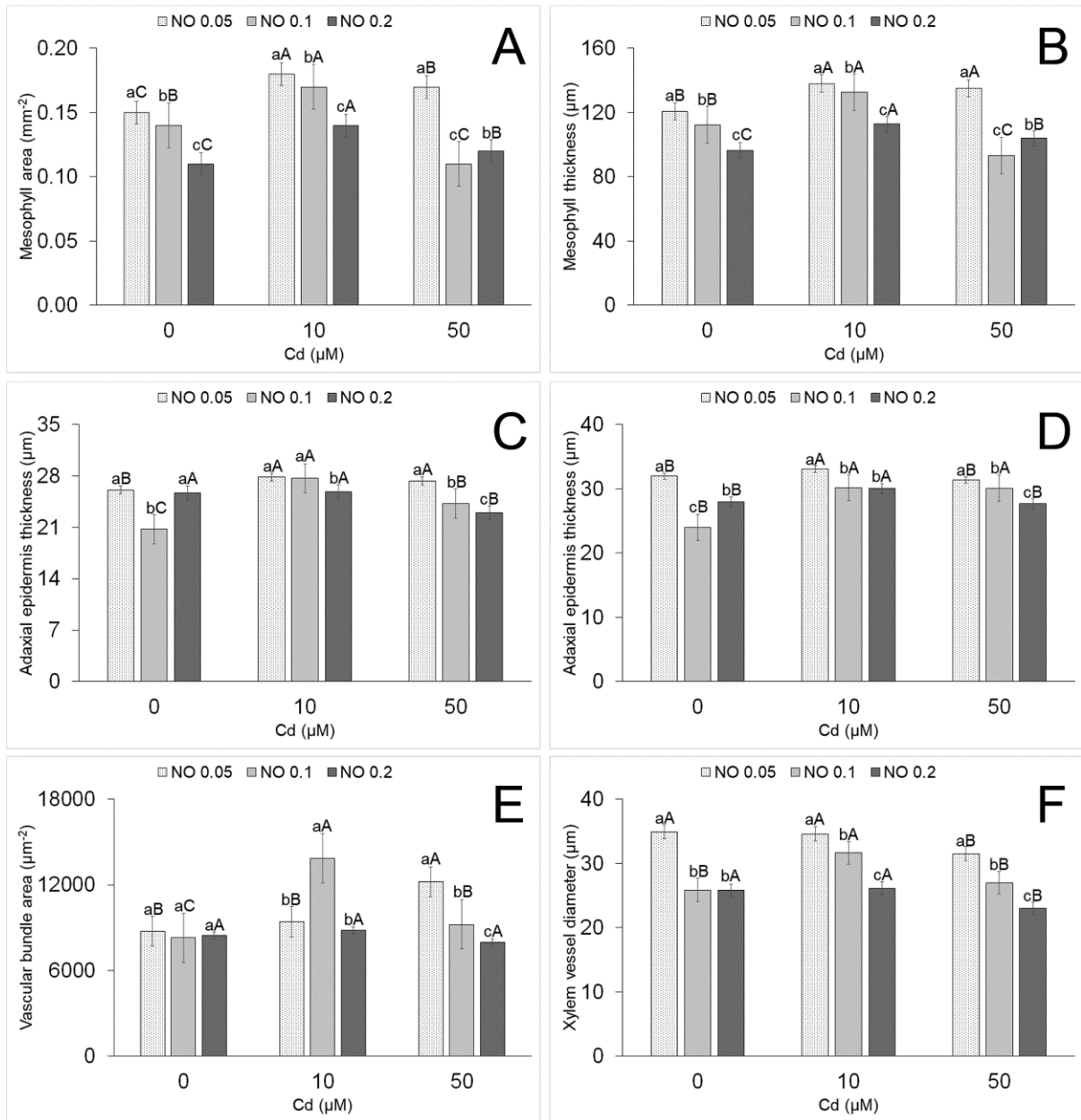
Figura 3 - Trocas gasosas e conteúdo de clorofila foliar em plantas de milho cultivadas sob diferentes concentrações de Cd e NO.



Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. As barras indicam o erro padrão.

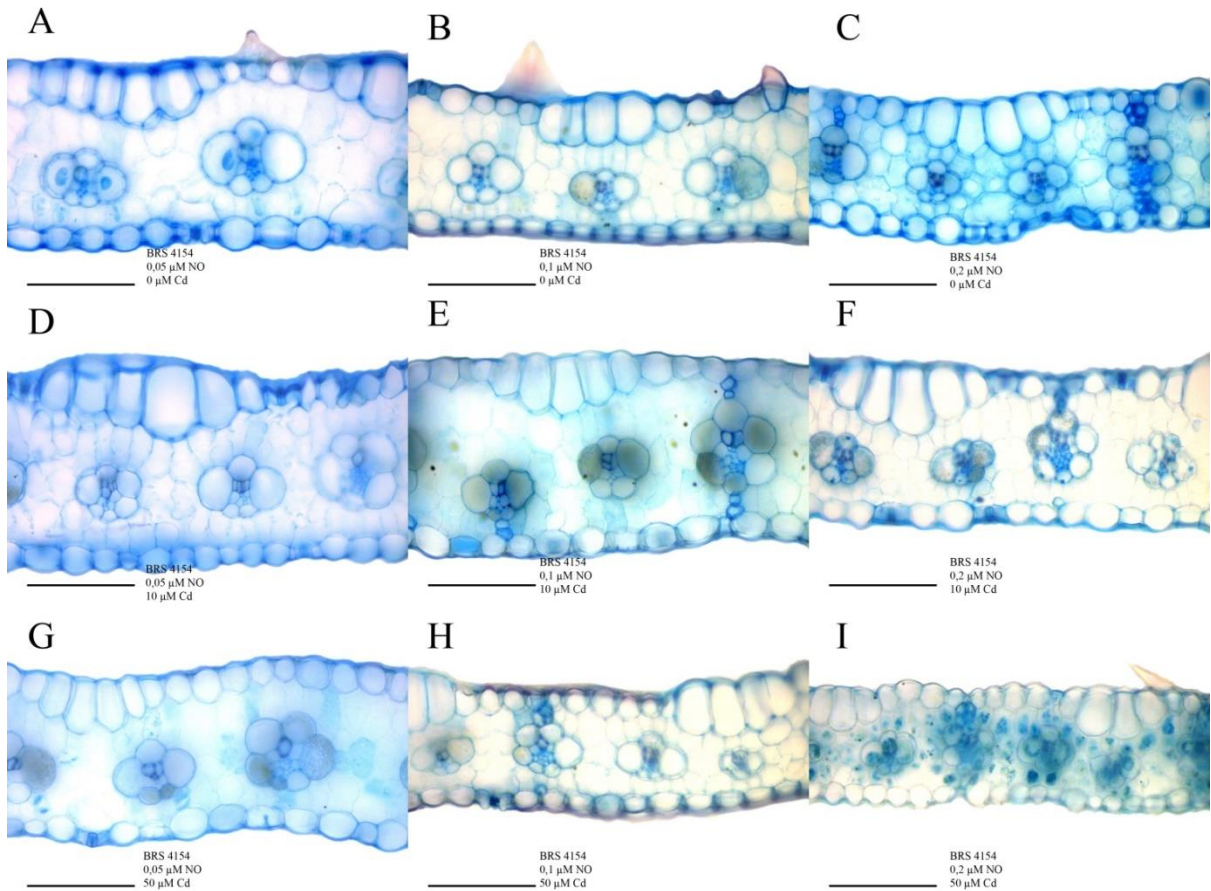
Todas as variáveis referentes à anatomia foliar em secção transversal demonstraram interação entre as concentrações de Cd e NO ($P < 0,0001$). O Cd aumentou a espessura (Fig. 4A) e área (Fig. 4B) do mesofilo, em todas as concentrações de NO, em relação ao controle (0 μM Cd), além disso, maiores concentrações de NO reduziram essas variáveis em todas as concentrações de Cd (Fig. 4 e Fig. 5). O Cd aumentou a espessura da epiderme da face adaxial, nas folhas do milho, exceto na concentração de 0,2 μM de NO, em que não houve diferenças significativas nas concentrações mais baixas de Cd e ocorreu uma redução dessa variável em 50 μM de Cd (Fig. 4C e Fig. 5). Exceto na ausência de Cd, o aumento da concentração de NO reduziu a espessura da epiderme adaxial nas folhas de milho (Fig. 4C e Fig. 5). A concentração de 10 de Cd aumentou a espessura da epiderme da face abaxial das folhas de milho, em relação aos demais tratamentos, mas a concentração mais alta de Cd não promoveu modificações significativas em comparação com o controle (Fig. 4D e Fig. 5). O aumento da concentração de NO reduziu a espessura da epiderme da face abaxial em todas as concentrações de Cd (Fig. 4D e Fig. 5). O Cd aumentou a área dos feixes vasculares, em relação ao controle, exceto pelo tratamento de 50 μM (Fig. 4E e Fig. 5). A área dos feixes vasculares permaneceu sem modificações significativas promovidas pelo NO na ausência de Cd, contudo, na concentração de 50 μM desse poluente, o aumento do NO reduziu a área dos feixes vasculares sob 10 μM de Cd; o aumento do NO promoveu um incremento nessa área, mas reduziu para valores próximos ao controle na concentração de 50 μM de Cd (Fig. 4E). O Cd reduziu o diâmetro dos vasos de xilema nas concentrações de 0,05 e 0,1 μM de NO, contudo promoveu um aumento desse parâmetro sob 10 μM de Cd e 0,1 μM de NO, reduzindo para valores semelhantes ao controle na concentração de 50 μM de Cd (Fig. 4F). O aumento da concentração de NO reduziu o diâmetro de vasos de xilema, nas folhas de milho, em todas as concentrações de Cd (Fig. 4F).

Figura 4 - Modificações em características anatómicas foliares em secção transversal de plantas de milho saracura expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.



Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. As barras indicam o erro padrão.

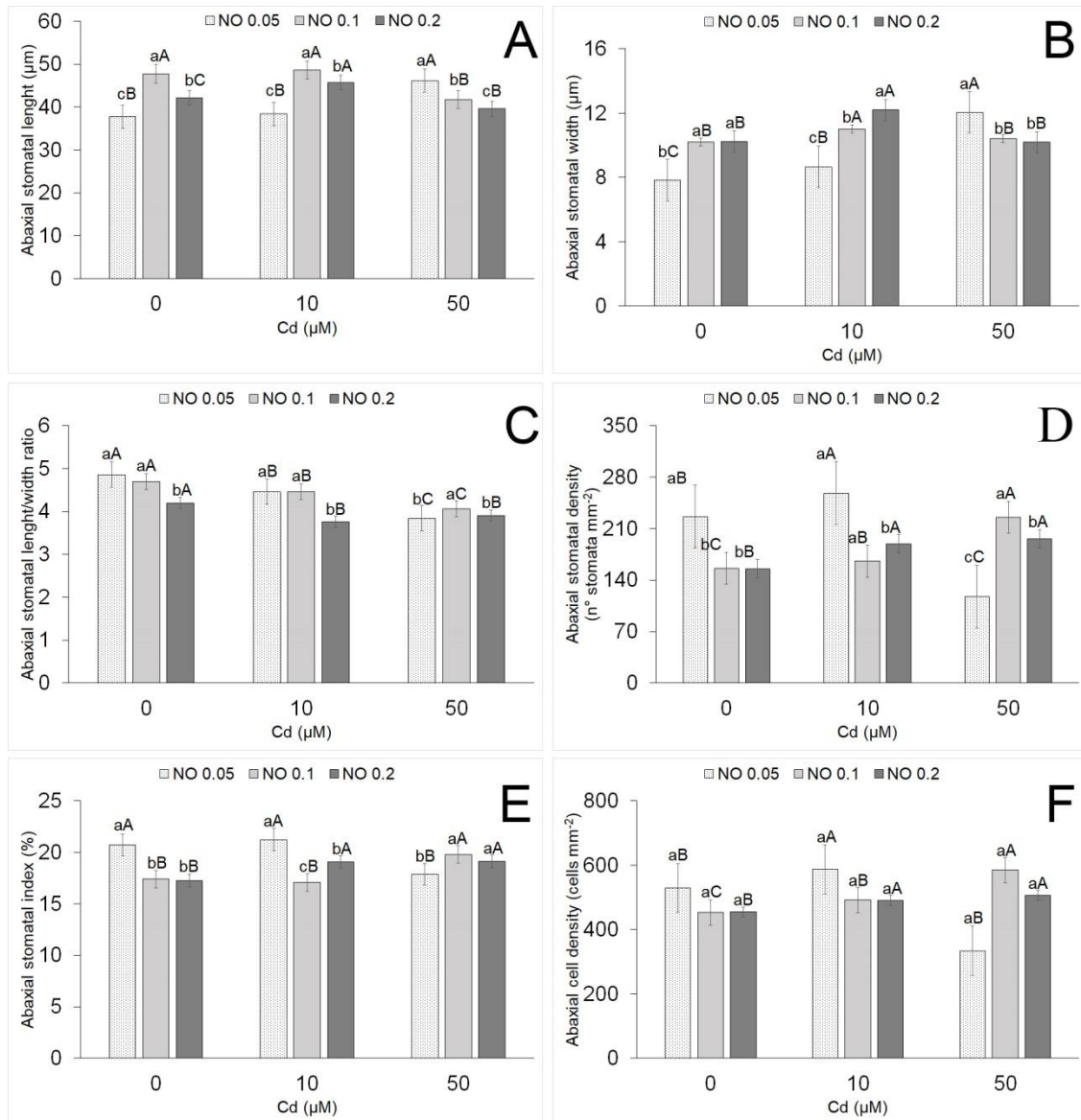
Figura 5 - Secções transversais em folhas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico. Barras= 100 μm .



O Cd aumentou o tamanho dos estômatos da face abaxial das folhas de milho, como pode ser observado para o comprimento (Fig. 6A) e largura (Fig. 6B), que, de uma maneira geral, são maiores na presença de Cd, em comparação com o controle (0 μM de Cd). O comprimento e largura dos estômatos aumentou, nas maiores concentrações de NO, para 0 e 10 μM de Cd, contudo, na maior concentração desse poluente, o aumento do NO reduziu o comprimento e largura dos estômatos (Fig. 6A e B). Maiores concentrações de Cd e de NO, de uma maneira geral, reduziram a razão largura/comprimento dos estômatos (Fig. 6C). Maiores concentrações de Cd aumentaram a densidade estomática da face abaxial das folhas de milho, o NO reduziu esse parâmetro, nas concentrações de 0 e 10 μM de Cd, mas promoveu um aumento dessa característica na concentração de 50 μM de Cd (Fig. 6D). O aumento do Cd não promoveu efeitos significativos, no índice estomático da face abaxial das folhas de milho, na concentração de 0,1 μM de NO, mas aumentou esse parâmetro nas concentrações maiores (Fig. 6E). O aumento da concentração de NO reduziu o índice estomático da face abaxial das folhas de milho, nas concentrações de 0 e 10 μM de Cd, mas aumentou esse parâmetro na maior concentração desse metal (Fig. 6E). O Cd aumentou a

densidade de células epidérmicas da face abaxial das folhas de milho em todas as concentrações de NO (Fig. 6F). O aumento da concentração de NO, contudo não teve efeito significativo na densidade de células epidérmicas do milho em nenhuma concentração de Cd (Fig. 6F).

Figura 6 - Modificações na estrutura da epiderme da face abaxial das folhas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.

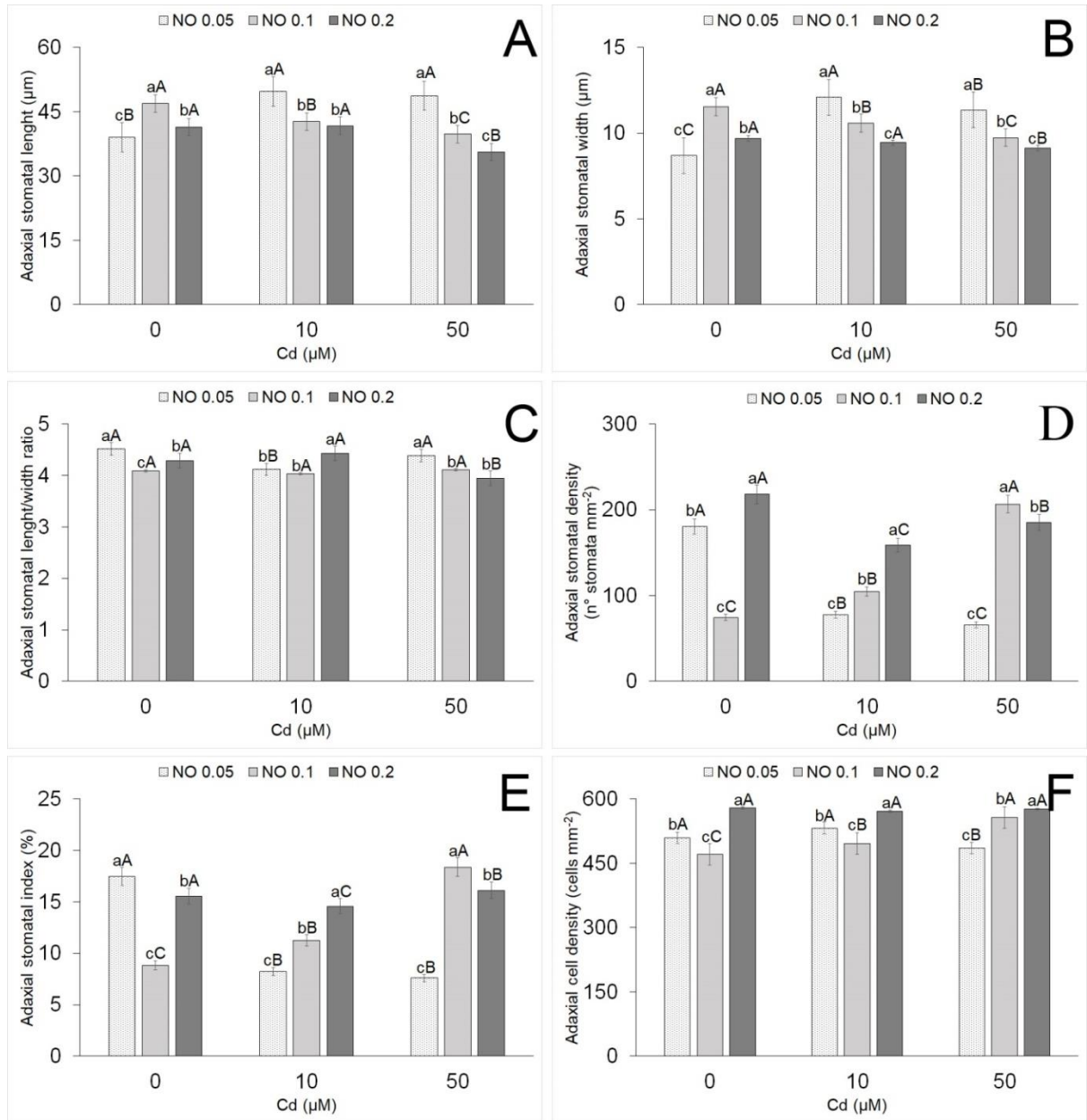


Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. As barras indicam o erro padrão.

Na face adaxial das folhas de milho, as maiores concentrações de Cd reduziram o tamanho dos estômatos, como pode ser observado para o comprimento (Fig. 7A) e largura (Fig. 7B) dessas estruturas, nas maiores concentrações de NO, contudo sob 0,1 μM de NO, os

estômatos aumentaram de tamanho na presença de Cd. Tanto o comprimento (Fig. 7A) quanto a largura (Fig. 7B) dos estômatos aumentaram com o aumento da concentração de NO na ausência de Cd, porém, na presença desse metal, o aumento do NO reduziu as dimensões estomáticas (Fig. 7A e B). A razão largura/comprimento dos estômatos demonstrou algumas variações com redução e um novo aumento nesse parâmetro na menor concentração de NO, ausência de alterações significativas sob 0,1 μM de NO e uma redução na maior concentração de NO e Cd (Fig. 7C). O aumento da concentração de NO reduziu a razão largura/comprimento dos estômatos, na face adaxial foliar do milho, nas concentrações de 0 e 50 μM de Cd, todavia aumentou esse parâmetro na concentração de 10 μM do metal (Fig. 7C). A densidade estomática foi reduzida pela presença de Cd nas concentrações de 0,05 e 0,2 μM de NO, no entanto o Cd aumentou a densidade estomática na concentração de 0,1 μM de NO (Fig. 7D). De uma maneira geral, o aumento da concentração de NO aumentou a densidade estomática em todas as concentrações de Cd (Fig. 7D). O índice estomático reduziu com o aumento do Cd, nas concentrações de 0,05 e 0,1 μM de NO, mas aumentou na presença de Cd e sob 0,1 μM de NO (Fig. 7E). O aumento da concentração de NO reduziu o índice estomático na ausência de Cd, mas aumentou esse parâmetro na presença do poluente (Fig. 7E). A densidade de células epidérmicas nas folhas do milho reduziu sob 0,05 μM de NO e 50 μM de Cd, aumentou com o aumento da concentração de Cd sob 0,1 μM de NO e não foi alterada pelo Cd sob 0,2 μM de NO (Fig. 7F). O aumento da concentração de NO aumentou a densidade de células epidérmicas em todas as concentrações de Cd (Fig. 7F).

Figura 7 - Modificações na epiderme da face adaxial de plantas de milho expostas a diferentes concentrações de Cd e óxido nítrico.



Nota: As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott para $p \leq 0,05$. As barras indicam o erro padrão.

4 DISCUSSÃO

Tanto o Cd quanto altas concentrações de NO reduziram os parâmetros de crescimento do milho, demonstrando que promovem toxicidade para as plantas. De acordo com Hernández-Baranda (2019), o Cd é um metal altamente tóxico mesmo em concentrações muito baixas. O Cd promoveu redução no crescimento das plantas e na biomassa das folhas, caule, raízes. A redução de crescimento, em função da exposição ao Cd, é um efeito comumente encontrado, em várias espécies de plantas, como tomate (HERNÁNDEZ-BARANDA, 2019), pimenta (HUANG, et al., 2014), pinhão-manso (CHAVES & SOUZA, 2014), milho (CUNHA et al., 2008) e feijoeiro (DOS SANTOS, et al., 2013). É importante ressaltar que alguns parâmetros, como a massa seca das raízes e a área foliar não foram prejudicados pela exposição ao Cd, nas plantas, em função de todos os tratamentos possuírem uma concentração mínima de NO que pode ter atenuado a toxicidade pelo Cd. De acordo com Rodríguez-González (2020), a aplicação exógena de NO pode aliviar a toxicidade do Cd em muitas espécies vegetais. O NO pode atuar como agente protetor contra danos causados pela toxicidade do Cd, por meio do estímulo ao sistema antioxidante (ROMERO-PUERTAS et al., 2019). A eficácia do NO, para aliviar a toxicidade do Cd, foi relatada para várias espécies vegetais, como o arroz (HSU E KAO, 2004; XIONG, et al., 2009; ZHAO, et al., 2013), grão de bico (KUMARI et al., 2010) e girassol (LASPINA et al., 2005). Maiores concentrações de NO contribuíram na queda do crescimento das plantas de milho, o que demonstra que o NO, em baixas concentrações, atua como inibidor do estresse pelo Cd, mas, em maiores concentrações, é tóxico para as plantas. Rodríguez-González (2020) relatam que a aplicação endógena de NO deve ser estritamente controlada, pois o excesso de NO pode promover a toxicidade e até a morte das plantas. Os resultados deste trabalho, portanto demonstram que baixas concentrações de NO podem reduzir a toxicidade pelo Cd podendo possuir importantes aplicações no cultivo dessa espécie em locais onde o Cd está presente no solo.

Um resultado importante foi o Cd que não promoveu modificações em parâmetros biométricos foliares, como a área foliar e a alocação de biomassa para as folhas, e o NO aumentou a área foliar, mantendo condições de realizar a fotossíntese em taxas adequadas. Resultados semelhantes foram observados em plantas de tabaco e pimenta para o Cd (ZEITOUNI et al., 2007). Neste experimento, a ausência de efeito do Cd, na área foliar, pode estar relacionada com a presença de NO, em todos os tratamentos, que reduziu a toxicidade desse metal. A manutenção dos parâmetros de crescimento e área foliar é comum em plantas tolerantes ao Cd (Oliveira et al., 2018; Pereira et al., 2017b). Os resultados demonstraram que

houve uma redução da alocação de biomassa para o caule e um aumento nesse parâmetro para as raízes, o que demonstra um investimento no crescimento radicular que pode estar associado a uma compensação à toxicidade do Cd. Essas modificações na alocação da biomassa do milho, em função da aplicação de Cd e NO, podem ser consideradas como resposta de compensação, em decorrência da redução na biomassa total observada nessas plantas. Uma vez que menor quantidade de biomassa está disponível, houve uma manutenção da alocação para as folhas (necessárias para fotossíntese) e aumento na biomassa radicular em detrimento do caule do milho sob contaminação por Cd ou altas concentrações de NO.

A presença de Cd não teve efeito significativo na área foliar, no entanto o NO aumentou esse parâmetro demonstrando possuir efeito positivo. O NO pode reduzir os sintomas da toxicidade do Cd, em plantas de arroz, impedindo a redução da biomassa do caule e raiz (ZHAO et al. 2013). Segundo Chen et al., (2018), os mecanismos do NO, para aliviar a toxicidade de Cd em plantas de azevém, estão relacionados ao aumento da concentração de clorofila, redução do estresse oxidativo e diminuição da translocação de Cd das raízes para as folhas. O NO demonstra possuir capacidade, para reduzir o estresse pelo Cd, por proteger a parte fotossintética das plantas de milho e possibilitar o investimento em área foliar, que permite uma compensação

O aumento da taxa fotossintética, nas plantas de milho expostas ao Cd e à maior concentração de NO, pode estar relacionado com o aumento da espessura do mesofilo e com características estomáticas. O aumento da taxa fotossintética, em plantas submetidas ao Cd, foi verificado em plantas tolerantes a esse metal como *Eichhornia crassipes* (PEREIRA et al, 2017), *Schinus molle* (PEREIRA et al., 2016) e *Lonicera japonica* Thunb (JIA et al., 2015), entre outras. De acordo com Pereira et al., (2016), plantas de *Schinus molle* submetidas a baixas concentrações de Cd aumentam a área e espessura do mesofilo, possibilitando o aumento da taxa fotossintética. Esse aumento da taxa fotossintética, nas plantas de milho, apenas foi possível pela presença de NO, em todos os tratamentos com Cd, uma vez que essa espécie é sensível aos efeitos desse metal. Anjum et al. (2015) demonstram que o Cd é tóxico para o milho, promovendo estresse oxidativo e reduzindo o crescimento. Apesar de o efeito protetor do NO para as plantas de milho, o aumento da taxa fotossintética não foi suficiente, para manter o crescimento das plantas de milho que, ainda, sofreram restrições de crescimento. Sendo assim, percebe-se que esse aumento da taxa fotossintética pode ter possibilitado uma compensação, em alguns parâmetros, como a manutenção do investimento nas folhas de milho e o aumento do investimento no sistema radicular.

O efeito protetor do NO para a toxicidade do Cd é bastante relatado na literatura e está relacionado com a manutenção de parâmetros dos órgãos fotossintéticos. De acordo com Rodríguez-González (2020), o NO tem um papel importante em aliviar a toxicidade do Cd em plantas. O NO tem demonstrado aliviar significativamente o estresse induzido pelo Cd, em plantas de arroz, promovendo a manutenção do crescimento e impedindo a degradação da clorofila (ZHAO et al., 2013). Laspina et al., (2005) demonstraram que o Cd reduziu o crescimento, a produção de biomassa e o conteúdo de clorofila nas folhas de girassol, porém, à medida que as plantas foram tratadas com NO, o efeito do Cd foi revertido. Além do espessamento do mesofilo, o aumento da condutância estomática, promovido pelo Cd e NO, permite maior entrada de CO₂ no interior das folhas, favorecendo o aumento da taxa fotossintética. Segundo Pereira et al., (2016), plantas de *Schinus molle* que é uma espécie tolerante ao Cd reduzem a condutância e densidade estomáticas, em altas concentrações de Cd, limitando a captação de CO₂ e, conseqüentemente, a fotossíntese dessas plantas. Os resultados do presente trabalho demonstram que, mesmo nas maiores concentrações de Cd, não ocorreram modificações na condutância estomática, o que pode ter relação com a presença de NO, mesmo em uma concentração mínima (0,05 µM), que promoveu um efeito de proteção. O NO pode atribuir tolerância ao diminuir o conteúdo de Cd solúvel nas células das folhas alocando na parede das células (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2020; ROMERO-PUERTAS et al., 2019). Plantas tolerantes podem manter a condutância estomática, quando submetidas ao Cd (Oliveira et al., 2018), neste contexto, a presença do NO pode ter favorecido o milho por permitir a manutenção da condutância estomática.

O NO estimulou um comportamento similar a espécies tolerantes ao Cd nas plantas de milho saracura. O NO pode reduzir a entrada do Cd em plantas quando presente em baixas concentrações (BESSON-BARD et al., 2009; RODRÍGUEZ-GONZÁLES et al., 2020). A epiderme das faces abaxial e adaxial aumentaram em espessura nas maiores concentrações de NO e Cd. Estudos têm demonstrado que metais pesados podem induzir o espessamento das paredes celulares nas plantas em que esses metais podem se fixar, evitando danos para o metabolismo celular (JIA et al., 2020; XIONG et al., 2008). O espessamento da epiderme pode ter favorecido a alocação do Cd neste tecido protegendo tecidos como o parênquima clorofiliano que realiza a fotossíntese. Em razão do aumento da espessura do mesofilo nas folhas de milho, nas maiores concentrações de Cd e NO, o milho possui metabolismo fotossintético do tipo C₄, no qual as dimensões das células do parênquima clorofiliano são tão importantes quanto as da bainha do feixe nas respostas fotossintéticas (KLOSS et al., 2021).

Portanto o aumento do tamanho das células da bainha do feixe pode ter favorecido o aumento da taxa fotossintética do milho nas maiores concentrações de Cd e NO.

A redução no diâmetro de vasos de xilema, promovida pelo Cd e maiores concentrações de NO podem ter reduzido o transporte do metal para a parte fotossintética, protegendo essas plantas de efeitos mais graves da toxicidade desse metal. A redução do diâmetro de vasos e outros parâmetros do xilema são uma resposta comum em plantas submetidas ao Cd (Pereira et al., 2016; Pereira et al., 2017b; Oliveira et al., 2018) e ocorre, inclusive, menor atividade do procâmbio, que origina o xilema sob efeito do Cd (Pereira et al., 2017a). Segundo Kan et al., (2016), a utilização de nitroprussiato de sódio, como doador de NO, diminuiu a translocação de Cd para a parte aérea das plantas de *Panax notoginseng*, protegendo os tecidos fotossintéticos do estresse oxidativo induzido pelo Cd. Apesar desse efeito de proteção observado na redução do diâmetro dos vasos de xilema, que reduzem o transporte do metal para a parte aérea, o mesmo efeito pode ser observado para os macros e micronutrientes e, conseqüentemente, o crescimento.

Menores concentrações de Cd e NO promoveram um aumento nos diâmetros polar e equatorial dos estômatos, e esse maior tamanho dos estômatos pode ter favorecido o aumento da condutância estomática, conseqüentemente, o aumento da taxa fotossintética. Segundo Pereira et al. (2017b) e Oliveira et al. (2018), a contaminação por Cd, em plantas de aguapé e taboa, consideradas tolerantes, não promove modificações significativas em características dos estômatos, preservando a sua capacidade de captação de CO₂ e a manutenção da taxa fotossintética. De uma maneira geral, ocorreu um aumento dos estômatos, nas menores concentrações, seguidas de uma redução nas maiores concentrações. Dessa forma, parece haver uma compensação também no tamanho dos estômatos, evitando limitações nas trocas gasosas. Percebe-se que o Cd reduz a densidade estomática, em ambas as faces foliares, nas plantas de milho, na menor e maior concentração de NO, contudo, no tratamento contendo 0,01 µM de NO, a adição de Cd aumentou esse parâmetro. Além disso, nos tratamentos contendo Cd, o aumento do NO aumentou a densidade estomática. Essas modificações promovidas pelo NO, aumentando a densidade estomática, podem favorecer as trocas gasosas e a fotossíntese das plantas de milho na presença de Cd, semelhante ao que ocorre com plantas tolerantes ao metal. O aumento da densidade estomática foi verificado em *Schinus molle* sob baixas concentrações de Cd o que favoreceu o fluxo de CO₂ para o interior das folhas e a fotossíntese (Pereira et al., 2016). Segundo Lira et al., (2018), resultados semelhantes ocorreram, na espécie tolerante *Panicum aquaticum* sob efeito do Cd, com aumento da densidade estomática e favorecimento das trocas gasosas. Portanto o NO alivia o

estresse por Cd, em plantas de milho, também, por promover modificações foliares na epiderme, principalmente, pelo aumento da densidade estomática que pode favorecer as trocas gasosas e captação de CO₂ para fotossíntese.

5 CONCLUSÕES

O Cd afeta negativamente a fotossíntese e o crescimento de milho, mas a adição de o óxido nítrico, em baixas concentrações, diminuiu a toxicidade desse metal e promoveu o desenvolvimento de características semelhantes a plantas tolerantes.

Em altas concentrações, o óxido nítrico pode promover toxicidade para as plantas de milho saracura. Mas a aplicação de NO, em baixas concentrações, aumenta o crescimento, a taxa fotossintética e melhora características anatômicas, promovendo o aumento da espessura dos tecidos fotossintéticos e da densidade estomática nas plantas de milho sob contaminação pelo Cd.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnológica (CONACYT) – México, por financiar a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ANJUM, S. A, et al. Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 22, n. 21, p. 17022-17030, 2015.
- BESSON-BARD, A.; GRAVOT, A.; RICHAUD, P.; AUROY, P.; DUC, C.; GAYMARD, F. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in Arabidopsis by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, 1302–1315, 2009.
- BIZARRO, V. G.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P. Cadmium contents of phosphate fertilizers marketed in Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 247-250, 2008.
- BOEGER, M.R.T. & GLUZEZAK, R. M. Adaptações estruturais de sete espécies de plantas para as condições ambientais da área de dunas de Santa Catarina, Brasil. **Iheringia**. Série Botânica, n. 61, p.73-82, 2006.
- CABRAL, R. D. CH.; MELO-JR, J. C. F.; MATILDE-SILVA, M. Plasticidade morfoanatômica foliar em *Smilax campestris* (Smilacaceae) em gradiente ambiental de restinga, SC, Brasil. **Hoehnea**, v. 45, n. 2, p. 173-183, 2018.
- CHAVES, L. H. G.; SOUZA, R. S. Growth, distribution and content of cadmium in *Jatropha curcas* plants. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 286-291, 2014.
- CHEN, W.; DONG, Y.; HU, G.; BAI, X. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity and antioxidative system in perennial ryegrass. **J. Soil Sci. Plant Nutr**, v. 18, n. 1, 2018.
- CLEMENS, S.; AARTS, M. G. M.; THOMINE, S.; VERBRUGGEN, N. Plant Science: the key to preventing slow cadmium poisoning. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 2, p. 92-99, 2013.
- CUNHA, K. P. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; PIMENTEL, R. M. M.; ACCIOLY, A. M. A.; SILVA, A. J. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1319-1328, 2008.
- DA SILVA, M. M & MELO-JR, J. C. F. Plasticidade da folha e lenho de cinco espécies lenhosas em duas áreas de restinga no Sul do Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v. 72, n. 2, p. 173-180, 2016.
- DOS SANTOS, A. P.; FAGAN, E. B.; TEIXEIRA, W. F.; SOARES, L. H.; DOS REIS, M. R.; CORRÊIA, L. T. Influence of doses of cadmium in emergency and growth of beans. **Cerrado Agrociências**, v. 4, p. 1-8, 2013.
- DUARTE, V. P.; PEREIRA, M. P.; CORREA, F. F.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J. Aerenchyma, gas diffusion, and catalase activity in *Typha domingensis*: a complementary model for radial oxygen loss. **Protoplasma**, 2021.

- EDERLI, L.; REALE, L.; MADEO, L.; FERRANTI, F.; GEHRING, C.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B.; PASQUALINI, S. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 42-48, 2009.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FERREIRA, LEONARDO CESAR, et al. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. **Pesticide Biochemistry and Pgsiology**, v. 91, n. 1, p. 47-54, 2010.
- GRATANI, L.; COVONE, F; LARCHER, W. Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. **Trees**, v. 20, p. 549-558, 2006.
- HANCOCK, J. T. Nitric oxide signaling in plants. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1-5, 2020.
- HERNÁNDEZ- BARANDA, Y.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, P.; PENA-ICART, M.; MERINO-HERNÁNDEZ, Y.; CARTAYA-RUBIO, O. Toxicity of cadmium in plants and strategies to reduce its effects. Case study: the tomato. **Cultivos Tropicales**, v. 40, n. 3, ed. 10, 2019.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agr. Expt. Sta**, v. 347, p.1-39, 1950.
- HSU, Y. T.; KAO, C. H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul**, v. 42, p. 227–238, 2004.
- HUANG, B.; XIN, J.; DAI, H.; LIU, A.; ZHOU, W.; LIAO, K. Root morphological responses of three hot pepper cultivars to Cd exposure and their correlations with accumulation. **Environmetal Science and Pollution Ressearch international**, v. 22, n. 2, p. 1151-1159, 2014.
- ISMAEL, M. A.; ELYAMINE, A. M.; MOUSSA, M. G.; CAI, M.; ZHAO, X.; HU, C. Cadmium in plants: uptake, toxicity, and its interactions with selenium fertilizers. **Metallomics**, v. 11, p. 255-277, 2019.
- JELONEK-ARASIMOWICZ, M.; WIECZOREK-FLORYSZAK, J.; GWÓZDZ, E. A. The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. **Plant Science**, v. 181, p. 612-620, 2011.
- JIA, L.; LIU, Z.; CHEN, W.; YE, Y.; YU, S.; HE, X. Hormesis effects induced by cadmium on growth and photosynthetic performance in a hyperaccumulator, *Lonicera japonica* thunb. **J Plant Growth Regul**, n. 34, p. 13–21, 2015.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.
- KAN, QI et al. Nitrate reductase-mediated NO production enhances Cd accumulation in *Panax notoginseng* roots by affecting root cel Wall properties. **Journal of Plant Physiology**, v. 193, p. 64-70, 2016.

KOLB, R. M.; JOLY, C. A. Flooding tolerance of *Tabebuia cassinoides*: Metabolic, morphological and growth responses. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 204, n. 7, p. 528-535, 2009.

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

KUMARI, A.; SHEOKAND, S.; SWARAJ, K. Nitric oxide induced alleviation of toxic effects of short term and long term Cd stress on growth, oxidative metabolism and Cd accumulation in chickpea. **Brazilian J. Plant Physiol**, n. 22, p. 271–284, 2010.

LASPINA, N.V.; GROPPA, M. D.; TOMARO, M. L.; BENAVIDES, M. P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Sci.** n. 169, p. 323–330, 2005.

LI, H. Y.; SHAO, H. Exogenous nitric oxide reduces cadmium toxicity of maize roots. **Advanced Materials Research**, v. 378-379, p. 409-413, 2012.

LIRA, M. F. P.; CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; OLIVEIRA, C.; LIRA, J. M. S. RAMOS, S. J. Anatomic and physiological responses of *Panicum aquaticum* related to cadmium tolerance, *Journal of Soil and Water Conservation*, v. 73, n. 2, p. 207-212, 2018.

MARIA, S. et al. Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. **Chemosphere**, v. 84, n. 9, p. 1256–1261, 2011.

MORO, M. A.; DARLEY-USMAR, V. M.; LIZASOAIN, I. The formation of nitric oxide donors from peroxyxynitrite. **British Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 1999-2004, 1995.

NEVES, P. A. P. F. G., et al. Determinação de metais em espécies florestais da amazônia. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 87-97, 2016.

OLIVEIRA, J.; CAMBRIA, J.; JORDÃO, C. P.; OLIVA, M. A. Cadmium absorption and accumulation and its effects on the relative growth of water hyacinths and salvinia. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, n. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

OLIVEIRA, J. P. V. ; PEREIRA, M. P. ; DUARTE, V. P. ; CORREA, F. F. ; CASTRO, E. M. ; PEREIRA, F.J. . Cadmium tolerance of *Typha domingensis* Pers. (Typhaceae) as related to growth and leaf morphophysiology. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 509-516, 2018.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M. F.; PASQUAL, M. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, n. 29, p. 259–267, 2011.

PEREIRA, F.J.; CASTRO, E. M. ; MAGALHÃES, P.C. ; SOUZA, T.C.DE . Evolution of the root anatomy of 'Saracura' maize in successive selection cycles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Imprensa), v. 43, p. 1649-1656, 2008.

- PEREIRA, F.J.; MAGALHÃES, P.C. ; SOUZA, T.C.DE ; CASTRO, E. M. ; ALVES, J. D. . Atividade do sistema antioxidante e desenvolvimento de aerênquima em raízes de milho 'Saracura'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (1977. Impressa), v. 45, p. 451-456, 2010.
- PEREIRA, F.J.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M. F.; PEREIRA, M. P.; RAMOS, S. J.; FAQUIN, V. Lead tolerance of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart.-Pontederiaceae) as defined by anatomical and physiological traits. **An Acad Bras Ciênc**, v. 86, p. 1423–1433, 2014.
- PEREIRA, M. P.; CORRÊA, F. F.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, J. P. V.; PEREIRA, F. J. Leaf ontogen of *Schinus molle* L. plants under cadmium contamination: the meristematic origin of leaf structural changes. **Protoplasma**, v. 254, n. 6, p. 2117-2126, 2017a.
- PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; PIRES, M. F.; OLIVEIRA, C.; PASQUAL, M. Anatomical and physiological modifications in water hyacinth under cadmium contamination. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 90, p. 17-24, 2017b.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agroambiente**, v. 7, n. 1, p. 36-46, 2013.
- PEREIRA, M. P.; RODRIGUES, L. C. A.; CORRÊA, F. F.; CASTRO, E. M.; RIBEIRO, V. E.; PEREIRA, F. J. Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. **Tress**, v. 30, n. 3, p. 807-814, 2016.
- RAVEN, K.P.; LOEPPERT, R.H. Trace element composition of fertilizers and soil amendments. **Journal of Environmental Quality**, v.26, p.551-557, 1997.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A.; TERRÓN-CAMERO, L. C.; ROMERO-PUERTAS, M. C. Funciones del óxido nítrico en la respuesta de la planta a la toxicidad por cadmio. **Ecosistemas**, v. 29, n. 2, p. 1-12, 2020.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; TERRÓN-CAMERO, L. C.; PELÁEZ-VICO, M. Á.; OLMEDILLA, A.; SANDALIO, L. M. Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress. **Environmental and Experimental Botany**, n. 161, p. 107–119, 2019.
- SHAHID, M et al., Role of metal spectation in lead-induced oxidative stress to *Vicia faba* roots. **Russian J Plant Physiol**, v. 62, p. 448-454, 2015a.
- SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, G.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. **Environ Exp Bot**, v. 63, p. 158–167, 2008.
- SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **R. Bras. Fisiol. Veg**, n. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

- SOUSA, SYLVIA MORAIS et al. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.
- SOUZA, T. C.; MAGALHÃES, P. C.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; SILVA JUNIOR, J. M.; PARENTONI, S. N. Leaf plasticity in successive selection cycles of 'Saracura' maize in response to periodic soil flooding. **Pesq. Agropec. Bras.** V. 45, n. 1, p. 16-24, 2010.
- SOUZA, V. L.; ALMEIDA, A. A. F.; LIMA, S. G.; CASCARDO, J. C. D. M.; SILVA, D. D. C.; MANGABEIRA, P. A.; GOMES, F. P. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Biometals**, v. 24, p. 59-71, 2011.
- SUNT, B.; JING, Y.; CHEN, K.; SONG, L.; CHEN, F.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 5, p. 536-543, 2007.
- VECCHIA, F.D.; LA ROCCA, N.; MORO, I.; DE FAVERI, S.; ANDREOLI, C. & RASCIO, N. Morphogenetic ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**, n. 168, p. 329-338, 2005.
- XIONG, J.; AN, L.; LU, H.; ZHU, C. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. **Planta**, v. 230, 755-765, 2009.
- YAMAMOTO, T. & BING, R. J. Nitric oxide donors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, p. 200-206, 2000.
- ZHAO, XIU-FENG, et al. Effect of nitric oxide on alleviating cadmium toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 9, p. 1540-1550, 2013.
- ZEITOUNI, C. F.; BERTON, R. S.; ABREU, C. A. Fitoextração de cádmio e zinco de um latossolo vermelho-amarelo contaminado com metais pesados. **Bragantia**, vol. 66, n. 4, p. 649-657, 2007.