



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANA ECÍDIA DE ARAÚJO BRITO

**ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE DE COBRE NA
EMERGÊNCIA, CRESCIMENTO INICIAL, NUTRICIONAL E PARÂMETROS
ECOFISIOLÓGICOS EM MILHO.**

BELÉM

2021

ANA ECIDIA DE ARAÚJO BRITO

**ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE DE COBRE NA
EMERGÊNCIA, CRESCIMENTO INICIAL, NUTRICIONAL E PARÂMETROS
ECOFISIOLÓGICOS EM MILHO.**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da
Amazônia, como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Agronomia para obtenção do
título de Doutora.

Área de concentração: Agronomia

Orientador: Prof.º Dr.º Ricardo Shigueru Okumura

Coorientador: Prof.º Dr.º Cândido Ferreira de
Oliveira Neto

BELÉM

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B862Ã Brito, Ana Ecídia de Araújo

ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE DE COBRE NA EMERGÊNCIA,
CRESCIMENTO INICIAL, NUTRICIONAL E PARÂMETROS ECOFISIOLÓGICOS EM MILHO /
Ana Ecídia de Araújo Brito. - 2021.

87 f. : il. color.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus
Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura

Coorientador: Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto.

1. Metais pesados. 2. Micronutrientes. 3. Milho. 4. Atenuador. 5. Óxido Nítrico. I. Okumura,
Ricardo Shigueru. *orient.* II. Título

CDD 632.1

ANA ECIDIA DE ARAÚJO BRITO

ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE DE COBRE NA EMERGÊNCIA, CRESCIMENTO INICIAL, NUTRICIONAL E PARÂMETROS ECOFISIOLÓGICOS EM MILHO.

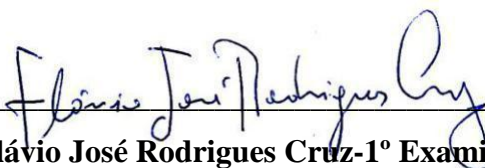
Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutora. Área de concentração: Agronomia.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2021.

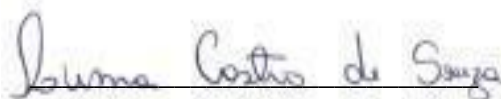
BANCA EXAMINADORA:



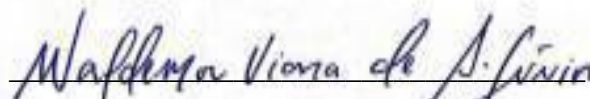
Prof. Dr. Ricardo Shigeru Okumura- Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



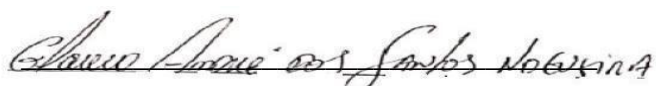
Dr. Flávio José Rodrigues Cruz-1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO-UFRRPE



Dr.^a Luma Castro de Souza- 2º Examinadora
PREFEITURA MUNICIPAL DE CAPITÃO POÇO



Dr. Waldemar Viana de Andrade Júnior-3º Examinador
SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE-SEMAS



Dr. Glauco André dos Santos Nogueira-4º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA

A Jesus Cristo

Aos meus pais Tomás da Silva Brito e Maria Elizenir de Araújo Brito

Aos meus irmãos Ely Cristina de Araújo Brito e Tomaz Ricardo de Araújo Brito

Aos meus sobrinhos Sophia de Oliveira Brito e Tomaz de Oliveira Brito

A minha cunhada Silvia Caroline Maciel de Oliveira Brito

Com todo o meu amor por vocês!

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui com saúde, paz e bênçãos em minha vida.

A Nossa Senhora de Fátima por sua intercessão junto a seu filho Jesus Cristo.

Aos meus familiares, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu orientador Ricardo Shigueru Okumura pelo apoio, respeito e confiança depositada em mim.

Ao meu amigo de longas datas e coorientador Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto, pelos seus conselhos, amizade e orientação na condução deste trabalho. A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) minha segunda casa.

A Coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia pelo aprendizado.

Ao Instituto de Ciências Agrárias e todos seus funcionários.

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi representado pela Dr.^a Cristine Bastos do Amarante e sua equipe, pela realização das análises nutricionais.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos amigos de equipe, que sem eles esse trabalho não poderia ter sido realizado: Gerson Diego Pamplona Albuquerque, Luciana Ingrid de Sousa, Jessica Suellen Silva Teixeira, Diana Jhulia Palheta de Sousa.

Ao amigo Vitor Resende pela tradução dos resumos aqui presente.

Aos amigos Ítalo Sampaio, Wagner Lopes e Gabriel Ito Teixeira pela realização das medições do SPAD e trocas gasosas.

À amiga Kerolém Cardoso que mesmo de longe pude contar com seu apoio e amizade sempre que precisei.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), Keila Beatriz Teixeira, Juscelino Palheta, Valter Saldanha, Glauco André, Andressa Paiva, que de maneira direta ou indireta ajudaram na realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

“Ser feliz é sentir o sabor da água, a brisa no rosto, o cheiro da terra molhada. É extrair das pequenas coisas grandes emoções. É encontrar todos os dias motivos para sorrir, mesmo se não existirem grandes fatos. É rir de suas próprias tolices. É não desistir de quem se ama, mesmo se houver decepções. É ter amigos para repartir as lágrimas e dividir as alegrias. É ser um amigo do dia e um amante do sono. É agradecer a Deus pelo espetáculo da vida”.

Augusto Cury

RESUMO GERAL

O trabalho avaliou o efeito do óxido nítrico (NO) como atenuador da toxicidade de cobre (Cu) na emergência, crescimento inicial, nutrição e parâmetros ecofisiológicos em milho (*Zea mays* L.). O primeiro experimento foi conduzido no laboratório de sementes do grupo de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores-EBPS na Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA/Campus Belém. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3, com 12 tratamentos e 8 repetições, totalizando 96 bandejas contendo 25 sementes por repetição. As sementes da variedade K9606VIP3 foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 75 e 150 μM), como doador do NO, ferrocianeto de sódio $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0, 75 e 150 μM) como compensador e água deionizada (controle) e colocadas em areia contendo concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 e 200 μM). O Cu influenciou negativamente na emergência, resultando no aumento do percentual de plântulas anormais, redução no coeficiente de velocidade de emergência e maior tempo médio de emergência. A dosagem de 200 μM de Cu causou menor massa seca da raiz e aumento de prolina nas raízes. O NO amenizou o efeito da toxidez de Cu em relação à massa seca da parte aérea. Houve acúmulo de Cu nas raízes, alterando o equilíbrio mineral e a mobilização dos nutrientes. O NPS e o FCS causaram toxidez e influenciaram negativamente nos teores de nutrientes. O segundo experimento foi conduzido em casa de vegetação. As sementes de milho foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo NPS $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 200 e 300 μM), FCS $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0, 200 e 300 μM) e água deionizada. As sementes foram semeadas em baldes com 15 kg de solo contendo concentrações de Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0, 60 e 200 mg kg^{-1}) incubados por 50 dias. O delineamento consistiu em blocos casualizados, com 12 tratamentos e 4 repetições, totalizando 48 plantas. Não houve efeito dos tratamentos na altura, área foliar, número de folhas, mas foi observado aumento no diâmetro do colmo nos tratamentos com Cu. Não houve efeito dos tratamentos no índice de clorofila medido pelo SPAD e nas trocas gasosas. As concentrações de 60 e 200 mg kg^{-1} de Cu não afetaram negativamente as variáveis da fluorescência da clorofila *a* atuando como um micronutriente dentro dos limites favoráveis. As variáveis da fluorescência da clorofila *a* demonstraram o efeito do NO presente no NPS e do cianeto presente no FCS no aumento da dissipação causada pelo processo fotoquímico onde a energia é utilizada na redução do NADP.

Palavras chave: Poácea. Fitotoxicidade. Metal pesado

GENERAL ABSTRACT

The work evaluated the effect of nitric oxide (NO) as an attenuator of copper (Cu) toxicity in emergence, initial growth, nutrition and ecophysiological parameters in corn (*Zea mays* L.). The first experiment was conducted in the seed laboratory of the Biodiversity Studies in Higher Plants group - EBPS at the Federal Rural University of the Amazon - UFRA/Campus Belém. The experimental design was completely randomized in a 4 x 3 factorial scheme, with 12 treatments and 8 repetitions, totaling 96 trays containing 25 seeds per repetition. The seeds of the K9606VIP3 variety were soaked for 48 hours in Germitest paper with a solution containing sodium nitroprusside $\text{Na}_2 [\text{Fe} (\text{CN})_5 \text{NO}] 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 75 and 150 μM), as NO donor, sodium ferrocyanide $\text{Na}_4\text{Fe} (\text{CN})_6$ (0, 75 and 150 μM) as compensator and deionized water (control) and placed in sand containing concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 and 200 μM). Cu influenced negatively in the emergency, resulting in an increase in the percentage of abnormal seedlings, a reduction in the emergency speed coefficient and a longer average emergency time. The dosage of 200 μM of Cu caused a lower dry mass of the root and an increase in proline in the roots. NO mitigated the effect of Cu toxicity in relation to the dry mass of the aerial part. Cu accumulated in the roots, altering the mineral balance and the mobilization of nutrients. NPS and FCS caused toxicity and negatively influenced nutrient levels. The second experiment was conducted in a greenhouse. The corn seeds were soaked for 48 hours in Germitest paper with a solution containing NPS $\text{Na}_2 [\text{Fe} (\text{CN})_5 \text{NO}] 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 200 and 300 μM), FCS $\text{Na}_4\text{Fe} (\text{CN})_6$ (0, 200 and 300 μM) and deionized water. The seeds were sown in buckets with 15 kg of soil containing concentrations of Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0, 60 and 200 mg kg^{-1}) incubated for 50 days. The design consisted of randomized blocks, with 12 treatments and 4 repetitions, totaling 48 plants. There was no effect of treatments on height, leaf area, number of leaves, but an increase in stem diameter was observed in treatments with Cu. There was no effect of treatments on the chlorophyll index measured by SPAD and gas exchange. The concentrations of 60 and 200 mg kg^{-1} of Cu did not negatively affect the fluorescence variables of chlorophyll a, acting as a micronutrient within favorable limits. The fluorescence variables of chlorophyll a demonstrated the effect of NO present in NPS and cyanide present in FCS in increasing dissipation caused by the photochemical process where energy is used to reduce NADP.

Keywords: Poaceae. Phytotoxicity. Heavy metal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais vias de formação de NO em plantas.	18
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo da análise de variância do comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), comprimento da parte aérea (CPA), tempo médio (TM), índice de velocidade de emergência (IVE), germinação (G), plântulas anormais (PA), coeficiente velocidade de emergência (CVE), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), prolina parte aérea e prolina raiz.....	34
Tabela 2 – Comprimento total (CT), comprimento da parte aérea (CPA), prolina na raiz, emergência, coeficiente de velocidade de emergência (CVE), plântulas anormais, tempo médio de emergência (TME) de plântulas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, ferrocianeto de sódio (FCS), compensador e expostas à toxicidade por cobre.	35
Tabela 3 – Comprimento da raiz (CR), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, ferrocianeto de sódio (FCS), compensador, expostas à toxicidade por cobre.	35
Tabela 4 – Prolina nas partes aéreas e prolina nas raízes de plântulas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, ferrocianeto de sódio (FCS), compensador e expostas à toxicidade por cobre.....	36
Tabela 5 – Resumo da análise de variância da fotossíntese (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO ₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), temperatura foliar (Tleaf), relação concentração interna CO ₂ /concentração externa CO ₂ (Ci/Ca), F0 (fluorescência inicial), Fm (fluorescência máxima), Fv (fluorescência variável), Fv/Fm (eficiência quântica potencial do PSII), Fs (fluorescência no estado estável), Fm' (fluorescência máxima adaptada ao claro), ΦPSII (eficiência quântica efetiva), NPQ (dissipação não fotoquímica), Fo/Fm' (eficiência quântica basal do PS II), Fo' (fluorescência mínima da folha adaptada ao claro), qP (dissipação fotoquímica), Fv'/Fm' (Parâmetro de Genty), ETR (taxa de transporte de elétrons), qL (coeficiente de fotoinibição) de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.	48
Tabela 6 – Efeito das concentrações de cobre no diâmetro do colmo e nos parâmetros da fluorescência da clorofila a de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.....	49

Tabela 7 – Efeito do nitroprussiato de sódio (NPS) e ferrocianeto de sódio (FCS) nos parâmetros da fluorescência da clorofila a de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.	51
Tabela 8 – Resumo da análise de variância do índice SPAD, altura, área foliar, número de folhas, diâmetro do colmo de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.....	53
Tabela 9 – Teores de nutrientes nas raízes de plântulas de milho (<i>Zea mays</i> L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.....	69
Tabela 10 – Teores de nutrientes na parte aérea de plântulas de milho (<i>Zea mays</i> L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.....	70
Tabela 11 – Fator de bioacumulação (FBC) de plântulas de milho (<i>Zea mays</i> L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.....	71
Tabela 12 – Fator de translocação (FT) de plântulas de milho (<i>Zea mays</i> L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- A** - Taxa fotossintética líquida
- A/E** - Eficiência do uso da água
- ANOVA** - Análise de Variância
- Ca** - Concentração de CO₂
- Cd** - Cádmio
- Ci** - Concentração interna de CO₂
- Ci/Ca** - Relação concentração interna CO₂ /concentração externa
- CO₂ cm** - Centímetro
- CO₂** - Dióxido de carbono
- CPA**- Comprimento da parte aérea
- CR** - Comprimento da raiz
- CT** - Comprimento total
- Cu** - Cobre
- CVE** - Coeficiente de velocidade de emergência
- E** - Transpiração
- EBPS** - Estudo da biodiversidade em plantas superiores
- EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio
- ETR** -Taxa de transporte de elétrons
- EUA** - Eficiência do Uso da Água
- F₀** - Fluorescência Mínima
- F_m** - Fluorescência Máxima
- F_v** - Fluorescência Variável
- F_v/F_m** - Rendimento quântico potencial do fotossistema II
- F_v'/F_m'** -Eficiência fotoquímica efetiva
- g** – Gramas
- G** - Germinação
- gs** - Condutância estomática
- ICA** - Instituto de Ciências Agrárias
- IRGA** - Infra-red Gas Analyser
- IVE** - Índice de velocidade de emergência
- MSPA** - Massa seca da parte aérea
- MSR** - Massa seca da raiz

NO - Óxido Nítrico

qL - Coeficiente de fotoinibição

qP- Dissipação fotoquímica

SISVAR - Sistema de Análises Estatísticas e Planejamento

NPS - Nitroprussiato de sódico

SPAD -Soil Plant Analysis Development

Tleaf - Temperatura foliar

TM - Tempo médio

UFRA - Universidade Federal da Amazônia

ΦFSII - Eficiência Fotoquímica Fotossistema II

SUMÁRIO

1 CONTEXTUALIZAÇÃO	15
REFERÊNCIAS	21
2 ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE POR COBRE NA EMERGÊNCIA E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO	26
RESUMO	26
ABSTRACT	27
2.1 Introdução	28
2.2 Resultados e discussão	29
2.3 Material e Métodos	36
2.4 Conclusão	37
REFERÊNCIAS	38
3 ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DE ALTERAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS À TOXICIDADE POR COBRE	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
3.1 Introdução	44
3.2 Material e Métodos	45
3.3 Resultados e discussões	47
3.4 Conclusão	54
REFERÊNCIAS	55
4 ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE DE COBRE NOS TEORES DE NUTRIENTES EM PLÂNTULAS DE MILHO	61
RESUMO	61
ABSTRACT	62
4.1 Introdução	63
4.2 Material e Métodos	64
4.3 Resultados	66
4.4 Discussão	71
4.5 Conclusão	75
REFERÊNCIAS	76

CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
ANEXO	83

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Nas últimas décadas, o milho alcançou o patamar de maior cultura agrícola do mundo, com relevância no aspecto de segurança alimentar, na alimentação humana e, principalmente, animal (MIRANDA, 2018). Para a safra 2020/21, a produção total esperada é de 105,2 milhões de toneladas, aumento de 2,6% em relação à safra anterior. Para as importações, é mantido um valor de 900 mil toneladas para a safra 2020/21 (CONAB, 2020).

Durante a colheita da safra de verão de 2020 teve início a pandemia da Covid-19. A economia mundial estava em declínio, no entanto, houve uma reversão no mercado de grãos, um comportamento atípico dos principais produtos (ELIAS, 2020). O movimento de alta do dólar e a baixa oferta do grão contribuíram para a valorização do milho, com a perspectiva para o mercado futuro para março de 2021, de R\$70,1 por saca representando uma alta de 22,1% em relação ao valor médio nominal observado em março de 2020, segundo indicador Cepea (R\$57,41 por saca) (FARMNEWS, 2020).

O aumento da produção agrícola elevou a necessidade de adição de insumos, aumentando assim os teores de metais pesados nos solos (SARWAR et al., 2017). Os rejeitos da exploração mineral pode causar aumento nos teores naturais de metais pesados no ambiente (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; CUNHA, 2017), resultando em um problema ambiental.

O grau de adsorção dos metais pesados depende da eletronegatividade das partículas do solo (MAMEDES, 2017), podendo ser absorvidos pelas plantas e em altas concentrações são considerados tóxicos (ALI et al., 2019), alguns metais são considerados essenciais, desempenhando diversas funções metabólicas no organismo, como a formação de enzimas, como cofatores (BUTNARIU, 2018) e na transfência de elétrons (AGUIRRE; PILON, 2016).

O Cu é um micronutriente naturalmente encontrado em baixos teores disponíveis (HUGEN et al., 2013), apresenta densidade igual a $8,96 \text{ g cm}^{-3}$, que por ser superior a 5 g cm^{-3} caracteriza como um metal pesado (SHARMA et al., 2016). Podemos citar como principais fontes de contaminação por cobre as atividades de mineração, fundição e o uso de fertilizantes e fungicidas utilizados na agricultura (BASSO; KIANG, 2017).

Devido à sua capacidade de perder e ganhar elétrons facilmente, o Cu atua como cofatores em várias enzimas, como citocromo *c* oxidase, polifenol oxidase, Cu/Zn superóxido dismutase e plastocianina (NAZIR; HUSSAIN; FARIDUDDIN, 2019; ZHANG et al., 2019). O papel mais importante do Cu nas plantas é o transporte de elétrons no cloroplasto e nas mitocôndrias (AGUIRRE; PILON, 2016).

Segundo a resolução N° 420 do CONAMA (2009), o valor orientador como limite máximo para o cobre total em áreas agrícolas é de 200 mg kg^{-1} sem que ocorra intervenção. O conteúdo de matéria orgânica do solo (MO) tem um papel muito importante na mobilidade e disponibilidade de metais pesados (LAURENT et al., 2020), a maior parte do Cu inorgânico no solo é insolúvel e apresenta baixa fitodisponibilidade (MIHALJEVIĆ et al., 2019).

Em altas concentrações o Cu causa danos aos seres vivos e induz a deficiência de outros nutrientes (TAIZ et al., 2017), possibilitando a intoxicação em diferentes elos da cadeia trófica (CORNU et al., 2017). Em plantas a toxidez por Cu se expressa, sobretudo, na ausência de formação de raízes (TAIZ et al., 2017), como verificado no trabalho de De Conti (2018), onde a redução no crescimento e o acúmulo de macronutrientes em videiras jovens, indicou toxidez pelo excesso desse metal (BALDI et al., 2018). Segundo Benimeli et al. (2009), plantas de milho podem tolerar e acumular altas concentrações de Cu sem apresentar mudanças morfológicas visíveis, é provável que a espécie esteja imobilizando ou compartimentando o excesso de Cu.

As plantas cultivadas em solos com alto teor de Cu apresentam redução na taxa fotossintética e na respiração (MARQUES et al., 2018), redução do comprimento da raiz, biomassa, declínio na absorção de nutrientes (DE MARCO et al., 2017; XU et al., 2017) o que pode resultar em estresse oxidativo, com aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KÜPPER; ANDRESEN, 2016), resultando na inibição no desenvolvimento da planta (ADREES et al., 2015).

Os elementos-traço podem causar o estresse oxidativo interferindo nas enzimas envolvidas no processo de germinação (KO; LEE; KONG, 2012), esses efeitos na emergência de sementes podem estar relacionados com a diminuição da atividade das α e β amilases, comprometendo a respiração, impedindo o crescimento do eixo embrionário e da radícula (PIRES et al., 2016).

O Cu tem influência negativa sobre enzimas chaves de fixação de CO_2 , ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (RuBPCase) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) (TRAN; POPOVA, 2013), o declínio dos valores do rendimento potencial da reação fotoquímica (Fv/Fm) é um bom parâmetro para acompanhar a inativação dos centros de reação do fotossistema II-PSII (SCHANSKER et al., 2014). O Cu em níveis tóxicos se liga à grupamentos sulfidrilas (-SH) podendo substituir o Magnésio (Mg^{2+}), Zinco (Zn^{2+}) ou Ferro (Fe^{2+}) nos cloroplastos (AMEH; SAYES, 2019).

A complexa dinâmica de captação e transporte de nutrientes sob toxicidade por Cu pode ser devido à competição entre Cu e nutrientes por transportadores (ZHANG et al., 2017).

Vários estudos relataram que altas concentrações de Cu alteram o conteúdo de macro e micronutrientes tanto na parte aérea quanto na raiz (DE FREITAS et al., 2015).

Para tolerar os efeitos dos estresses ambientais, as plantas utilizam o mecanismo de ajustamento osmótico (DESTRO, 2006). Este mecanismo capacita a célula a acumular compostos, denominados solutos compatíveis ou osmoprotetores, que preservam a integridade celular (MELONI et al., 2004). A prolina atua como um osmorregulador na tolerância das plantas ao estresse induzido por Cu (SHARMA et al., 2019).

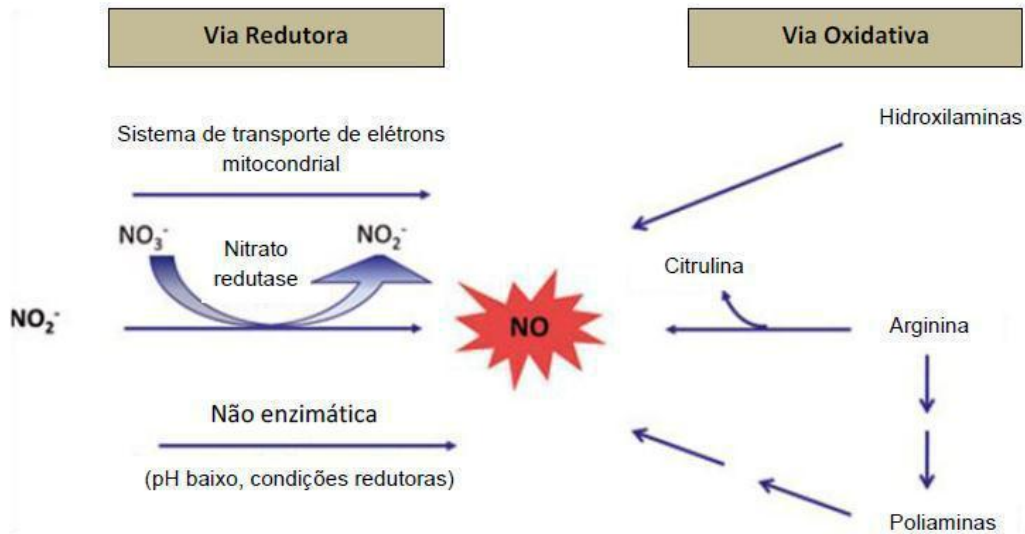
Plantas que apresentam tolerância quanto à absorção dos metais pesados, geralmente acumulam maiores concentrações destes metais na raiz em relação à parte aérea (GARBUSU; ALKORTA, 2001). Algumas espécies podem se adaptar a ambientes com altas concentrações de metais fazendo com que elas sejam utilizadas em técnicas de fitorremediação (MAHAR et al., 2016), que utiliza plantas para extrair (bioacumulação) os contaminantes, uma técnica eficiente e econômica (KHALID et al., 2017; SARWAR et al., 2017). Segundo Seidel (2009), raízes de milho absorveram parte do Cu em excesso aplicado, não havendo translocação proporcional para a parte aérea, evidenciando que as raízes de milho possuem mecanismos que impedem a translocação de parte do excedente de Cu absorvido.

Em estudos na regulação da resposta das plantas a contaminantes ambientais o óxido nítrico (fórmula $N=O$, abreviadamente NO) exerce um papel chave (ZAGO et al., 2006), apresentando-se como uma molécula sinalizadora nos vegetais, em respostas aos estresses abióticos, na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta e defesa contra patógeno (SANZ et al., 2015).

Muitos relatos indicam que a aplicação de óxido nítrico (NO) exógeno na forma de nitroprussiato de sódio (NPS), como um doador de NO, melhora a tolerância da planta ao estresse causado por metais pesados (XU, 2010). O NO pode ser produzido através de diversas fontes, incluindo a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e vias dependentes de arginina e nitrito (BAUDOUIN, 2011; GROß, DURNER; GAUPELS, 2013). Além da arginina, a geração de NO a partir do nitrito pode ocorrer por vias enzimáticas e não enzimáticas (Figura 1) (YAMASAKI; SAKIHAMA; TAKAHASHI, 1999).

Outra fonte de NO em plantas, resulta da atividade da enzima nitrato redutase (NR) que pode gerar NO a partir de nitrito em uma reação dependente de NAD(P)H (DEAN; HARPER 1988; KLEPPER 1990; ROCKEL et al. 2002).

Figura 1 - Principais vias de formação de NO em plantas.



Fonte: Modificado de Moreau *et al.* 2010.

A aplicação de NO exógeno sob a forma de NPS melhora a tolerância de plantas ao estresse causado por metais pesados (WANG *et al.*, 2013). Em relação à atividade antioxidante, o NO pode reagir diretamente com as ERO e com metais de transição (TOSSI *et al.*, 2011). Esses estudos indicam que o efeito protetor do NPS foi devido à liberação de NO.

No entanto, alguns autores contestam que o efeito causado por doadores de NO seja propriamente do NO, como relatado em sementes de *Arabidopsis*, onde foi utilizado o NPS para superar a dormência, porém, os autores constataram que o efeito seria do cianeto presente no NPS (BETHKE; LIBOUREL; JONES, 2006). Segundo Silva *et al.* (2019), o cianeto aplicado via NPS foi benéfico para a germinação de sementes de *Senna macranthera* sob estresse salino reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando a atividade das enzimas antioxidantes.

De acordo com Fan *et al.* (2007), o NO tem a capacidade de atenuar os danos nas membranas por redução da permeabilidade e peroxidação de lipídios envolvendo outros mecanismos bioquímicos, controlados por hormônios como o ácido abscísico-ABA (MONTEIRO *et al.*, 2012).

A cadeia transportadora de elétrons cloroplastídica possui diversas proteínas contendo metais de transição, são alvo para ligação do NO (YAMASAKI, 2001). Os sítios de ação de NO encontram-se no PSII, entre a QA (quinona A) e QB (quinona B), evitando que ocorra a redução de QA (SANAKIS *et al.*, 1997).

O NO pode funcionar como um regulador positivo e negativo das respostas ao estresse dependendo de sua concentração local (MUR et al., 2012). Seus efeitos dependem de alterações químicas nas proteínas, como a S-nitrosilação (MALIK et al., 2011; FRUNGILLO et al., 2014), mediando os efeitos dos hormônios e de outras moléculas sinalizadoras preliminares (WILSON; NEILL; HANCOCK, 2008).

Considerando tais aspectos foram elaboradas as seguintes questões: (1) O NO irá atenuar a toxicidade de Cu na emergência e crescimento inicial de plântulas de milho? (2) O NO irá atenuar a toxicidade de Cu nos parâmetros fisiológicos, biométricos de plantas de milho? (3) O NO irá atenuar a toxicidade de Cu no parâmetro nutricional em plântulas de milho em crescimento inicial?

Neste sentido, no referido trabalho aceita-se como hipótese do segundo capítulo que o NO atenuará os efeitos fitotóxicos das concentrações de Cu em relação ao parâmetro de emergência e crescimento inicial de plântulas de milho.

No terceiro capítulo aceita-se como hipótese que o NO atenuará os efeitos fitotóxicos das concentrações de Cu em relação às variáveis fisiológicas e biométricas de plantas de milho.

No quarto capítulo aceita-se como hipótese que o NO atenuará os efeitos fitotóxicos das concentrações de Cu em relação à nutrição de plântulas de milho em crescimento inicial.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito atenuador do NO na emergência, biometria, biomassa e nutrição de plântulas de milho em crescimento inicial, assim como, avaliar os aspectos ecofisiológicos de plantas de milho da variedade K9606 VIP3 submetidas à fitotoxicidade de Cu.

1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do NO sobre a emergência, índice de velocidade de emergência, coeficiente de velocidade de emergência, tempo médio de emergência e a anormalidade de plântulas de milho submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre o comprimento de raiz, comprimento da parte aérea, comprimento total, massa seca da raiz, massa seca da parte aérea, massa seca total e o teor de prolina nas raízes e folhas de plântulas de milho submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre a taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração, carbono intracelular e do ambiente, concentração interna de CO₂, eficiência do uso da água, temperatura foliar de plantas de milho submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre o teor de clorofila através do índice SPAD de plantas de milho submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre o crescimento (altura da planta, diâmetro do colmo, área foliar e número de folhas) de plantas de milho submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre a fluorescência da clorofila *a* (fluorescência inicial, fluorescência máxima, fluorescência variável, eficiência quântica potencial do PSII, fluorescência no estado estável, fluorescência máxima adaptada ao claro, eficiência quântica efetiva, dissipação não fotoquímica, eficiência quântica basal do PS II, fluorescência mínima da folha adaptada ao claro, dissipação fotoquímica, parâmetro de Genty, taxa de transporte de elétrons, coeficiente de fotoinibição) de plantas de milho submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre os macro e micronutrientes catiônicos Magnésio (Mg⁺²), Cálcio (Ca⁺²), Ferro (Fe⁺²), Cobre (Cu⁺²), Zinco (Zn⁺²) e Manganês (Mn⁺²) em plântulas de milho em crescimento inicial submetidas à toxicidade de Cu;

Avaliar o efeito do NO sobre o fator de bioacumulação e de translocação do Cu em plântulas de milho em crescimento inicial submetidas à toxicidade de Cu.

REFERÊNCIAS

ADREES, M. *et al.* The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8148-8162, 2015.

AGUIRRE, G.; PILON, M. Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1250, 2016.

ALI, A. S. M. *et al.* Estimation and Bio-Availability of Toxic Metals between Soils and Plants. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 28, n. 1, 2019.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M.A. Phytoremediation of heavy metals- Concepts and application. **Chemosphere**, v. 91, p. 869-881, 2013.

AMEH, T.; SAYES, C. M. The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 71, p. 103220, 2019.

BALDI, E. *et al.* Soil-applied phosphorous is an effective tool to mitigate the toxicity of copper excess on grapevine grown in rhizobox. **Scientia Horticulturae**, v. 227, p. 102-111, 2018.

BASSO, J. B.; KIANG, C. H. Coeficiente de distribuição (kd) de cobre, potássio e cloreto em solos residuais do subgrupo itararé no estado de São Paulo. **Águas Subterrâneas**, v. 31, n. 1, p. 117-133, 2017.

BAUDOUIIN, E. The language of nitric oxide signalling. **Plant Biology**, v. 13, n. 2, p. 233-242, 2011.

BENIMELI, C. S. *et al.* Bioaccumulation of copper by Zea mays: impact on root, shoot and leaf growth. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, n. 1, p. 365-370, 2010.

BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 517-526, 2006.

BUTNARIU, M. General Concepts of Plant Biochemistry. **Biochemistry and Physiology**, v. 7, n. 2, p. 1-4, 2018.

CONAB | **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS** | v. 8 – safra 2020/21, n. 1 – primeiro levantamento | outubro 2020.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro e 2009.

CORNU, J. Y. *et al.* Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. **World**

Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 33, n. 2, p. 26, 2017.

CUNHA, C. S. M. **Metais pesados em solos, plantas e qualidade da água em área de mineração fósforo-uranífera-CE**. 2017. 168 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Ceará.

DE CONTI, L. **Plantas de cobertura do solo e videiras: toxidez, fitorremediação e mecanismos de tolerância ao excesso de cobre**. 2018. 170 f. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.

DE FREITAS, T. A. *et al.* Morphology, ultrastructure and mineral uptake is affected by copper toxicity in young plants of *Inga subnuda* subs. *luschnathiana* (Benth.) TD Penn. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15479-15494, 2015.

DE MARCO, R. *et al.* Amenizante Orgânico e *Eucalyptus grandis* para fitoestabilização de solo contaminado com cobre. **Floresta e Ambiente**, v. 24, 2017.

DEAN, J.V.; HARPER, J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide (s) by the constitutive NAD (P) H-nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiology**, v. 88, n. 2, p. 389-395, 1988.

DESTRO, M. V. P. **Interação estresse salino e aplicação exógena de espermidina nos teores de glicina betaína de guandu**. 2006. 69f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas) -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ELIAS, H. T. **Artigo: os efeitos da pandemia no preço dos alimentos**. 2020. Disponível em: <https://www.epagri.sc.gov.br/index.php/2020/09/08/artigo-os-efeitos-da-pandemia-no-preco-dos-alimentos/>. Acesso em: 15/09/2020.

FAN, H. *et al.* Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism, and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 1, n. 3, p. 308-314, 2007.

FARMNEWS- **Principais países importadores de milho do Brasil em setembro**. Disponível em: <https://www.farmnews.com.br/mercado/principais-paises-importadores-de-milho-do-brasil/>. Acesso em: 20/10/2020.

FRUNGILLO, L. *et al.* S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2014.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 229-236, 2001.

GROß, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 419, 2013.

HUGEN, C. *et al.* Teores de Cu e Zn em perfis de solos de diferentes litologias em Santa

Catarina. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 6, p. 622-628, 2013.

KHALID, S. *et al.* A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247-268, 2017.

KLEPPER, L. Comparison between NO_x evolution mechanisms of wild-type and nr1 mutant soybean leaves. **Plant Physiology**, v. 93, n. 1, p. 26-32, 1990.

KO, K.S., LEE, P.K., KONG, I.C. Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 5, p. 1343-1350, 2012.

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

LAURENT, C. *et al.* Increased soil pH and dissolved organic matter after a decade of organic fertilizer application mitigates copper and zinc availability despite contamination. **Science of the Total Environment**, 709:135927.2020.

MAHAR, A. *et al.* Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 111-121, 2016.

MALIK, S. I. *et al.* GSNOR-mediated de-nitrosylation in the plant defence response. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 540-544, 2011.

MAMEDES. I. M. Influência Da Disposição Inadequada De Resíduos Sólidos Urbanos Sobre O Solo: Estudo De Caso Do Lixão De Várzea Grande-Mt. **Revista Gestão and Sustentabilidade Ambiental**, v. 5, n. 2, p. 327-336, 2017.

MARQUES, D. M. *et al.* Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae). **Water, Air and Soil Pollution**, v. 229, n. 5, p. 1-14, 2018.

MELONI, D. A. *et al.* The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 39-46, 2004.

MIHALJEVIČ, M. *et al.* Tracing the metal dynamics in semi-arid soils near mine tailings using stable Cu and Pb isotopes. **Chemical Geology**, v. 515, p. 61-76, 2019.

MIRANDA, R. A. de. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, v. 74, n. 829, p. 24-27, 2018.

MONTEIRO, C. C. *et al.* Biochemical and histological characterization of tomato mutants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 2, p. 573-585, 2012.

MOREAU, M. *et al.* NO synthesis and signaling in plants—where do we stand?. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 372-383, 2010.

- MUR, L. A. J. *et al.* Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. **AoB plants**, v. 5, 2013.
- NAZIR, F.; HUSSAIN, A.; FARIDUDDIN, Q. Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress. **Chemosphere**, v. 230, p. 544-558, 2019.
- PIRES, R. M. de O. *et al.* Action of nitric oxide in sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) submitted to stress by cadmium. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 1, p. 22-29, 2016.
- ROCKEL, P. *et al.* Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 103-110, 2002.
- SANAKIS, Y. *et al.* NO interacts with the tyrosine radical YD• of photosystem II to form an iminoxyl radical. **Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1411-1417, 1997.
- SANZ, L. *et al.* Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 10, p. 2857-2868, 2015.
- SARWAR, N. *et al.* Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. **Chemosphere**, v. 171, p. 710-721, 2017.
- SCHANSKER, G. *et al.* Chlorophyll a fluorescence: beyond the limits of the QA model. **Photosynthesis Research**, v. 120, n. 1, p. 43-58, 2014.
- SEIDEL, E. *et al.* Fitodisponibilidade de cobre e produção de matéria seca por plantas de milho em resposta à aplicação de dejetos de suínos. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, n. 6, p. 1871-1878, 2009 .
- SHARMA, R. *et al.* Oxidative stress mitigation and initiation of antioxidant and osmoprotectant responses mediated by ascorbic acid in *Brassica juncea* L. subjected to copper (II) stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 182, p. 109436, 2019.
- SHARMA, S. *et al.* Physical, chemical and phytoremediation technique for removal of heavy metals. **Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases**, v. 1, n. 2, p. 1-15, 2016.
- SILVA, A. L. da *et al.* Effect of cyanide by sodium nitroprusside (SNP) application on germination, antioxidative system and lipid peroxidation of *Senna macranthera* seeds under saline stress. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 1, p. 86-96, 2019.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. Artmed, 6ª ed. Porto Alegre-RS, 888 p. 2017.
- TOSSI, V. *et al.* Retracted: Nitric oxide enhances plant ultraviolet protection upregulating gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. **Plant Cell and Environment**, v. 34, n. 6, p. 909-921, 2011
- TRAN, T. A.; POPOVA, L. P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 1-13, 2013.

WANG, P. *et al.* Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. *Journal of Pineal Research*, v. 55, n. 4, p. 424-434, 2013.

WILSON, I.D., NEILL, S.J., HANCOCK, J.T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment*, v. 31, n. 5, p. 622-631, 2008.

XU, Y. *et al.* Toxicity of sulfadiazine and copper and their interaction to wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 250-256, 2017.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in plant science*, v. 4, n. 4, p. 128-129, 1999.

YAMASAKI, H. *et al.* Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide*, v. 5, n. 3, p. 261-270, 2001.

ZAGO, E. *et al.* Nitric oxide-and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology*, v. 141, n. 2, p. 404-411, 2006.

ZHANG, D. *et al.* Genotypic differences and glutathione metabolism response in wheat exposed to copper. *Environmental and Experimental Botany*, v. 157, p. 250-259, 2019.

ZHANG, K. *et al.* Physiological properties and chlorophyll biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) yellow leaf mutant, pylm. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 39, n. 1, p. 1-10, 2017.

2 ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE POR COBRE NA EMERGÊNCIA E CRESCIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO

Artigo publicado na revista Australian Journal of Crop Science na edição de 15(01):82-87 (2021)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do nitroprussiato de sódio-NPS, doador de óxido nítrico-NO, na emergência e no crescimento inicial de plântulas de milho (*Zea mays* L.) submetidas às concentrações de cobre (Cu). O delineamento consistiu em delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 x 3 com 12 tratamentos e 8 repetições, totalizando 96 bandejas contendo 25 sementes por repetição. As sementes foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo NPS (0, 75 e 150 μM) doador de NO, ferrocianeto de sódio-FCS (0, 75 e 150 μM) como compensador e água deionizada (controle) e colocadas em areia contendo concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 e 200 μM). As dosagens de NPS não foram capazes de mitigar a toxicidade do Cu na emergência de plântulas, no coeficiente de velocidade de emergência, aumentando o tempo médio de emergência das plântulas dos tratamentos com concentrações de 100 μM e 200 μM de Cu. As concentrações de Cu promoveram aumento do número de plântulas anormais, influenciando negativamente a biometria e a biomassa. As dosagens de NPS promoveram aumento no comprimento da raiz, na massa seca da parte aérea e na massa seca das raízes das plântulas que não receberam concentrações de Cu. Além disso, aumentou o índice de velocidade de emergência no tratamento com 100 μM de Cu reduzindo o teor de prolina na parte aérea. O cianeto presente no FCS e o óxido nítrico presente no NPS promoveram aumento no teor de prolina nas raízes não amenizando o efeito tóxico do Cu em plântulas de milho da variedade K9606VIP3.

Palavras-chave: sementes; toxidez por metal; micronutriente

ABSTRACT

The objective of the work was to evaluate the effect of sodium nitroprusside-NPS, donor of nitric oxide-NO, on the emergence and initial growth of corn seedlings (*Zea mays* L.) submitted to copper (Cu) concentrations. The design consisted of a completely randomized design in a 4 x 3 factorial with 12 treatments and 8 repetitions, totaling 96 trays containing 25 seeds per repetition. The seeds were soaked for 48 hours in Germitest paper with a solution containing NPS (0, 75 and 150 μM) NO donor, sodium ferrocyanide-FCS (0, 75 and 150 μM) as compensator and deionized water (control) and placed in sand containing concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 and 200 μM). The NPS dosages were not able to mitigate the toxicity of Cu in the emergence of seedlings, in the emergency speed coefficient, increasing the average time of emergence of the seedlings of the treatments with concentrations of 100 μM and 200 μM of Cu. Cu concentrations increased the number of abnormal seedlings, negatively influencing biometrics and biomass. The NPS measurements promoted an increase in the root length, in the dry mass of the aerial part and in the dry mass of the roots of the seedlings that did not receive concentrations of Cu. In addition, it increased the emergency speed index in the treatment with 100 μM of Cu, reducing the proline content in the aerial part. The cyanide present in the FCS and the nitric oxide present in the NPS promoted an increase in the content of proline in the roots, not mitigating the toxic effect of Cu in corn seedlings of the K9606VIP3 variety.

Keywords: seeds; metal toxicity; micronutrient

2.1 Introdução

A exploração de minerais pode causar alterações nos teores naturais de metais pesados no ambiente. A prática da mineração poderá resultar em rejeitos de resíduos, o que representa um significativo risco pela sua possível toxicidade para o solo, água, plantas e organismos vivos (Cunha, 2017).

O milho é um produto fundamental para a agricultura brasileira, cultivado em todas as regiões do país, nas últimas décadas, a cultura passou por transformações profundas, destacando-se sua redução como cultura de subsistência de pequenos produtores e o aumento do seu papel em uma agricultura comercial eficiente (Contini, 2019).

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para plantas participando do metabolismo, sendo cofator de várias enzimas (Gautam e Srivastava, 2016). Em altas concentrações o Cu causa danos aos seres vivos, com efeitos tóxicos ao tecido vegetal e induz a deficiência de outros nutrientes básicos (Taiz et al., 2017). As plantas cultivadas em solos com alto teor de Cu apresentam estresse bioquímico, redução na taxa fotossintética e na respiração, o que resulta no menor comprimento de raiz e parte aérea, área superficial radicular e biomassa (Marques et al., 2018).

A germinação das plantas é afetada pela alta concentração do Cu. Este metal retarda o alongamento do hipocótilo, aumenta a mortalidade da planta e reduz o índice de germinação em mais de 90% dependendo da concentração (Chaâbene et al., 2018).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora envolvida em uma ampla gama de respostas a estímulos ambientais. Por apresentar um elétron desemparelhado, pertence à família das espécies reativas de nitrogênio (RNS) podendo interagir com outras moléculas reativas como as espécies reativas de oxigênio- EROs, eliminando-as diretamente da célula. Além disso, pode interagir e modificar enzimas antioxidantes aumentando a sua atividade (Arora et al., 2016; Salgado et al., 2017).

Segundo Santos (2009) o tratamento com o doador de NO induziu também a atividade de P-ATPase, V-ATPase e PPase comprovando a hipótese da participação desta molécula na modulação de bombas de prótons. O NO é uma molécula mensageira e, assim, na maioria dos casos, a resposta ao estresse é produto da sua interação com fito-hormônios (Fan et al., 2014; Du et al., 2015; Sanz et al., 2015).

A toxicidade por Cu em atributos fisiológicos e bioquímicos das plantas foi relatada nos trabalhos de Apodaca et al. (2017), Marques et al. (2018) e Noreen et al. (2018). Como o crescimento é a expressão final de todos os processos que acontecem na planta a

contaminação por Cu resultou na redução da produção de massa seca da parte aérea e das raízes.

Estudos indicam que a aplicação de NO exógeno, sob a forma de NPS, melhora a tolerância de plantas ao estresse induzido por metais pesados (Wang et al., 2013). Segundo Bai et al. (2015), a adição de 100 μM de SNP aliviou significativamente os efeitos tóxicos induzidos pelo cádmio ou cobre, e principalmente pelo cádmio + cobre, verificando o aumento do crescimento, o aumento no teor de clorofila e na ativação de enzimas antioxidantes em mudas de azevém (*Lolium perenne* L.) submetidas à toxicidade por cádmio e cobre. Souza et al. (2012) trabalhando com dois genótipos de milho observou o efeito protetor da aplicação de SNP sobre o alongamento radicular e na elevação da atividade de algumas enzimas antioxidativas atenuando o efeito inibitório do alumínio (Al).

Esses estudos indicam que o efeito protetor do NPS foi devido à liberação de NO. No entanto, segundo Silva et al. (2018), esses efeitos foram também observados nos tratamentos com NPS e FCS, indicando que os efeitos observados estavam relacionados à liberação do cianeto presente no NPS.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito atenuador do NPS, doador do NO, nas variáveis relacionadas à emergência, biometria, biomassa e teores de prolina nas folhas e raízes de plântulas de milho da variedade K9606 VIP3 submetidas às concentrações de Cu.

2.2 Resultados e discussão

2.2.1. Emergência de plântulas de milho

As dosagens de NPS não afetaram o parâmetro de emergência das plântulas, observando efeito isolado dos tratamentos com concentrações de Cu (Tabela 1). O tratamento com 0 μM de Cu obteve média de emergência de 82,11% em comparação com os tratamentos de 100 μM e 200 μM de Cu que obtiveram 0% em emergência das plântulas. Observando redução de 100% na emergência das plântulas dos tratamentos com 100 μM e 200 μM de Cu quando comparados ao tratamento com 0 μM de Cu (Tabela 2).

O efeito drástico dos metais pesados na emergência de sementes pode estar relacionado com a diminuição da atividade das α e β amilases, comprometendo a respiração, impedindo o crescimento do eixo embrionário e da radícula (Pires et al., 2016). Portanto, a inibição dessas enzimas pode indicar os mecanismos de toxicidade de plantas sensíveis expostas a esses elementos (Kong, 2013). Além disso, a inibição da emergência de sementes

pode estar relacionada às propriedades osmóticas do sulfato de cobre aumentando o estresse osmótico (Ahsan et al., 2007).

2.2.2. Coeficiente de Velocidade de Emergência-CVE e TME-Tempo Médio de Emergência

Não houve efeito do NPS no coeficiente de velocidade de emergência-CVE. O tratamento com 200 μM de Cu obteve média de 34,33% perfazendo uma redução de 20,1% quando comparado com o tratamento com 0 μM de Cu que apresentou média de 42,96%. Observou-se maior tempo médio de emergência no tratamento com a concentração de 200 μM de Cu, apresentando média 2,91 enquanto o tratamento com 0 μM de Cu obteve média de 2,29 apresentando aumento de 27,3% (Tabela 2).

O retardo da germinação pode ocorrer pelo papel de proteção o qual o tegumento pode bloquear e reter os elementos-traço em sua superfície, quando o elemento-traço é absorvido, ele é depositado no endosperma podendo ser translocado para o embrião (Sun e Luo, 2014). Segundo Chaâbene et al. (2018) a alteração na germinação pode ser explicada por modificação na absorção de água, onde os íons cúpricos têm um efeito tóxico ao criar um potencial osmótico externo impedindo a embebição de água de maneira semelhante aos íons Na^+ e Cl^- .

2.2.3. Plântulas anormais

As dosagens de NPS não amenizaram o efeito da toxicidade de Cu em relação ao percentual de plântulas anormais. Verificou-se efeito isolado das concentrações de Cu nos tratamentos de 100 μM e 200 μM apresentando médias de 99.32 e 99.75 quando comparado ao tratamento com 0 μM de Cu que obteve média de 16.01. Perfazendo aumento de 520,4% e 523% respectivamente aos tratamentos com concentrações de 100 μM e 200 μM de Cu (Tabela 2).

O efeito fitotóxico do Cu eleva um distúrbio no desenvolvimento e diferenciação celular, geram mudas anormais e reduz a porcentagem de mudas normais na germinação (Pires et al., 2016), compreendendo desde a degeneração das membranas, diminuição na taxa de crescimento e desenvolvimento, menor uniformidade, redução da emergência em campo, formação de plântulas anormais, perda do poder germinativo até a morte da semente (Marcos Filho, 2015).

2.2.4. Comprimento da parte aérea-CPA e Comprimento total-CT

Não houve efeito das dosagens de NPS no CPA verificando apenas o efeito isolado das concentrações de Cu. A concentração de 200 μM de Cu apresentou média 2,53 cm perfazendo redução de 55,8% quando comparado ao tratamento com 0 μM de Cu que obteve média de 5,72 cm (Tabela 2).

Não foi observado efeito das dosagens de NPS no CT. O tratamento com a concentração de 200 μM de Cu apresentou média de 4,58 cm perfazendo uma redução de 83,7% quando comparado ao tratamento com 0 μM de Cu que apresentou média de 28,07 cm (Tabela 2).

Em excesso, o Cu pode promover distúrbios fisiológicos, bioquímicos e morfoanatômicos nas plantas, provocando inibição do seu desenvolvimento (Gautam e Srivastava, 2016). Além de reduzir a divisão celular, o excesso de Cu inibe a atividade das enzimas α -amilase e invertase, afetando a mobilização das reservas de nutrientes e a absorção de água nos tecidos (Sethy e Ghosh, 2013).

2.2.5. Comprimento da raiz-CR

Em relação a variável CR observou-se a maior média de 23,80 cm no tratamento com 150 μM de NPS (FCS 0 μM) com 0 μM de Cu, apresentando aumento de 4,6% quando comparado ao tratamento controle. A menor média de 1,9 cm foi observada no tratamento com a concentração de 200 μM de Cu (água deionizada). Apresentando redução de 91,7% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 22,77 cm (Tabela 3). Observando efeito dos tratamentos nas plântulas que não receberam concentração de Cu, verificando que a aplicação de NPS não amenizou os efeitos nocivos do Cu.

O bloqueio da ativação de enzimas e redução ou bloqueamento direto de divisão celular e a interferência na ocorrência da mitose podem explicar a redução no crescimento radicular. A repressão da síntese proteica, replicação do DNA também pode bloquear a divisão celular (Moosavi, et al., 2012). O excesso de Cu afeta o sistema radicular, bem como o crescimento da parte aérea, induzindo distúrbios na estrutura das proteínas e inibição do alongamento celular causada pelo aumento na permeabilidade da membrana plasmática e lignificação da parede celular (Yruela, 2009).

A atuação do NO promovendo o crescimento radicular no tratamento com 0 μM de Cu pode estar envolvido na via de sinalização de auxina, aumentando os níveis de cálcio e ativando proteínas kinases envolvidas no desenvolvimento de raízes adventícias e raízes

laterais (Lanteri et al., 2006). Segundo Ya'Acov e Haramaty (1996), o NO atua sobre a bicamada fosfolipídica da membrana aumentando a sua fluidez e também, pode atuar relaxando a parede celular, contribuindo para o crescimento.

Em relação aos tratamentos com FCS podemos inferir que possivelmente o cianeto induziu à produção de NO durante a germinação das sementes e esse, por sua vez, tem como alvo proteínas que favorecem o alongamento e crescimento celular (Sarath et al., 2006).

2.2.6. Índice de Velocidade de Emergência – IVE

No tratamento com 0 μ M de Cu observou-se o efeito das dosagens de NPS verificando ainda, o efeito amenizador na concentração 100 μ M de Cu. A maior média de 12,27 foi obtida no tratamento com dosagem de 150 μ M de NPS (FCS 0 μ M) com 100 μ M de Cu atingindo um aumento 21,6% em relação ao tratamento controle. Não houve diferença dos tratamentos na concentração de 200 μ M de Cu (Tabela 3).

O atraso do IVE quando da exposição ao Cu, pode ser resultado da inibição da síntese proteica resultando na diminuição da disponibilidade de aminoácidos presentes no tegumento (Karmous et. al., 2012). Há indícios de que o NO atue em nível de membrana, superando determinados tipos de dormência, além de acelerar a emergência e recuperar a qualidade das sementes (Pereira et al., 2010). Segundo Gniazdowska et al. (2010) indicam que o NO e o cianeto estimulam uma maior concentração de etileno favorecendo a germinação.

Observou-se efeito significativo dos tratamentos com FCS, alguns autores contestam que o efeito causado por doadores de óxido nítrico seja propriamente do NO, como relatado em sementes de *Arabidopsis*, onde foi utilizado o NPS para superar a dormência, segundo esses autores, o efeito seria do cianeto presente no NPS (Bethke et al., 2006).

2.2.7. Massa seca da raiz – MSR e Massa seca da parte aérea - MSPA

O tratamento com a dosagem de 150 μ M de NPS (FCS 0 μ M) com 0 μ M de Cu apresentou média de 83,35 mg aumentando 21,1% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 68,85 mg. A concentração de 200 μ M de Cu proporcionou redução na MSR (Tabela 3). O tratamento com a dosagem de 150 μ M de NPS (FCS 0 μ M) com 0 μ M de Cu apresentou média de 20,10 mg verificando assim um aumento de 17,9% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 17,05 mg na MSPA (Tabela 3). Não amenizando os efeitos tóxicos das concentrações de Cu.

O efeito fitotóxico dos metais pesados depende do estado de desenvolvimento das plantas, e pode ser caracterizado pela diminuição da fitomassa total das plantas, de comprimentos de parte aérea e raiz (Pinto, 2017). O comprimento da raiz é um parâmetro amplamente utilizado em bioensaios de fitotoxicidade (Simões et al., 2013). Segundo o autor, a redução no comprimento médio das raízes pode estar relacionada com a diminuição do percentual de células em divisão na região meristemática. Influenciando em uma diminuição da massa seca da raiz.

O NO está relacionado ao transporte de auxina de maneira que níveis elevados desse radical prejudicam o crescimento primário da raiz (Fernández-Marcos et al., 2011), porém em níveis adequados desempenha papel relevante no desenvolvimento do meristema apical. Atualmente, a maioria dos estudos sobre a interação entre ácido indol acético-AIA e NO estão concentrados nas respostas das raízes, havendo poucas informações sobre a parte aérea (Simontacchi et al., 2013). Segundo Fahad et al. (2015), o NO pode modular os níveis de AIA, controlando sua degradação.

2.2.8. Teor de prolina

Em relação ao teor de prolina nas raízes verificou-se que o tratamento com concentração de 200 μM de Cu apresentou média de 5,16 $\mu\text{M Pro g}^{-1}$ MS perfazendo aumento de 214,68% em relação ao tratamento com 0 μM de Cu que apresentou média de 1,64 $\mu\text{M Pro g}^{-1}$ MS (Tabela 2).

Nas partes aéreas observou-se que os tratamentos com dosagens de 75 μM de NPS (FCS 75 μM) e 150 μM de NPS (FCS 0 μM) apresentaram médias de 2,92 e 2,95 $\mu\text{M Pro g}^{-1}$ MS com redução de 17,05% e 16,07% respectivamente, quando comparados ao tratamento controle que apresentou média de 3,51 $\mu\text{M Pro g}^{-1}$ MS. Nas raízes verificou-se aumento nos teores de prolina nos tratamentos com as dosagens de 0 μM de NPS (FCS 150 μM) e 75 μM de NPS (FCS 75 μM) apresentando médias de 4,87 e 3,84 $\mu\text{M Pro g}^{-1}$ MS perfazendo um aumento de 61,73% e 27,70% respectivamente, quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 3,01 $\mu\text{M Pro g}^{-1}$ MS (Tabela 4).

A prolina pode desempenhar diferentes funções em resposta ao estresse abiótico nas plantas, dentre elas a de osmoprotetora destacando-se no papel de proteção das membranas contra os efeitos deletérios, causados por excesso de metais pesados (Gautam e Srivastava, 2016).

Provavelmente o cianeto presente no FCS induziu à produção de NO (Sarath et al., 2006), aumentando a atividade da enzima pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) envolvida na biossíntese de prolina (Fan et al., 2012). O NO em plantas tem ação antioxidante regulando o nível e a toxidez das espécies reativas de oxigênio-ERO's que são gerados por diversos tipos de estresses (Sang et al., 2008). Aparentemente, o NO eleva os níveis de ascorbato e ativa enzimas do sistema antioxidativo das células (Zhang et al., 2008). O efeito protetor da aplicação exógena de NPS tem sido atribuído, também, à eliminação de radicais superóxidos ($\bullet\text{O}_2^-$) e/ou à elevação da atividade de enzimas antioxidativas (Wang et al., 2010).

Tabela 1 – Resumo da análise de variância do comprimento da raiz (CR), comprimento total (CT), comprimento da parte aérea (CPA), tempo médio (TM), índice de velocidade de emergência (IVE), germinação (G), plântulas anormais (PA), coeficiente velocidade de emergência (CVE), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), prolina parte aérea e prolina raiz.

Causas de variação	GL	CR	CT	CPA	TM	IVE	G	PA	CVE	MSPA	MSR	Prolina na parte aérea	Prolina na raiz
		(cm)		dia			(mg plântula ⁻¹)					μM Pro g ⁻¹ MS	
Nitroprussiato	3	0.10 [*]	0.02 ^{ns}	0.44 ^{ns}	2.89 ^{ns}	10.04 [*]	68.88 ^{ns}	92.21 ^{ns}	3.44 [*]	7.32 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.28 [*]	4.75 [*]
Cobre	2	80.22 [*]	39.57 [*]	493.56 [*]	135.61 [*]	50.84 [*]	71914.13 [*]	74418.53 [*]	72.01 [*]	177.07 [*]	9.08 [*]	0.02 ^{ns}	31.44 [*]
Nitroprussiato x Cobre	6	0.09 [*]	0.01 ^{ns}	0.86 ^{ns}	3.70 ^{ns}	3.74 [*]	68.88 ^{ns}	73.86 ^{ns}	1.53 ^{ns}	25.64 [*]	0.66 [*]	0.19 ^{ns}	0.65 ^{ns}
Resíduo	84	0.01	0.12	1	1.82	1.03	37.04	37.93	1.01	8.74	3.07	0.10	0.33
Média	-	9.03	13.20	3.94	2.57	10.07	27.37	71.69	39.11	16.77	43.61	3.22	3.65
CV (%)	-	4.8	3.5	4.7	23.9	4.5	22.2	8.6	2.3	17.3	1.4	26.6	37.5

CV: Coeficiente de variação;

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

^{ns} não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 2 – Comprimento total (CT), comprimento da parte aérea (CPA), prolina na raiz, emergência, coeficiente de velocidade de emergência (CVE), plântulas anormais, tempo médio de emergência (TME) de plântulas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, ferrocianeto de sódio (FCS), compensador e expostas à toxicidade por cobre.

Cobre	CT	CPA	Prolina na raiz	Emergência	CVE	Plântulas anormais	TME
(μM)	----- (cm)	-----	($\mu\text{M Pro g}^{-1} \text{MS}$)	----- (%)-----	-----	-----	(dia)
0	28.07 \pm 2.00 a	5.72 \pm 0.78 a	1.64 \pm 0.18 c	82.11 \pm 10.97 a	42.96 \pm 4.22 a	16.01 \pm 11.08 b	2.29 \pm 0.28 c
100	6.29 \pm 0.52 b	3.52 \pm 0.45 b	4.33 \pm 0.32 b	0.00 \pm 0.00 b	40.32 \pm 5.15 a	99.32 \pm 1.48 a	2.51 \pm 0.28 b
200	4.58 \pm 0.31 c	2.53 \pm 0.16 c	5.16 \pm 0.23 a	0.00 \pm 0.00 b	34.33 \pm 1.97 b	99.75 \pm 0.98 a	2.91 \pm 0.16 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de oito repetições e DP.

Tabela 3 – Comprimento da raiz (CR), índice de velocidade de emergência (IVE), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de plântulas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, ferrocianeto de sódio (FCS), compensador, expostas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Cobre	CR	IVE	MSPA	MSR
	(μM)	(cm)		-----(mg plântula^{-1})-----	-----
Água	0	22.77 \pm 1.19 Aba	10.10 \pm 0.61 Ba	17.05 \pm 2.61 Aab	68.85 \pm 26.07 Aa
	100	3.45 \pm 0.47 Ab	10.42 \pm 0.75 ABa	19.30 \pm 2.64 Aa	27.00 \pm 3.51 Ab
	200	1.90 \pm 0.16 Ac	9.10 \pm 0.95 Aa	14.25 \pm 2.64 Ab	33.10 \pm 11.85 Ab
NPS (0 μM) + FCS (150 μM)	0	21.66 \pm 0.98 BCa	11.08 \pm 0.77 ABa	18.10 \pm 1.72 Aa	65.50 \pm 21.65 Aa
	100	2.72 \pm 0.21 Bb	10.04 \pm 0.89 ABab	17.00 \pm 3.40 ABab	30.30 \pm 7.23 Ab
	200	1.98 \pm 0.15 Ac	8.21 \pm 0.61 Ab	14.10 \pm 2.40 Ab	30.05 \pm 4.03 ABb
NPS (75 μM) + FCS (75 μM)	0	20.75 \pm 1.24 Ca	11.68 \pm 2.31 ABa	19.40 \pm 1.86 Aa	68.95 \pm 21.93 Aa
	100	2.41 \pm 0.19 Cb	9.37 \pm 0.38 Ba	17.60 \pm 2.69 ABab	34.45 \pm 4.67 Ab
	200	2.08 \pm 0.15 Ac	8.40 \pm 0.21 Ab	15.30 \pm 2.10 Ab	27.00 \pm 3.81 ABc
NPS (150 μM) + FCS (0 μM)	0	23.80 \pm 1.84 Aa	11.63 \pm 0.32 Aa	20.10 \pm 2.93 Aa	83.35 \pm 32.98 Aa
	100	2.80 \pm 0.27 Bb	12.27 \pm 2.56 Aa	14.65 \pm 3.82 Bb	30.30 \pm 4.19 Ab
	200	2.04 \pm 0.09 Ac	9.03 \pm 0.85 Ab	14.40 \pm 2.07 Ab	24.45 \pm 4.29 Bc

Colunas com letras maiúsculas diferentes entre tratamentos (água, NPS (0 μM) + FCS (150 μM), NPS (75 μM) + FCS (75 μM), NPS (150 μM) + FCS (0 μM) sob mesma concentração de cobre) e letras minúsculas entre as concentrações de cobre (0, 100 e 200 μM sob mesmo tratamento) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem à médias de cinco repetições e DP

Tabela 4 – Prolina nas partes aéreas e prolina nas raízes de plântulas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio (NPS), doador de óxido nítrico, ferrocianeto de sódio (FCS), compensador e expostas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Prolina na parte aérea	Prolina na raiz
	----- ($\mu\text{M Pro g}^{-1} \text{MS}$)-----	
Água	3.51 \pm 0.19 a	3.01 \pm 0.49 b
NPS (0 μM) + FCS (150 μM)	3.48 \pm 0.19 a	4.87 \pm 0.64 a
NPS (75 μM) + FCS (75 μM)	2.92 \pm 0.15 b	3.84 \pm 0.44 a
NPS (150 μM) + FCS (0 μM)	2.95 \pm 0.18 b	2.85 \pm 0.38 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem à médias de oito repetições e DP.

2.3 Material e Métodos

2.3.1. Condução do experimento

O experimento foi conduzido no laboratório de sementes do grupo de Estudos de Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS) do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), sendo utilizadas sementes de milho híbrido (K9606 VIP3) da empresa KWS SAAT SE & Co. KGaA sementes.

2.3.2. Tratamento de sementes e delineamento experimental

As sementes foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]2\text{H}_2\text{O}$ (0, 75 e 150 μM), como doador do óxido nítrico, ferrocianeto de sódio $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0, 75 e 150 μM), como compensador e água deionizada (controle). As sementes foram colocadas em bandejas com areia lavada, autoclavada e seca em estufa de 70 °C contendo concentrações de cobre $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 e 200 μM) e água deionizada (controle) a 60% da capacidade de campo, com fotoperíodo de oito horas (8 horas de luz e 16 horas de escuro) e temperatura de 25 ± 2 °C (RAS).

O delineamento consistiu em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3. Os 4 tratamentos consistiam em (água, NPS (0 μM) + FCS (150 μM), NPS (75 μM) + FCS (75 μM), NPS (150 μM) + FCS (0 μM) com as 3 concentrações de Cu (0, 100 e 200 μM) perfazendo 12 tratamentos com 8 repetições, totalizando 96 bandejas contendo 25

sementes por repetição. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade no programa SISVAR.

2.3.3. Análises de emergência, biometria, biomassa e teor de prolina

As contagens das plântulas emergidas foram realizadas diariamente do 4º até o 7º dia após o início do teste, cujo critério de emergência adotado foi aquele proposto por Brasil (2009), com formação de plântulas com estruturas essenciais normais (raiz primária, coleóptilo e plúmula), sendo a emergência expressa em porcentagem (%). Segundo Silva e Nakagawa (1995), com a emergência expressa em porcentagem (%), a fórmula proposta por Edmond e Drapala (1958) foi utilizada para calcular o tempo médio de emergência (TM) e o coeficiente de velocidade de emergência a fórmula utilizada proposta por Kotowski (1926), o índice de velocidade de emergência foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962).

Ao final dos testes germinativos, foram medidos o comprimento da parte aérea (CPA) e o sistema radicular (RSC). Para tanto, foram utilizadas oito repetições de 15 plântulas em cada tratamento, cujas medidas foram realizadas no sétimo dia após a semeadura, com auxílio de uma regra milimétrica, sendo os resultados expressos em cm.plântula^{-1} (Nakagawa, 1999).

A determinação da massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR), foi realizada pelo método de estufa de ar forçado a 70^o C até atingir peso constante (Nakagawa, 1999). As concentrações de prolina foram determinadas usando o método descrito por Bates et al. (1973).

2.4 Conclusão

As dosagens de nitroprussiato de sódio, doador do óxido nítrico, não foram capazes de mitigar a toxicidade de Cu na emergência, no coeficiente de velocidade de emergência, tempo médio de emergência, comprimento total, comprimento da parte aérea, prolina na raíz e no percentual de plântulas anormais.

As dosagens de nitroprussiato de sódio promoveram aumento no comprimento da raiz, na massa seca da parte aérea e na massa seca das raízes das plântulas que não receberam concentrações de cobre, promovendo aumento no índice de velocidade de emergência no tratamento com 100 µM de Cu reduzindo teor de prolina na parte aérea.

O cianeto presente no ferrocianeto de sódio e o óxido nítrico presente no nitroprussiato de sódio promoveram aumento no teor de prolina nas raízes não amenizando o efeito tóxico do Cu em plântulas de milho da variedade K9606VIP3.

Agradecimentos

Agradecemos a Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos, a UFRA - Universidade Federal Rural da Amazônia e ao grupo de Estudos de Biodiversidade em Plantas Superiores- EBPS.

REFERÊNCIAS

- Ahsan N, Lee SH, Lee DG, Lee H, Lee SW, Bahk JD, Lee BH (2007) Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity. *C R Biol.* 330: 735-746.
- Apodaca SA, Tan W, Dominguez O, Hernandez-Viezcas J, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey, JL (2017) Physiological and biochemical effects of nanoparticulate copper, bulk copper, copper chloride, and kinetin in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Sci Total Environ.* 599-600: 2085-2094.
- Arora D, Jain P, Singh N, Kaur H, Bhatla SC (2016) Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Res.* 50: 291-303.
- Bai, X.Y., Dong, Y.J., Xu, L.L. (2015). Effects of exogenous nitric oxide on physiological characteristics of perennial ryegrass under cadmium and copper stress. *Russ J Plant Physiol* 62, 237–245.
- Bates LS, Waldren RPE, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short communication. *Plant Soil.* 39: 205-207.
- Bethke PC, Libourel IGL, Jones RL (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 57: 517-526.
- Brasil (2009) Ministério do Meio Ambiente. Resolução no 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Brasília, DF, 249. 81-84.
- Chaâbene Z, Hakim IR, Rorat A, Elleuch A, Mejdoub H, Vandembulcke F (2018) Copper toxicity on date palm (*Phoenix dactylifera*) seedlings tolerance: monitoring of related biomarkers. *Environ Toxicol Chem.* 37: 797–8006.
- Contini E, Mota MM, Marra R, Borghi E, Miranda RA, Silva AF, Silva DD, Machado JRA, Cota LV, Costa RV, Mendes SM (2019) Milho: caracterização e desafios tecnológicos. Brasília: Embrapa - Desafios do Agronegócio Brasileiro NT2.
- Cunha CSM (2017) Metais pesados em solos, plantas e qualidade da água em área de mineração fósforo-uranífera-CE. 2017. 168 f. Tese. Universidade Federal do Ceará.
- Du ST, Liu Y, Zhang P, Liu HJ, Zhang XQ, Zhang RR (2015) Atmospheric application of trace amounts of nitric oxide enhances tolerance to salt stress and improves nutritional

- quality in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chem.* 173: 905-911.
- Edmond JB, Drapala WJ (1958) The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. *J Am Soc Hortic Sci.* 71: 428-434.
- Fahad S, Hussain S, Matloob A, Khan FA, Khaliq A, Saud S, Faiq M (2015) Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. *Plant Growth Regul.* 75: 391-404.
- Fan H, Du C, Xu Y, Wu X (2014) Exogenous nitric oxide improves chilling tolerance of chinese cabbage seedlings by affecting antioxidant enzymes in leaves. *Hortic Environ Biotechnol.* 55: 159-165.
- Fan HF, Du CX, Guo SR (2012) Effect of nitric oxide on proline metabolism in cucumber seedlings under salinity stress. *J Am Soc Hortic Sci.* 137: 127-133.
- Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PINFORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 18506–18511.
- Gautam S, Srivastava N (2016) In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in *Carthamus tinctorius* L. (variety PBNS-12). *Physiol Mol Biol Pla.* 1-9.
- Gniazdowska A, Krasuska U, Bogatek R (2010) Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta*, 232(6), 1397-1407.
- Karmous I, Khadija J, Chaoui A, Ferjano EE (2012) Proteolytic activities in *Phaseolus vulgaris* cotyledons under copper stress. *Physiol Mol Biol Pla.* 18: 337-343.
- Kong IC (2013) Joint effects of heavy metal binary mixtures on seed germination, root and shoot growth, bacterial bioluminescence, and gene mutation. *J Environ Sci.* 25: 889-894.
- Kotowski F (1926) Temperature relations to germination of vegetable seeds. *Proc Amer Hort Sci.* 76: 23-1.
- Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J Exper Bot.* 57: 1341-1351.
- Maguire JD (1962) Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176-177.
- Marcos Filho J (2015) *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Londrina. ABRATES, 659 p.
- Marques DM, Silva AB, Mantovani JR, Pereira DS, Souza TC (2018) Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum*

dubium (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. *Rev Árv.* 42: 67-62.

- Moosavi SA, Gharineh MH, Afshari RT, Ebrahimi A (2012) Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination Characteristics of Canola (*Barassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus tinctorious*) to Evaluate Phytoremediation Potential of These Crops. *J Agr Sci.* 4: 11-19.
- Nakagawa J (1999) Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: Krzyzanowski FC, Vieira RD, França-Neto JB (ed.) *Vigor de sementes: conceitos e testes*, Londrina: ABRATES, p. 2:1- 2:21.
- Noreen S, Akhter MS, Yaamin T, Arfan M (2018) The ameliorative effects of exogenously applied proline on physiological and biochemical parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.) crop under copper stress condition. *J Plant Interact.* 13: 221-230.
- Pereira, B. L. C.; Borges, E. E. L.; Oliveira, A. C.; Leite, H. G.; Gonçalves, J. F. C. (2010) Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. *Scientia Forestalis*, v. 38, p.629-636.
- Pinto FR (2017) Caracterização da acumulação e da tolerância ao stress induzido por Cd em plantas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.). 2017. 257 f. Tese. Universidade de Lisboa.
- Pires RMO, Souza GA, Cardoso AA, Dias DCFS, Borges EEL (2016) Action of nitric oxide in sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) submitted to stress by cadmium. *J. Seed Sci.* 38: 22-29.
- Salgado I, Oliveira HC, Gaspar M (2017) Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. *Mechanism of Plant Hormone Signaling Under Stress: A Functional Genomic Frontier*.
- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M (2008) Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *J Integr Plant Biol.* 50:231-243.
- Santos MP (2009) O óxido nítrico modula os sistemas primários de transporte de prótons e as enzimas antioxidantes durante o estresse salino em plantas mutantes e não mutantes em ácido abscísico. 2009. 138p. Tese. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Sanz L, Albertos P, Mateos I, Sánchez-Vicent I, Lechón T, Fernández-Marcos, M, Lorenzo O (2015) Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *J Exp Bot.* 66: 2857-2868.
- Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB (2006) Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta.* 223: 1154–1164.
- Sethy SK, Ghosh S (2013) Effect of heavy metals on germination of seeds. *J Nat Sci Biol Med.* 4: 272-275.

- Silva AL, Pinheiro DT, Borges EEL, Silva LJ, DIAS DCFS (2018) Tolerância à salinidade em sementes de *Senna macranthera* (DC. Ex Collad.) HS Irwin & Barneby com nitroprussiato de sódio (SNP) promovido pelo cianeto. *J Seed Sci.* 40: 323-330.
- Silva JBC, Nakagawa J (1995) Estudo de fórmulas para cálculo da velocidade de germinação. *Informativo ABRATES.* 5: 62-69.
- Simões MS, Madail RH, Barbosa S, Nogueira ML (2013) Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando Alface. *Biotemas.* 26: 29-36.
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Rep.* 32: 853-866.
- Souza, LT (2012) Papel do óxido nítrico na tolerância ao alumínio em dois genótipos de milho. 2012. 82f. Tese. Universidade Federal de Viçosa.
- Sun JL, Luo LQ (2014) A study on distribution and chemical speciation of lead in corn seed germination by synchrotron radiati on X- ray fluorescence and absorption near edge structure spectrometry. *Chinese J Anal Chem.* 42: 1447-1452.
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A (2016) *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal.* Artmed, 6ª ed. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2017.
- Wang HH, Huang JJ, BI YR (2010) Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Sci.* 179: 281–288.
- Wang P, Sun X, Chang C, Feng F, Liang D, Cheg L, Ma F (2013) Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. *J Pineal Res.* 55: 424–434.
- Ya'acov YL, Haramaty E (1996) The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J Plant Physiol.* 148: 258-263.
- Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol.* 36: 409-430.
- Zhang H, LIA YH, HUA LY, Wangb SH, Zhang F.Q, HU KD (2008) Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress. *Russ J Plant Physl.* 55: 469-474.

3 ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DE ALTERAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE MILHO SUBMETIDAS À TOXICIDADE POR COBRE.

Artigo publicado na revista Journal of Agricultural Studies Vol. 8, N^o. 4 (2020)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito atenuador do doador de óxido nítrico (nitroprussiato de sódio-NPS) nas respostas ecofisiológicas de plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas à toxicidade por cobre (Cu). As sementes de milho da variedade K9606 VIP3 foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo tratamento com nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2 [\text{Fe} (\text{CN})_5 \text{NO}] 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 200 e 300 μM), ferrocianeto de sódio-(FCS) $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (300, 100 e 0 μM) respectivamente e água deionizada (controle), semeadas em baldes com 15 kg de solo incubados por 50 dias contendo concentrações de cobre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 60 e 200 mg kg^{-1}). Não houve efeito dos tratamentos na altura, área foliar e número de folhas, observado aumento no diâmetro do colmo das plantas que receberam as concentrações de Cu. Não houve efeito dos tratamentos no teor de clorofila medido pelo índice SPAD e nas trocas gasosas. As concentrações de 60 e 200 mg kg^{-1} de Cu não afetaram negativamente as variáveis da fluorescência da clorofila *a* atuando como um micronutriente dentro dos limites favoráveis. As variáveis da fluorescência da clorofila *a* demonstraram o efeito do NO presente no NPS e do cianeto presente no FCS no aumento da dissipação causada pelo processo fotoquímico onde a energia é utilizada na redução do NADP.

Palavras chave: fitotoxidez. variáveis ecofisiológicas. contaminação.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the attenuating effect of the nitric oxide donor (sodium nitroprusside-NPS) on the ecophysiological responses of corn (*Zea mays* L.) plants submitted to copper (Cu) toxicity. Corn seeds of the K9606 VIP3 variety were soaked for 48 hours in Germitest paper with a solution containing treatment with sodium nitroprusside $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0, 200 and 300 μM), sodium ferrocyanide- (FCS) $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (300, 100 and 0 μM) respectively and deionized water (control), sown in buckets with 15 kg of soil incubated for 50 days containing copper concentrations $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 60 and 200 mg kg^{-1}). There was no effect of treatments on height, leaf area and number of leaves, with an increase in stem diameter of plants that received Cu concentrations. There was no effect of treatments on the chlorophyll content measured by the SPAD index and gas exchange. The concentrations of 60 and 200 mg kg^{-1} of Cu did not negatively affect the fluorescence variables of chlorophyll a, acting as a micronutrient within favorable limits. The fluorescence variables of chlorophyll a demonstrated the effect of NO present in NPS and cyanide present in FCS in increasing dissipation caused by the photochemical process where energy is used to reduce NADP.

Keywords: phytotoxicity. ecophysiological variables. contamination.

3.1 Introdução

O milho é um produto fundamental para a agricultura brasileira, cultivado em todas as regiões do país, sendo a segunda cultura com maior produção de grãos no território nacional com grande participação nas exportações (USDA, 2019), sendo o cereal mais produzido e consumido no mundo (Contini et al., 2019), com produtividade média nacional de 5.719 kg ha^{-1} e 5.682 kg ha^{-1} na safrinha (CONAB, 2020).

O aumento da produção agrícola elevou a necessidade de adição de insumos, aumentando os teores de metais pesados nos solos (Sarwar et al., 2017), podendo causar a diminuição da fitomassa total das plantas, de comprimentos de parte aérea e raiz e diminuição da concentração de clorofilas (Pinto, 2017).

O cobre (Cu) é classificado como um metal pesado, entretanto é considerado como elemento essencial aos vegetais (Yruela, 2009), que podem se tornar tóxicos em elevadas concentrações (Rodrigues et al., 2016), gerando danos ao aparato fotossintético (González-mendoza et al., 2013) e alterações na fotossíntese podendo representar o estado fisiológico da planta (Kalaji et al., 2016), podendo causar ainda, distúrbios na estrutura das proteínas e inibição do alongamento celular (Yruela, 2013).

Os estresses abióticos são os principais problemas ambientais que influenciam negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (Dresselhaus & Hüchelhoven, 2018), podendo interferir na eficiência da fotossíntese e inativar o PS II-fotossistema II (P680) e a cadeia de transporte de elétrons para produção de ATP e NADPH₂ (Costa et al., 2003). A análise da fluorescência tem vantagens para estudos do transporte de elétrons durante a fotossíntese e é possível registrar o transporte de elétrons no fotossistema II (Franco, 2015).

A aplicação de óxido nítrico-NO exógeno pode mitigar a diminuição da capacidade fotossintética em plantas, causada por uma variedade de estresses abióticos (Wang et al. 2014). Ele é capaz de se difundir através das membranas (Lamattina & García Mata, 2016), é uma molécula que atua como sinalizadora envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta, na defesa contra patógeno e nas respostas ao estresse abiótico (Sanz et al., 2015).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito atenuador do NO na biometria, teor de clorofilas, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em plantas de milho da variedade K9606 VIP3 submetidas às concentrações de Cu.

3.2 Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Instituto de Ciências Agrárias-ICA pertencente a UFRA (Universidade Federal Rural da Amazônia) – Belém, com coordenadas geográficas de 01° 27' 21" S, 48° 30' 16" W e altitude média de 10 m. De acordo com Koppen, o clima regional é classificado como Af (equatorial) (Lopes et al., 2018). Durante o período experimental, a temperatura média e a umidade relativa do ar foram de $31.0 \pm 2.9^\circ \text{C}$ e $78.0 \pm 13.3\%$ (média \pm desvio-padrão), respectivamente. O experimento foi realizado do período de outubro de 2019 a janeiro 2020.

As características químicas do solo coletado, na camada de 0-20 cm foram: pH (CaCl₂):

9 mmolc dm⁻³; Potássio: 0,8 mmolc dm⁻³; Sódio: 0,3 mmolc dm⁻³; Fósforo: 20 mg dm⁻³; Carbono Orgânico Total: 11 g dm⁻³; Enxofre: 11 mg dm⁻³; Manganês: 22,5 mg dm⁻³; Ferro: 20 mg dm⁻³; Cobre: 0,4 mg dm⁻³; Zinco: 5,3 mg dm⁻³; Boro: 0,54 mg dm⁻³. Capac. de troca de cátions: 78,1 mmolc dm⁻³; Soma de bases: 45,1 mmolc dm⁻³; Saturação por Al: 2,17 % e Acidez trocável: 1 mmolc dm⁻³. As características físicas do solo: Argila: 98 g kg⁻¹; Silte: 120 g kg⁻¹; Areia Total: 782 g kg⁻¹; Textura tipo: Média. O solo foi retirado na UFRA/Campus Belém, peneirado e colocado em baldes de 15 kg de solo contendo as concentrações de CuSO₄.5H₂O (0, 60 e 200 mg kg⁻¹), deixando-se incubar por um período 50 dias envolvidos em sacos plásticos e irrigados diariamente mantendo-se a 60% de capacidade de campo.

As sementes de milho da variedade K9606VIP3 da empresa KWS SAAT SE & Co. KGaA sementes foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo os tratamentos com nitroprussiato de sódio Na₂[Fe(CN)₅NO]2H₂O (0, 200 e 300 µM) e o compensador ferrocianeto de sódio Na₄Fe(CN)₆ (300, 100 e 0 µM) respectivamente, água deionizada (controle). As sementes foram semeadas em baldes de 15 kg contendo solo incubado por 50 dias com CuSO₄.5H₂O nas concentrações 0, 60 e 200 mg kg⁻¹.

3.2.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As medidas de trocas gasosas taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), transpiração (E) e os parâmetros da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas com o analisador de gases portátil por infravermelho (IRGA, LI-COR 6400-XT, Lincon, USA) com câmara de fluorescência (6400-40) com área de 2 cm².

Foram realizadas no 55° e 56° DAS nos blocos 1 e 2 e 3 e 4, respectivamente. Sendo medidas sob condições ambientais favoráveis, entre as 9:00 h e 11:00 h da manhã, PARi

1000.41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Foram inseridas na câmara do equipamento uma folha por planta sempre na região mediana da folha (6ª folha totalmente expandida), a mesma utilizada para análise do teor de clorofila através do índice SPAD. Quantificou-se ainda a relação do carbono intracelular e do ambiente (C_i/C_a), concentração interna de CO_2 (C_i), eficiência do uso da água (EUA) e temperatura foliar (T_{leaf}).

Após a leitura de trocas gasosas colocou-se nas mesmas folhas papel alumínio para mantê-las no escuro por no mínimo 30 minutos para realização da leitura dos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*: fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável (F_v), eficiência quântica potencial do PSII (F_v/F_m), fluorescência no estado estável (F_s), fluorescência máxima adaptada ao claro (F_m'), eficiência quântica efetiva (Φ_{PSII}), dissipação não fotoquímica (NPQ), eficiência quântica basal do PS II (F_0/F_m'), fluorescência mínima da folha adaptada ao claro (F_0'), dissipação fotoquímica (qP), Parâmetro de Genty (F_v'/F_m'), taxa de transporte de elétrons (ETR), coeficiente de fotoinibição (qL).

3.2.2 Medições biométricas

No estádio VT (pendoamento) (Ritchie et al., 1993), foram avaliadas as seguintes características biométricas: altura (cm) utilizando régua graduada, sendo medido do colo até o ápice da folha bandeira; diâmetro do colmo (mm) a 8-10 centímetros do colo da planta com o auxílio de um paquímetro; e, para número de folhas, foram contadas todas as presentes na planta.

3.2.3 Teores de clorofilas

Para a determinação do teor de clorofila, foi utilizado o medidor de clorofila Minolta SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development). O medidor de clorofila Minolta SPAD-502 tem sido investigado como instrumento para rápido diagnóstico do estado nutricional de diversas culturas, agregando vantagens como a simplicidade no uso, além de possibilitar uma avaliação não-destrutiva do tecido foliar (Argenta et al., 2001). As avaliações foram realizadas no 53º DAS, quando mais de 50% das plantas estavam na fase VT-Pendoamento, onde o último ramo do pendão é visível no topo da planta. Os estigmas de estilo ("cabelos") do milho ainda não apareciam em todas as plantas nesta fase. Foram feitas 10 leituras na 6ª folha totalmente expandida.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

As medições de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* podem servir como ferramentas para verificar a integridade do aparato fotossintético frente às adversidades ambientais. Em relação às trocas gasosas não se observou interação entre as dosagens de NPS e FCS com as concentrações de Cu nem o efeito isolado dos tratamentos (Tabela 5).

O excesso de Cu pode causar estresse abiótico acarretando danos nos fotossistemas, resultando no declínio da fotossíntese (Küpper & Andresen, 2016), podendo causar impacto sobre a concentração de clorofilas (Cambrollé et al., 2015), diminuição na atividade carboxilativa da Rubisco (Siedlecka & Krupa, 2004), competição com outros íons metálicos como o Fe, Ni e Zn e aumento da peroxidação lipídica (Küpper & Andresen, 2016).

Resultados diferentes foram verificados neste trabalho em que as dosagens de 60 e 200 mg kg⁻¹ de Cu, baseadas na resolução N° 420 do CONAMA (2009), respectivamente ao valor de prevenção e investigação agrícola, não foram suficientes para alterar as variáveis de trocas gasosas em plantas de milho, possivelmente o Cu atuou como um micronutriente nos limites favoráveis (Souza et al., 2014), apresentando participação direta no transporte de elétrons (Dalcorso et al., 2014), entre o citocromo b6f e o fotossistema I (PSI) na fase fotoquímica (Yruela, 2013).

Mateos-Naranjo et al. (2008) pesquisando o efeito do Cobre no crescimento e fotossíntese de *Spartina densiflora* Brongn, descrevem que a eficiência quântica do FSII, a taxa de fotossíntese líquida, condutância estomática e concentração de pigmentos diminuíram com o aumento na concentração de Cu.

Verifica-se na (Tabela 7) o efeito isolado do Cu na variável F0 (fluorescência inicial) que é a fluorescência mínima constante no escuro quando todos os centros de reações estão abertos, é um dos parâmetros da fluorescência de clorofila utilizados para avaliar o estresse de plantas a fatores abióticos, por exemplo, metais tóxicos (Yadav et al., 2018). O aumento da F0 indica prejuízo nas reações do PS II- fotossistema II (Paunov et al., 2018) ou diminuição na capacidade de transferência da energia de excitação da antena para o centro de reação (Baker & Rosenqvist, 2004), o que não foi observado no presente trabalho verificando que o tratamento com 60 mg kg⁻¹ de Cu com média de 163,42 reduziu em 16,53% a F0 quando comparado com o tratamento com 0 mg kg⁻¹ de Cu que obteve média de 195,78 (Tabela 7). Possivelmente a dosagem de 60 mg kg⁻¹ de Cu possibilitou maior transferência de energia, devido à participação direta do Cu no transporte de elétrons, não ocasionando prejuízo nos fotossistemas quando analisada essa variável.

Tabela 5 – Resumo da análise de variância da fotossíntese (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO₂ (Ci), transpiração (E), eficiência do uso da água (EUA), temperatura foliar (Tleaf), relação concentração interna CO₂ /concentração externa CO₂ (Ci/Ca), F0 (fluorescência inicial), Fm (fluorescência máxima), Fv (fluorescência variável), Fv/Fm (eficiência quântica potencial do PSII), Fs (fluorescência no estado estável), Fm' (fluorescência máxima adaptada ao claro), ΦPSII (eficiência quântica efetiva), NPQ (dissipação não fotoquímica), Fo/Fm' (eficiência quântica basal do PS II), Fo' (fluorescência mínima da folha adaptada ao claro), qP (dissipação fotoquímica), Fv'/Fm' (Parâmetro de Genty), ETR (taxa de transporte de elétrons), qL (coeficiente de fotoinibição) de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Causas de variação	A	gs	Ci	E	EUA	Tleaf	Ci/Ca	Fv/Fm	Fv/FmFs	Fm'	ΦPSII	NPQ	Fo/Fm'	Fv'/Fm'	ETR	qL					
	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($^{\circ}\text{C}$)	(mol mol^{-1})				($\mu\text{mol e}^{-}$)	SII	Q	m'Fo'	qP	($\mu\text{mol e}^{-}$)						
Quadrado médio																					
Nitroprussiato	4.58 ^{ns}	0.5 ^{ns}	6095.0 ^{ns}	1.8 ^{ns}	0.69 ^{ns}	0.1 ^{ns}	1.36 ⁿ	3.96 [*]	0.08 ^{ns}	0.30 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.29 ^{ns}	8.6 ^{ns}	0.5 ^{ns}	0.69 ^{ns}	1.07 ^{ns}	1.0 [*]	0.76 ^{ns}	0.4 ^{ns}		
Cobre	5.58 ^{ns}	0.1 ^{ns}	4141.0 ^{ns}	0.0 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.0 ^{ns}	0.20 ^{ns}	2.13 ⁿ	0.17 ^{ns}	0.38 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.04 ^{ns}	4.9 ^{ns}	0.2 ^{ns}	1.66 ^{ns}	3.43 ^{ns}	0.6 [*]	0.47 ^{ns}	1.25 ^{ns}	0.9 [*]	
Nitroprussiato x Cobre	7.86 ^{ns}	0.2 ^{ns}	1608.0 ^{ns}	0.5 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.1 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.56 ⁿ	0.84 ⁿ	0.08 [*]	0.06 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.04 ^{ns}	1 ^{ns}	7 ^{ns}	* ^{ns}	ns ^{ns}	8 [*]	0.91 ^{ns}	1 [*]	
Blocos	41.67 [*]	4.0 ^{ns}	15054.0 ^{ns}	21.0 ^{ns}	10.4 ^{ns}	0 ^{ns}	0.05 ^{ns}	1.49 ⁿ	0.70 ⁿ	0.03 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.27 ^{ns}	9.0 ^{ns}	1.2 ^{ns}	0.56 ^{ns}	0.95 ^{ns}	0.2 ^{ns}	0.09 ^{ns}	1.30 ^{ns}	8 ^{ns}
Resíduo	10.05 ^{ns}	0.4 ^{ns}	4070.0 ^{ns}	0.7 ^{ns}	0.99 ^{ns}	0.2 ^{ns}	0.51 ^{ns}	1.49 ⁿ	0.70 ⁿ	0.03 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.26 ^{ns}	3.0 ^{ns}	0.5 ^{ns}	0.59 ^{ns}	1.86 ^{ns}	0.3 ^{ns}	0.15 ^{ns}	0.30 ^{ns}	2 ^{ns}
Média	12.8	0.1	208.1	4	3.53	36.1	0.53	187.48	1154.15	976.11	0.84	371.02	523.55	0.3	1.1	0.35	155.39	0.4	0.67	60.37	1.1
CV (%)	25.6	6.2	23.8	17.2	35.8	0.4	25	5.8	0.7	0.6	24.1	2.4	2.5	20.7	6.1	17.7	8.9	23.7	28.1	1.9	18.9

CV: Coeficiente de variação;

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

ns não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 6 – Efeito das concentrações de cobre no diâmetro do colmo e nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Cobre	Diâmetro	Fo	Fv	Fv/Fm	Fo/Fm'	qP	qL
(mg kg ⁻¹)	(mm)						
0	10.27 ±	195.78 ±	972.87 ±	0.84 ±	0.33 ±	0.44 ±	1.14 ±
	1.14 b	11.24 a	36.95 ab	0.01 ab	0.03 b	0.02 ab	0.08 a
60	13.62 ±	163.42 ±	1047.68 ±	0.86 ±	0.31 ±	0.41 ±	1.20 ±
	1.25 a	13.09 b	44.63 a	0.01 a	0.03 b	0.01 b	0.08 a
200	11.43 ±	204.96 ±	907.56 ±	0.81 ±	0.41 ±	0.46 ±	1.00 ±
	1.48 ab	13.21 a	30.45 b	0.01 b	0.03 a	0.02 a	0.04 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de quatro repetições e DP.

A fluorescência da clorofila *a* é uma ferramenta usada na detecção de danos ao aparelho fotossintético causado por estresses abióticos (Stirbet et al., 2018). No presente trabalho verificou-se o efeito isolado do Cu no parâmetro Fv (fluorescência variável), havendo diferença entre as concentrações de 60 e 200 mg kg⁻¹ de Cu que apresentaram médias 1047,68 e 907,56 respectivamente (Tabela 6).

Essa redução verificada no tratamento com 200 mg kg⁻¹ de Cu pode ser devido a substituição do Mg pelo Cu na molécula de clorofila, causando alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII (Zvezdanovic et al., 2007). Quanto maior a Fv (fluorescência variável) maior a capacidade da planta em transferir a energia dos elétrons ejetados das moléculas dos pigmentos para produção de ATP, NADPH e ferredoxina reduzida (Fdr) (Baker, 2008).

Não houve diferença no máximo rendimento quântico potencial do PSII medido em material adaptado ao escuro (Fv/Fm) em relação ao tratamento 0 mg kg⁻¹ de Cu verificando diferença entre as concentrações de 60 e 200 mg kg⁻¹ de Cu que apresentaram médias 0,86 e de 0,81 respectivamente (Tabela 6).

No presente trabalho, as plantas de milho apresentaram médias de Fv/Fm verificadas para plantas não estressadas. Valores abaixo de 0,75 podem indicar que a planta está sofrendo danos causados por algum tipo de estresse, indicando uma redução na proporção de centros de reação abertos (Maxwell & Johnson, 2000). Segundo Cambrollé et al. (2015), a redução do rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) e da eficiência quântica efetiva do PSII (Y(II))

foi devido à fitointoxicação causada pelo Cu, que provocou a degradação do conteúdo interno do cloroplasto e a substituição do Mg pelo Cu na clorofila. Resultados diferentes foram verificados neste trabalho em que as médias de 0,86 e de 0,81 verificadas nos tratamentos das concentrações de 60 e 200 mg kg⁻¹ de Cu demonstram neste parâmetro plantas não estressadas.

Não houve efeito da interação entre as dosagens de NPS e FCS com as concentrações de cobre no parâmetro F0/Fm' (produção quântica basal do processo não-fotoquímico no PSII) verificando efeito do tratamento de 200 mg kg⁻¹ de Cu que apresentou média de 0,41 causando aumento de 24,54% quando comparado ao tratamento com 0 mg kg⁻¹ de Cu que apresentou média de 0,33 (Tabela 7). Vários autores citam o aumento desta relação como indicativo de estresse, sugerindo valores normais, ou seja, valores preconizados como padrão, entre 0,14 e 0,20 (Roháček, 2002).

Não houve efeito da interação entre as dosagens de NPS e FCS com as concentrações de Cu no parâmetro qP (*quenching* fotoquímico) verificando diferença entre as concentrações de Cu que apresentaram médias de 0,41 e 0,46 respectivamente as concentrações de 60 e 200 mg kg⁻¹ de Cu (Tabela 6).

Verificou-se que a concentração 200 mg kg⁻¹ de Cu apresentou maior qP isso pode ser devido ao Cu atuar como cofatores em várias enzimas como a plastocianina (Nazir et al., 2019; Zhang & Li, 2019), participando no transporte de elétrons nas reações fotossintéticas primárias (Dalcorso et al., 2014; Yruela, 2013).

O parâmetro qP indica a proporção de centros de reação abertos no PSII (Minagawa, 2008) é a dissipação causada pelo processo fotoquímico, ou seja, é causado pela utilização da energia para a redução do NADP, estando diretamente relacionado com o estado redox da plastoquinona e decresce na proporção do fechamento dos centros de reação (Sousa, 2012).

Observou-se o efeito isolado do Cu no parâmetro qL (*quenching* relacionado à fotoinibição da fotossíntese). O tratamento de 200 mg kg⁻¹ de Cu apresentou média de 1,00 apresentando redução de 12,43% quando comparado ao tratamento com 0 mg kg⁻¹ de Cu que apresentou média de 1,14 (Tabela 6).

Esse parâmetro é um mecanismo de proteção que permite dissipar o excesso de energia termal. Essa dissipação da energia pode prevenir a formação de EROs que podem danificar irreversivelmente proteínas, lipídeos e pigmentos de membranas fotossintéticas (Horton & Ruban, 2004). Observando assim que o dano ao PSII induzido pelas concentrações de Cu não foram suficientes para causar a fotoinativação, com o PSII sendo protegido por um mecanismo de dissipação de calor eficaz para evitar a fotoinibição no centro de reação.

Em relação aos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* que foram significativos em relação às dosagens de NPS e FCS verificou-se que o tratamento com (300 μ M) NPS + (0 μ M) FCS apresentou média de 1122.76 proporcionando redução de 2,81% no parâmetro Fm quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 1155.26 (Tabela 7).

O parâmetro Fm indica a intensidade máxima de fluorescência que ocorre quando praticamente toda quinona A (QA) está reduzida e os centros de reações atingem sua capacidade máxima (Baker & Rosenqvist, 2004). Essa diminuição pode estar associada à inativação do PSII nas membranas dos tilacóides afetando diretamente o fluxo de elétrons entre os fotossistemas (Strasser et al., 2004).

O NO dependendo de sua concentração pode funcionar como um regulador positivo e negativo das respostas ao estresse (Mur et al. 2012), sendo assim, podemos inferir que o tratamento NPS (300 μ M) + FCS (0 μ M) possibilitou alterações químicas nas proteínas (Malik et al., 2011; Fungillo et al., 2014). Segundo Misra et al. (2014) as proteínas do centro de reação do PSII D1 e D2 são alvos do NO podendo impedir a transferência de elétrons e consequente inativação do centro de reação do PSII (Yamamoto et al., 2008).

Tabela 7 – Efeito do nitroprussiato de sódio (NPS) e ferrocianeto de sódio (FCS) nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Fm	qP	qL
Água	1155.26 \pm 19.22 a	0.40 \pm 0.02 b	1.12 \pm 0.05 a
NPS (0 μ M) + FCS (300 μ M)	1157.97 \pm 20.53 a	0.47 \pm 0.02 a	1.21 \pm 0.06 a
NPS (200 μ M) + FCS (100 μ M)	1177.84 \pm 15.55 a	0.47 \pm 0.02 a	0.96 \pm 0.03 b
NPS (300 μ M) + FCS (0 μ M)	1122.76 \pm 9.97 b	0.43 \pm 0.02 ab	1.15 \pm 0.07 a

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de quatro repetições e DP.

As dosagens de (0 μ M) NPS + (300 μ M) FCS e (200 μ M) NPS + (100 μ M) FCS apresentaram médias de 0,47 no parâmetro qP proporcionando um aumento de 20% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 0,40 (Tabela 7).

Podemos inferir que o aumento do qP demonstra o efeito do NO em relação à atividade máxima do fotossistema II, refletindo em um bom funcionamento da cadeia de transporte de elétrons gerando ATP e NADPH (Silveira et al., 2016), sendo a dissipação causada pelo processo fotoquímico, ou seja, é causado pela utilização da energia para a redução do NADP.

A liberação de cianeto pode reduzir a atividade fotoquímica do fotossistema II- PS II

afetando a produtividade da planta. O NPS e o FCS liberam cianeto durante sua fotólise reduzindo a atividade fotoquímica do PSII (Wodala et al., (2010). Resultados diferentes foram verificados neste trabalho, em que as dosagens de NPS e FCS não causaram efeito negativo no parâmetro qP. Segundo Silva (2015), o NO reage rapidamente com o O_2^- produzindo o peroxinitrito (ONOO-), sendo capaz de agir no aumento da síntese e/ou atividade de enzimas antioxidantes, como as ascorbato peroxidases (Del Rio, 2015).

O tratamento com (200 μ M) NPS + (100 μ M) FCS apresentou média de 0.96 proporcionando redução de 14,14% no parâmetro qL quando comparado ao tratamento controle que obteve média de 1,12 (Tabela 7).

Essa redução verificada no tratamento (200 μ M) NPS + (100 μ M) FCS no qL que representa a dissipação da energia para prevenção da formação de EROs. O NO por meio da S-nitrosilação desencadeia mudanças na dinâmica das enzimas (Farnese et al., 2016), sendo um processo importante na resposta a estresses abióticos, regulando assim, funções celulares e eventos de sinalização (Sevilla et al., 2015), sendo capaz de controlar a atividade de proteínas (Yu et al., 2014), resultando na ativação de mecanismos de defesa na planta (Saxena & Shekhawa, 2013).

Segundo Silva et al., (2018) o cianeto reduz a peroxidação lipídica e aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, na respiração a oxidação do NADH resistente ao cianeto é uma marca característica dessa via de transporte de elétrons em plantas (Lenhinger, 2006). Segundo Gerivani et al. (2016) o cianeto é menos tóxico para as plantas em virtude do funcionamento da oxidase alternativa e sua capacidade de metabolizá-lo.

3.3.2 Medições biométricas

Não houve interação entre as dosagens de NPS e FCS com as concentrações de Cu para as variáveis biométricas: altura e número de folhas e estas não foram afetadas pelo efeito isolado dos tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8 – Resumo da análise de variância do índice SPAD, altura, área foliar, número de folhas, diâmetro do colmo de plantas de milho tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Causas de variação	SPAD	Altura	Área foliar	Número de folhas	Diâmetro
		(m)	(cm ²)		(mm)
	Quadrado médio				
Nitroprussiato de sódio	624.92 ^{ns}	70.99 ^{ns}	131.48 ^{ns}	0.41 ^{ns}	36.69 ^{ns}
Cobre	76.76 ^{ns}	8.94 ^{ns}	109.96 ^{ns}	0.15 ^{ns}	366.46 ^{ns}
Nitroprussiato x Cobre	409.21 ^{ns}	28.03 ^{ns}	88.01 ^{ns}	0.80 ^{ns}	99.74 ^{ns}
Blocos	789.58 ^{ns}	536.84 ^{ns}	77.11 ^{ns}	1.56 ^{ns}	39.88 ^{ns}
Resíduo	816.92	114.17	95.81	0.69	62.97
Média	24.44	118.70	1856.44	14.52	116.89
CV (%)	15.8	24.8	10.1	2.8	17.9

CV: Coeficiente de variação;

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

ns não significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

No presente trabalho não foi observado sintomas visíveis de toxicidade por Cu, tais como clorose causada por danos nas membranas dos tilacóides (Adrees et al. 2015). Como observado nos parâmetros da fluorescência da clorofila (Tabela 5), em que não foram verificados efeitos negativos das concentrações de Cu.

Segundo Yuan et al. (2013) observaram que em maiores concentrações de Cu ocorreu inibição da divisão e alongamento celular em *Arabidopsis thaliana*, redução do crescimento devido alterações bioquímicas e metabólicas (Wang et al., 2017) como aumento da concentração de EROs (Ravet & Pilon, 2013).

Observou-se efeito das concentrações de Cu no diâmetro do colmo apresentando médias de 13,62 cm e 11,43 cm causando aumento de 32,66% e 11,29% nos tratamentos com 60 e 200 mg kg⁻¹ de Cu respectivamente, em comparação ao tratamento com 0 mg kg⁻¹ de Cu que apresentou média de 10,27 cm (Tabela 8).

O Cu é um elemento essencial aos vegetais (Yruela, 2009), participando como cofator em várias enzimas (Zhang & Li, 2019), atuando como um micronutriente dentro dos limites favoráveis (Souza et al., 2014). A maior parte do Cu inorgânico no solo ocorre como óxidos e sulfetos que são insolúveis com baixa fitodisponibilidade (Mihaljevič et al., 2019). De acordo com Kumpiene et al. (2008), a matéria orgânica compete pelos metais com os sítios de troca dos óxidos, apresentando efeito amenizante de toxicidade do Cu.

Berton et al. (1997) verificou que plantas de milho apresentando teor de 335 mg kg⁻¹ de Cu nas folhas, não manifestaram sintomas de toxicidade. Segundo Benimeli et al. (2009), plantas de milho podem tolerar e acumular altas concentrações de Cu sem apresentar mudanças morfológicas visíveis, como verificado no presente trabalho. O acúmulo de Cu no

sistema radicular pode representar uma estratégia de tolerância da planta para o excesso de metais pesados no solo (Cambrollé et al., 2013).

Silva et al. (2019) trabalhando com sorgo verificou que para as variáveis diâmetro do colmo, altura de planta e número de perfilhos as doses acima de 160 (mg de cobre kg^{-1} de solo) começam a afetar de forma negativa.

3.3.3 Teores de clorofila

Não houve interação entre as dosagens de NPS e FCS com as concentrações de Cu nem o efeito isolado dos tratamentos nas determinações do teor de clorofila medido pelo índice SPAD (Tabela 8). Segundo Tiecher et al. (2017) geralmente é observada redução do conteúdo de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides em plantas cultivadas em solos com elevados teores de Cu, isso pode ser devido ao fato do Cu em excesso, poder substituir o Mg na estrutura da clorofila (Yruela, 2009). Resultados diferentes foram encontrados nesse trabalho em que não foram observados efeitos significativos das concentrações aplicadas em relação ao teor de clorofila medido pelo índice SPAD.

3.4 Conclusão

As dosagens de NO e as concentrações de Cu não influenciaram nas variáveis de trocas gasosas, no teor de clorofila medido pelo índice SPAD e nas variáveis biométricas (altura, área foliar, número de folhas), observando aumento no diâmetro do colmo das plantas que receberam as concentrações de Cu.

As concentrações de 60 e 200 mg kg^{-1} de Cu não afetaram negativamente as variáveis da fluorescência da clorofila *a* atuando como um micronutriente dentro dos limites favoráveis. As variáveis da fluorescência da clorofila *a* demonstraram o efeito do NO presente no NPS e do cianeto presente no FCS no aumento da dissipação causada pelo processo fotoquímico onde a energia é utilizada na redução do NADP.

Agradecimentos

Agradecemos a Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos, a UFRA - Universidade Federal Rural da Amazônia e ao grupo de Estudos de Biodiversidade em Plantas Superiores- EBPS.

REFERÊNCIAS

Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., & Bharwana, S. A. (2015). The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8148-8162. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4496-5>

Argenta, G., Silva, P. R. F., Bartolini, C. G., Forsthofer, E. L., & Strieder, M. L. (2001). Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e nitrogênio na folha de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13, 158-167. <https://doi.org/10.1590/S0103-31312001000200005>.

Baker, N. R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 89-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>.

Baker, N. R., & Rosenqvist, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany, United Kingdom*, 55, 1607-1621. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh196>.

Benimeli, C. S., Medina, A., Navarro, C. M., Medina, R. B., Amoroso, M. J., & Gómez, M. I. (2010). Bioaccumulation of copper by *Zea mays*: impact on root, shoot and leaf growth. *Water, Air, & Soil Pollution*, 210(1), 365-370. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0259-6>

Berton, R. S., Valadares, J. M. A. S., de Camargo, O. A., & Bataglia, O. C. (1997). Peletização do lodo de esgoto e adição de CaCO₃ na produção de matéria seca e absorção de Zn, Cu e Ni pelo milho em três latossolos. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 21(4), 685-691. <https://doi.org/10.1590/S0100-06831997000400020>

Cambrollé, J., García, J. L., Figueroa, M. E., & Cantos, M. (2015). Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere*, 120, 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.044>.

Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, L. M., Muñoz-Vallés, S., Figueroa-Luque, E., Luque, T., Figueroa, M. E. (2013). Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limonium stratum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 8839-8847. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1833-4>.

CONAB | **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS** | v. 8 – safra 2020/21, n. 1 – primeiro levantamento | outubro 2020.

Contini, E., Mota, M. M., Marra, R., Borghi, E., Miranda, R. A., Silva, A. F., & Mendes, S. M. (2019). *Milho: caracterização e desafios tecnológicos*. Brasília: Embrapa. (Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2).

Costa, E. S., Bressan-Smith, R., Oliveira, J. G., & Campostrini, E. (2003). Chlorophyll a fluorescence analysis in response to excitation irradiance in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp) submitted to high temperature stress. *Photosynthetica*, 41(1), 77-82. <https://doi.org/10.1023/A:1025860429593>

- Dalcorso, G., Manara, A., Piasentin, S., & Furini, A. (2014.). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, 6, 1770 – 1788. <https://doi.org/10.1039/C4MT00173G>.
- Del Rio, L. A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2827-2837. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv099>.
- Dresselhaus T., & Hückelhoven R. (2018). Biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Agronomy*, 8, 267. <https://doi.org/10.3390/agronomy8110267>.
- Farnese, F. S., Menezes-Silva, P.E., Gusman, G. S., & Oliveira, J. A. (2016). When the bad guys become the good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses of abiotic stress. *Plant Science*, 7, 471. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>.
- Franco, M. H. R., Lemos, V. T., Aguiar, L. M., França, A. C., Ferreira, E. A., & Silva, D. V. (2015). Características fisiológicas do feijoeiro cultivado em solos após fitorremediação do picloram. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 14, 315325. <https://doi.org/10.7824/rbh.v14i4.454>.
- Fungillo, L.; Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., & Salgado, I. (2014). Snitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Commun*, 5, 5401. <https://doi.org/10.1038/ncomms6401>.
- Gerivani, Z., Vashae, E., Sadeghipour, H.R., Aghdasi, M., Shobbar, Z.S., & Azimmohseni, M. (2016). Short versus long term effects of cyanide on sugar metabolism and transport in dormantwalnutkernels. *PlantScience*, 252, 193204. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.07.06>.
- González-Mendoza, D., Gil, F. E., Escoboza-Garcia, F., Santamaria, J.M., & Zapata-perez, O. (2013). Copper stress on photosynthesis of black mangle (*Avicennia germinans*). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85, 665-670. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013000200013>.
- Horton, P., & Ruban, A. (2004). Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *Journal of Experimental Botany*, 56, 365-373. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri023>.
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., & Samborska, I. A. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38, 102. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>.
- Küpper, H., & Andresen, E. (2016). Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics*, 8, 269- 285. <https://doi.org/10.1039/C5MT00244C>.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., & Maurice, C. (2008). Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments: a review. *Wastemanagement*, 28(1), 215225. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>.
- Lamattina, L. E., & García Mata, C. (2016). *Gasotransmissores em plantas: o surgimento de um novo paradigma na sinalização celular*. Genebra: Springer International Publishing.

- Lehninger, A. L. (2006). *Princípios de bioquímica* (4 ed). São Paulo: Sarvier.
- Lopes, M. J. S., Dias Filho, M. B., Castro, T. H. R., & Silva, G. B. (2018). Light and plant growth promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. *GrassandForageScience*, 73(2),493499. <https://doi.org/10.1111/gfs.12336>
- Malik, S. I.; Hussain, A., Yun, B.W., Spoel, S. H., & Loake, G. J. (2011). GSNORmediated denitrosylationintheplantdefenseresponse.*PlantScience*,181,540544.<https://doi.org/10.1016/jts.ci.2011.04.004>.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cambrollé, J., & Figueroa, M. H. (2008). Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Marine Environmental Research*, 66,459465.<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2008.07.007>.
- Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51, 659-668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>.
- Minagawa, J. (2008). Fluorescence quenching analysis. In: Stern, D.; Witman, G. (Ed). *The Chlamydomonas Sourcebook*, 2° ed., v. 3.
- Mihaljevič, M., Baieta, R., Ettlér, V., Vaněk, A., Kříbek, B., Penížek, V., Drahota, P., Trubač, J., Sracek, O., Chrástný, V., & Mapani B.S. (2019). Tracing the metal dynamics in semi-arid soils near mine tailings using stable Cu and Pb isotopes. *Chemical Geology*, 515, 61-76. u.
- Misra, A.N., Vladkova, R., Singh Misra, M., Dobrikova, A.G., & Apostolova, E.L. (2014). Action and target sites of nitric oxide in chloroplasts. *Nitric Oxide*, 39, 35-45. [10.1016/j.niox.2014.04.003](https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.003).
- Mur, L.A.J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G. V, & Gupta, K.J. (2012). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants*, 5, 1-17. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>.
- Nazir, F., Hussain, A., & Fariduddin, Q. (2019). Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress. *Chemosphere*, 230, 544-558. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.001>
- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., & Goltsev, V. (2018). Effects of different metalsonphotosynthesis:cadmiumandzinc affectchlorophyllfluorescenceindurumwheat.*InternationalJournalofMolecularSciences,Basel*,19,787.<https://doi.org/10.3390/ijms1030787>.
- Pinto, F. R. (2017). *Caracterização da acumulação e da tolerância ao stress induzido por Cd em plantas de espinafre (Spinacea oleracea L.)*. (Tese de Doutorado em Engenharia do Ambiente). Universidade de Lisboa, Portugal.
- Ravet, K., & Pilon, M. (2013). Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidativestress. *Antioxidants&redoxsignaling*, 19(9),919932.<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5084>

Rodrigues, A. C. D., dos Santos, A. M., dos Santos, F. S., Pereira, A. C. C., & Sobrinho, N. M. (2016). Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: Possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Revista Virtual de Química*, 8(1), 262-276. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160017>

Ritchie, S.W., Hanway, J.J., & Benson, G.O. (1993). *How a corn plant develops*. Ames: Iowa State University Of Science And Technology, Cooperative Extension Service. 21p.

Roháček, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 40, 329. <https://doi.org/10.1023/A:1020125719386>.

Sanz, L., Albertos, P., Mateos, I., Sánchez-Vicente, I., Lechón, T., Fernández-Marcos, M., & Lorenzo, O. (2015). Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2857-2868. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv213>.

Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., ... & Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 7107-21. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>

Saxena, I., & Shekhawat, G.S. (2013). Nitric oxide (NO) in alleviation of heavy metal induced phytotoxicity and its role in protein nitration. *Nitric Oxide*, 32, 132-0. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.03.004>.

Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Calderón, A., Lázaro, J. J., & Jiménez, A. (2015). The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of experimental botany*, 66(10), 2945-2955. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv146>

Siedlecka, A. N. N. A., & Krupa, Z. B. I. G. N. I. E. W. (2004). Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions-how many strategies. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9, 56-57.

Silveira, N. M., Frungillo, L., Marcos, F. C. C., Pelegrino, M. T., Miranda, M. T., Seabra, A. B., Salgado, I., Machado, E.C., & Ribeiro, R. V. (2016). Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Plant*, 244, 181-190. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>.

Souza, V. L., Almeida, A. A. F., Souza, J. S., Mangabeira, P. A. O., Jesus, R. M., Pirovani, C. P., Ahnert, D., Baligar, V. C., Louguercio L. L. (2014). Altered physiology, cell structure, and gene expression of *Theobroma cacao* seedlings subjected to Cu toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 1217-1230. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1983-4>.

Sousa, C. P. (2012). *Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C3 e C4* (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal De Pelotas.

Strasser, R.J.; Michael, M.T., & Srivastava, A. (2004). Analysis Of The Chlorophyll A Fluorescence Transient. In: Govindje. G.P. (Ed.). *Advances in photosynthesis and respiration*

chlorophyll fluorescence a signature of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, pp. 321-362.

Stirbet, A., Lazár D., Kromdijk, J., & Govindjee G. (2018). Chlorophyll a fluorescence induction: can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica*, 56 86–104. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0770-3>.

Silva, A. L. (2015). *Efeito do nitroprussiato de sódio (SNP) na germinação de sementes de Senna macranthera (DC. ex Collad.) H. S. Irwin & Baneby sob estresse salino*. Universidade Federal de Viçosa.

Silva, A. L. D., Pinheiro, D. T., Borges, E. E. D. L., Silva, L. J. D., & Dias, D. C. F. D. S. (2018). Tolerância à salinidade em sementes de *Senna macranthera* (DC. ex Collad.) HS Irwin & Barneby com nitroprussiato de sódio (SNP) promovida pelo cianeto. *Journal of Seed Science*, 40(3), 323-330. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3198495>.

Silva, Juliano Cesar da (2019). *Desenvolvimento e capacidade fitoextratora de plantas agrícolas cultivadas em solo com diferentes texturas e teores de cobre* / Juliano Cesar da Silva. 86 p.

Tiecher, T.L., Tiecher, T., Ceretta, C.A., Ferreira, P.A.A., Nicoloso, F.T., Soriani, H.H., Conti, L., Kulmann, M.S.S., Schneider, R.O., & Brunetto, G. (2017). Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. *Scientia Horticulturae*, 222, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.05.026>.

USDA (2019). United States Department of Agriculture. *Grain: world markets and trade*. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/grain-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 29 out. 2019.

Wang, L.H., Wang, W., Zhou, Q., & Huang, X.H. (2014). Combined effects of lanthanum (III) chloride and acid rain on photosynthetic parameters in rice. *Chemosphere*, 112, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.069>.

Wang, C., Wang, J., Wang, X., Xia, Y., Chen, C., Shen, Z., & Chen, Y. (2017). Proteomic analysis on roots of *Oenothera glazioviana* under copper-stress conditions. *Scientific reports*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10370-6>

Wodala, B., Ördög, A., & Horváth, F. (2010). The cost and risk of using sodium nitroprusside as a NO donor in chlorophyll fluorescence experiments. *Journal of plant physiology*, 167(13), 1109-1111. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.03.013>.

Yadav, S; Shankar, A; Rai, S; Rai, R; Singh, S; & Rai, L.C. (2018) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis under abiotic stress. *Environment and Photosynthesis a Future Prospect*, India, 287-304.

Yamamoto, Y., Aminaka, R., Yoshioka, M., Khatoon, M., Komayama, K., Takenaka, D., ... & Yamamoto, Y. (2008). Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynthesis Research*, 98, 589-608. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9372-4>

Yruela, I. (2009). Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36, p. 409–430. <https://doi.org/10.1071/FP08288>.

Yruela, I. (2013). Transition metals in plant photosynthesis. *Metallomics*, 5, 1090-1109. <https://doi.org/10.1039/C3MT00086A>.

Yuan, HM, Xu, HH, Liu, WC, & Lu, YT (2013). O cobre regula o alongamento da raiz primária por meio da redistribuição de auxina mediada por PIN1. *Plant and Cell Physiology*, 54 (5), 766-778. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct030>

Yu, J., Sun, R., Zhao, Z., & Wang, Y. (2014). Auricularia polytricha polysaccharides induce cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells. *International Journal Of Biological Macromolecules*.68, 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.018>.

Zhang, D., Liu, X., Ma, J., Yang, H., Zhang, W., & Li, C. (2019). Genotypic differences and glutathione metabolism response in wheat exposed to copper. *Environmental and Experimental Botany*, 157, 250-259. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.032>

Zvezdanovic, J., Markovic, D., & Nikolic, G. (2007) Different possibilities for the formation of complexes of copper and zinc with chlorophyll inside photosynthetic organelles: chloroplasts and thylakoids. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72, 1053-1062. <https://doi.org/10.2298/JSC0711053Z>

4 ÓXIDO NÍTRICO COMO ATENUADOR DA TOXICIDADE DE COBRE NOS TEORES DE NUTRIENTES EM PLÂNTULAS DE MILHO

Artigo submetido na revista Journal of Agricultural Science

RESUMO

O cobre (Cu) é importante devido ao seu papel vital e indispensável no crescimento das plantas, mas em altas concentrações pode ser prejudicial, reduzindo o desenvolvimento e causando danos aos tecidos. O óxido nítrico-NO destaca-se como uma molécula sinalizadora desempenhando um papel crucial em respostas das plantas aos estresses abióticos como causados por metais pesados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óxido nítrico sobre os teores de macro e micronutrientes catiônicos magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e Manganês (Mn) e o fator de bioacumulação e de translocação do cobre em plântulas de milho em crescimento inicial submetidas à toxicidade por cobre. Foi realizado um experimento em delineamento inteiramente casualizado em fatorial 4 x 3 com 12 tratamentos e 8 repetições, totalizando 96 bandejas contendo 25 sementes por repetição. Os resultados mostraram que as dosagens de óxido nítrico não foram suficientes para atenuar à toxicidade por cobre evidenciando o acúmulo do metal nas raízes. As dosagens de nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio proporcionaram toxidez alterando assim, o equilíbrio mineral na mobilização de macro e micronutrientes catiônicos e sua translocação para a parte aérea de plântulas de milho da variedade K9606VIP3 em crescimento inicial.

Palavras-chave: Metal pesado. Bioacumulação. Micronutriente.

ABSTRACT

Copper (Cu) is important due to its vital and indispensable role in plant growth, but in high concentrations it can be harmful, reducing development and causing tissue damage. Nitric oxide-NO stands out as a signaling molecule playing a crucial role in plant responses to abiotic stresses as caused by heavy metals. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of nitric oxide on the levels of macro and micronutrients cationic magnesium (Mg), calcium (Ca), iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn) and Manganese (Mn) and the bioaccumulation and translocation factor of copper in maize seedlings in initial growth submitted to copper toxicity. An experiment was carried out in a completely randomized design in a 4 x 3 factorial with 12 treatments and 8 repetitions, totaling 96 trays containing 25 seeds per repetition. The results showed that the dosages of nitric oxide were not sufficient to attenuate the toxicity by copper evidencing the accumulation of the metal in the roots. The dosages of sodium nitroprusside and sodium ferrocyanide provided toxicity, thus altering the mineral balance in the mobilization of macro and cationic micronutrients and their translocation to the aerial part of K9606VIP3 corn seedlings in initial growth.

Keywords: Heavy metal. Bioaccumulation. Micronutrient.

4.1 Introdução

A exploração de minerais pode causar alterações nos teores naturais de metais pesados no ambiente, a prática da mineração poderá resultar em rejeitos de resíduos (Ali et al., 2013; Cunha, 2017). Os metais pesados são elementos que possuem densidade atômica maior que 5 Kg/dm^3 e que estão associados à poluição ambiental e toxicidade aos seres vivos (Mikula et al., 2020), podem se ligar a parede celular das plantas devido à presença de grupos funcionais como carboxila (-COOH), hidroxila (-OH) e tiol (-SH), presentes nos componentes de parede (Mehes-Smith et al., 2013), competindo pela ligação (sulfidril, -SH, substituindo o Mg^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{2+} nas proteínas do cloroplasto (Ameh et al., 2019).

A cultura do milho possui destaque nos agronegócios mundial e brasileiro apresentando-se como matéria-prima tanto para a nutrição humana quanto para a alimentação animal (Fritsche Neto, 2015). A importância do milho não está apenas na produção de uma cultura anual, mas em todo o relacionamento que essa cultura tem na produção agropecuária brasileira (Nunes, 2018).

O estabelecimento da plântula resulta em intensas alterações morfológicas, de estrutura celular e mobilização das reservas (Bewley et al., 2013; Soriano et al., 2013), predominantes no endosperma, amido, parede celular e proteínas de armazenamento que são mobilizados pela ação de enzimas hidrolíticas e segregadas para o endosperma amiláceo no grão de milho (Shaek, 2014), as reservas de macro e micronutrientes são necessárias para o início do desenvolvimento das plântulas (Nadeem et al., 2012).

Os elementos-traço podem causar o estresse oxidativo e interferir, na atividade de enzimas como α -amilase e β -amilase, enzimas responsáveis pela degradação do amido (Ko et al., 2012), a inibição dessas enzimas pode ser um indicativo dos mecanismos de toxicidade dos elementos-traço (Kong, 2013), alguns são considerados essenciais para as condições fisiológicas (Asati et al., 2016).

O cobre (Cu) é importante devido ao seu papel vital e indispensável no crescimento das plantas (Sharma et al., 2012), devido à sua capacidade de perder e ganhar elétrons facilmente, o Cu atua como cofatores em várias enzimas, como citocromo *c* oxidase, polifenol oxidase, Cu/Zn superóxido dismutase e plastocianina (Nazir et al., 2019; Zhang e Li, 2019).

Em quantidades tóxicas nos tecidos das plantas ($20 \text{ a } 100 \text{ mg kg}^{-1}$) (Chaves et al., 2010), o Cu pode bloquear a absorção de água interferindo no processo de germinação, afetando a atividade enzimática (Kranner et al., 2011), o Cu catalisa a produção de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) prejudicial para componentes

celulares tais como DNA, proteínas e lipídios, reduzindo o desenvolvimento e causando danos aos tecidos (Thounaojam et al., 2014).

As plantas cultivadas em solos com alto teor de cobre apresentam redução na taxa fotossintética e na respiração (Marques et al., 2018), redução do comprimento da raiz, biomassa, declínio na absorção de nutrientes (De Marco et al., 2017; Xu et al., 2017). O comprimento radicular é um parâmetro importante, pois, a radícula é o primeiro órgão da plântula que entra em contato com a solução contaminada (Feng et al. 2016).

O óxido nítrico-NO é uma molécula gasosa de estrutura molecular simples, que ocorre naturalmente nas células vegetais, apresenta propriedades hidrofóbicas, sendo capaz de se difundir livremente através das membranas (Wang et al., 2013). É uma molécula endógena ou exogenamente fornecida através de compostos doadores. A aplicação de NO exógeno sob a forma de nitroprussiato de sódio- NPS melhora a tolerância de plantas ao estresse causado por metais pesados (Wang et al., 2013). Pesquisas evidenciaram que o tratamento com baixas concentrações de NO pode diminuir danos oxidativos e estimular a síntese e atividade de enzimas antioxidantes quando a planta está sob diversos tipos de estresse (Del Rio, 2015).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óxido nítrico sobre os teores de macro e micronutrientes catiônicos magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) e o fator de bioacumulação e de translocação do cobre em plântulas de milho em crescimento inicial submetidas à toxicidade de Cu.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido no laboratório de sementes do grupo de Estudos de Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS) localizado no Instituto de Ciências Agrárias-ICA pertencente a UFRA (Universidade Federal Rural da Amazônia) – Belém, com coordenadas geográficas de 01° 27' 21" S, 48° 30' 16" W e altitude média de 10 m. De acordo com Koppen, o clima regional é classificado como Af (equatorial) (Lopes et al., 2018), sendo utilizadas sementes de milho híbrido K9606 VIP3 da empresa KWS SAAT SE & Co. KgaA.

4.2.2 Tratamento de sementes e delineamento experimental

As sementes foram embebidas por 48 horas em papel Germitest com solução contendo nitroprussiato de sódio $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]2\text{H}_2\text{O}$ como doador do óxido nítrico, ferrocianeto de

sódio $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ como compensador e água deionizada (controle). As sementes foram colocadas em bandejas com areia lavada, autoclavada e seca em estufa de 70 °C contendo concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 e 200 μM) e água deionizada (controle) a 60% da capacidade de campo, com fotoperíodo de oito horas (8 horas de luz e 16 horas de escuro) e temperatura de 25 ± 2 °C (RAS) permanecendo por 7 dias.

Os tratamentos consistiram em (água deionizada, NPS (0 μM) + FCS (150 μM), NPS (75 μM) + FCS (75 μM) e NPS (150 μM) + FCS (0 μM) com as 3 concentrações de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 100 e 200 μM). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, perfazendo 12 tratamentos com 8 repetições, totalizando 96 bandejas contendo 25 sementes por repetição. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey com 5% de probabilidade no programa SISVAR.

Após 7 dias as plântulas com 0 μM de Cu apresentavam-se com média de comprimento total de 28,07 cm, as do tratamento com 100 μM de Cu apresentavam-se com médias de 6,29 cm e as plântulas do tratamento com 200 μM de Cu apresentavam-se com médias de 4,58 cm onde foram retiradas e a determinação da massa seca da parte aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSR), foi realizada pelo método de estufa de ar forçado a 70 °C até atingir peso constante (Nakagawa, 1999). Após a pesagem, a matéria seca foi moída e armazenada em tubos de Falcon para, posteriormente, serem levadas para o Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) para análise dos teores de cobre e de micro e macronutrientes catiônicos nas raízes e parte aéreas das plântulas.

4.2.3 Variáveis nutricionais

As análises de macro e micronutrientes magnésio (Mg), cálcio (Ca), ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) foram determinados descrita por Miyazawa et al. (2009). Foi pesado 500 mg do material triturado, transferido para um tubo digestor, adicionados 8 mL de solução $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (3:1) e deixado a temperatura ambiente durante a noite em bloco digestor. Posteriormente, elevou-se a temperatura do bloco digestor para 120 °C até o total desprendimento do vapor castanho e depois a 200 °C até o total desprendimento do vapor branco. Deixou-se esfriar. Após a digestão, a solução do tubo foi filtrada e aferida até a marca em balão volumétrico de 25 mL com água deionizada. A composição mineral foi determinada a partir desta solução no Laboratório de Análises Químicas do Museu Paraense Emílio Goeldi utilizando-se de um espectrômetro de absorção atômica de chama da marca Thermo, modelo

ICE3000. O procedimento foi realizado em duplicata e o branco analítico foi preparado pelo mesmo método sem adição da amostra.

4.2.4 Fator de bioacumulação (FBC) e fator de translocação (FT)

O fator de bioconcentração (FBC) e o fator de translocação (FT) com as equações abaixo descritas por Wang et al. (2018).

$$FBC = C_{up} (\text{mg kg}^{-1}) / C_{usn} (\text{mg l}^{-1})$$

Onde, C_{up} representa a concentração de Cu na plântula e C_{usn} representa a concentração de Cu na solução nutritiva.

$$FT = C_{upa} (\text{mg kg}^{-1}) / C_{ur} (\text{mg kg}^{-1})$$

Onde, C_{upa} representa a concentração de Cu na parte aérea e C_{ur} representa a concentração de Cu nas raízes.

4.3 Resultados

As dosagens de NPS e FCS não atenuaram os efeitos nocivos do Cu causando toxidez nos teores de macro e micronutrientes nas raízes e partes aéreas. De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, o principal efeito do aumento da disponibilidade do Cu foi verificado nas raízes, que são os primeiros órgãos em contato com o metal.

Os tratamentos com NPS e FCS proporcionaram aumento nos teores de cobre nas raízes, verificando o maior teor de cobre nas raízes que receberam a dosagem de 200 μM de Cu independente do tratamento, verificando a maior média de 159.5 mg kg^{-1} no tratamento com NPS (150 μM) + FCS (0 μM) perfazendo um aumento de 7.787.2% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 2,0 mg kg^{-1} . Em relação ao teor de cobre na parte aérea verificou-se a maior média de 15.3 mg kg^{-1} nas plântulas que receberam a dosagem de 200 μM de Cu no tratamento com NPS (75 μM) + FCS (75 μM) perfazendo um aumento de 1562.7% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 0.9 mg kg^{-1} (Tabelas 9 e 10).

Os tratamentos com NPS e FCS não amenizaram os efeitos tóxicos do Cu que

proporcionou aumento nos teores de cálcio nas raízes. O maior teor de cálcio foi verificado nas raízes que receberam a dosagem de 100 μM de Cu, verificando a maior média de 216.7 mg kg^{-1} no tratamento com NPS (75 μM) + FCS (75 μM) perfazendo um aumento de 493.0% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 36.5 mg kg^{-1} . Os tratamentos aumentaram os teores de cálcio nas partes aéreas. A maior média de 218.9 mg kg^{-1} foi verificada nas plântulas que receberam a dosagem de 0 μM de Cu no tratamento com NPS (0 μM) + FCS (150 μM) perfazendo um aumento de 61.8% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 135.3 mg kg^{-1} (Tabelas 9 e 10).

Os tratamentos com NPS e FCS não atenuaram a toxidez do cobre, que proporcionou aumento nos teores de magnésio nas raízes. Os tratamentos com NPS (75 μM) e NPS (0 μM) proporcionaram incremento nos teores de magnésio nas raízes e partes aéreas. As raízes que receberam a dosagem de 200 μM de Cu apresentaram a maior média de 515.3 mg kg^{-1} no tratamento com NPS (75 μM) + FCS (75 μM) perfazendo um aumento de 275.1% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 137.4 mg kg^{-1} . Em relação ao teor de magnésio na parte aérea verificou-se a maior média de 464.1 mg kg^{-1} nas plântulas que receberam a dosagem de 0 μM de Cu no tratamento com NPS (75 μM) + FCS (75 μM) perfazendo um aumento de 26.9% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 365.8 mg kg^{-1} (Tabelas 9 e 10).

Os tratamentos com NPS e FCS não amenizaram os efeitos do Cu verificando aumento nos teores de zinco nas raízes. Os tratamentos com NPS (0 μM) e NPS (150 μM) proporcionaram incremento nos teores de zinco nas raízes. Nas raízes que receberam a dosagem de 200 μM de Cu observaram-se maiores teores de zinco, verificando a maior média de 38.0 mg kg^{-1} no tratamento com água deionizada perfazendo um aumento de 131% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 16.5 mg kg^{-1} . Os tratamentos proporcionaram um aumento nos teores de zinco nas partes aéreas. A maior média de 42.2 mg kg^{-1} foi observada nas plântulas que receberam a dosagem de 0 μM de Cu no tratamento com NPS (75 μM) + FCS (75 μM) perfazendo um aumento de 26,5% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 33,4 mg kg^{-1} (Tabelas 9 e 10).

Os tratamentos com NPS e FCS não amenizaram a toxicidade do Cu, que causou redução nos teores de ferro nas raízes. Os maiores teores de ferro nas raízes foram encontrados nas plantas controle e nas que receberam NPS (0 μM). Os tratamentos proporcionaram um aumento nos teores de ferro nas partes aéreas. Os menores teores de ferro foram verificados nas raízes e partes aéreas das plântulas que receberam a dosagem de 100 μM de Cu, observando as menores médias de 109.0 mg kg^{-1} e 71.7 mg kg^{-1} , no tratamento

com NPS (0 μM) + FCS (150 μM) perfazendo uma redução de 81.1% e 9.4% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 576.4 mg kg^{-1} e 79.1 mg kg^{-1} nas raízes e partes aéreas, respectivamente (Tabelas 9 e 10).

Os tratamentos com NPS e FCS não atenuaram os efeitos tóxicos do Cu que diminuiu os teores de manganês nas raízes. Os tratamentos NPS (75 μM) e NPS (150 μM) proporcionaram redução nos teores de manganês sendo que, os menores teores de manganês foram encontrados nas raízes que receberam a dosagem de 100 μM de Cu, verificando a menor média de 2.8 mg kg^{-1} nos tratamentos com água deionizada e NPS (0 μM) + FCS (150 μM) perfazendo uma redução de 61.2% quando comparado ao tratamento controle que apresentou média de 7.2 mg kg^{-1} (Tabela 9). O teor de manganês na parte aérea não apresentou um limite detectável na análise nutricional.

As maiores médias do fator de bioacumulação-FBC foram 13.44 e 12.55 verificadas nas raízes das plântulas dos tratamentos NPS (75 μM) + FCS (75 μM) com 100 μM de Cu e NPS (150 μM) + FCS (0 μM) com 200 μM de Cu, respectivamente (Tabela 11). Em relação à parte aérea verificou-se menor média de 0,65 no tratamento com água deionizada com 100 μM de Cu. Observando maior fator de translocação-FT de 0.4809 no tratamento NPS (150 μM) + FCS (0 μM) com 0 μM de Cu (Tabela 12).

Tabela 9 – Teores de nutrientes nas raízes de plântulas de milho (*Zea mays* L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Cu	Mg	Ca	Mn	Cu	Zn	Fe
	(μM)	(mg kg ⁻¹)					
Água	0	137.4 ± 4.3 Cc	36.5 ± 1.0 Cb	7.2 ± 0.2 Aa	2.0 ± 0.2 Cc	16.5 ± 0.5 Bb	576.4 ± 26.6 Aa
	100	366.6 ± 18.3 Bb	86.7 ± 3.4 Ba	2.8 ± 0.3 Bb	71.6 ± 1.0 Cb	30.6 ± 2.0 Aa	131.8 ± 5.4 Ab
	200	467.6 ± 26.5 Aba	84.9 ± 11.9 Ba	3.1 ± 0.4 Ab	144.0 ± 0.7 ABa	38.0 ± 3.9 Aa	113.1 ± 2.5 Ac
NPS (0 μM) + FCS (150 μM)	0	190.3 ± 10.1 Bc	59.4 ± 5.1 Bc	7.5 ± 0.5 Aa	4.1 ± 0.1 Bc	21.8 ± 0.6 Ab	493.0 ± 25.9 ABa
	100	398.2 ± 8.5 Abb	74.8 ± 5.1 Bb	2.8 ± 0.6 Bb	83.0 ± 1.6 ABb	29.2 ± 2.5 Aa	109.0 ± 5.3 Bb
	200	487.8 ± 3.9 Aba	151.7 ± 11.4 Aa	1.5 ± 0.2 Bc	139.4 ± 7.2 Ba	24.9 ± 0.8 Cab	115.7 ± 3.1 Ab
NPS (75 μM) + FCS (75 μM)	0	250.1 ± 3.3 Ab	134.7 ± 4.9 Ab	4.8 ± 0.4 Ba	5.5 ± 0.2 Ac	17.6 ± 0.7 Bb	437.9 ± 24.6 Ba
	100	456.4 ± 22.1 Aa	216.7 ± 16.7 Aa	4.3 ± 0.2 Aa	85.4 ± 1.9 Ab	29.0 ± 1.2 Aa	142.2 ± 6.5 Ab
	200	515.3 ± 22.4 Aa	165.9 ± 3.3 Ab	4.1 ± 0.3 Aa	139.6 ± 4.4 ABa	28.8 ± 0.8 Bca	120.8 ± 1.7 Ac
NPS (150 μM) + FCS (0 μM)	0	146.4 ± 6.4 Cc	66.3 ± 0.8 Ba	3.3 ± 0.1 Ca	5.1 ± 0.1 Ac	20.3 ± 0.4 Abc	323.8 ± 5.5 Ca
	100	347.6 ± 27.2 Bb	71.2 ± 1.6 Ba	3.7 ± 0.3 Aba	76.2 ± 3.9 BCb	24.6 ± 0.8 Ab	152.6 ± 10.0 Ab
	200	442.8 ± 10.6 Ba	82.7 ± 3.7 Ba	4.3 ± 0.2 Aa	159.5 ± 4.2 Aa	35.1 ± 4.1 Aba	126.6 ± 2.4 Ac

Colunas com letras maiúsculas diferentes entre tratamentos (água, NPS (0 μM) + FCS (150 μM), NPS (75 μM) + FCS (75 μM), NPS (150 μM) + FCS (0 μM) sob mesma concentração de cobre) e letras minúsculas entre as concentrações de cobre (0, 100 e 200 μM sob mesmo tratamento) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de cinco repetições e DP

Tabela 10 – Teores de nutrientes na parte aérea de plântulas de milho (*Zea mays* L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Cu	Mg	Ca	Cu	Zn	Fe
	(μM)	(mg kg ⁻¹)				
Água	0	365.8 ± 1.7 Ca	135.3 ± 22.9 Ba	0.9 ± 0.3 Bc	33.4 ± 1.8 Ba	79.1 ± 1.5 Ca
	100	262.6 ± 1.8 Bb	69.3 ± 5.6 Ab	4.1 ± 0.1 Bb	31.4 ± 0.9 Ba	80.6 ± 1.3 Ca
	200	359.9 ± 11.2 Aa	116.9 ± 6.6 Ba	11.4 ± 0.4 ABa	35.9 ± 0.8 Aa	75.1 ± 0.6 Ba
NPS (0 μM) + FCS (150 μM)	0	414.2 ± 10.9 Ba	218.9 ± 11.0 Aa	0.7 ± 0.1 Bc	38.1 ± 1.2 Aba	97.9 ± 1.7 Ba
	100	355.8 ± 4.3 Ab	74.5 ± 9.0 Ab	5.8 ± 0.2 Ab	31.4 ± 2.1 Bb	71.7 ± 1.0 Db
	200	306.6 ± 3.6 Bc	186.5 ± 26.3 Aa	10.5 ± 0.8 Ba	33.6 ± 1.7 Abab	77.9 ± 3.4 Bb
NPS (75 μM) + FCS (75 μM)	0	464.1 ± 6.8 Aa	189.0 ± 4.8 Aa	1.1 ± 0.2 Bc	42.2 ± 1.8 Aa	100.9 ± 0.5 Ba
	100	284.9 ± 6.7 Bb	28.7 ± 9.7 Bc	5.5 ± 0.1 Ab	40.3 ± 3.9 Aa	89.1 ± 1.3 Bb
	200	245.4 ± 13.6 Cc	72.8 ± 6.4 Cb	15.3 ± 1.3 Aa	29.7 ± 1.1 Bb	88.3 ± 2.8 Ab
NPS (150 μM) + FCS (0 μM)	0	377.9 ± 6.0 Ca	170.9 ± 2.4 ABa	2.3 ± 0.3 Ac	43.4 ± 1.5 Aa	114.9 ± 1.9 Aa
	100	265.6 ± 3.0 Bc	107.6 ± 2.9 Ab	5.0 ± 0.2 ABb	33.7 ± 0.3 Abb	108.5 ± 5.1 Aa
	200	300.1 ± 11.2 Bb	34.6 ± 1.4 Dc	10.1 ± 0.7 Ba	30.3 ± 0.6 Abb	92.4 ± 1.4 Ab

Colunas com letras maiúsculas diferentes entre tratamentos (água, NPS (0 μM) + FCS (150 μM), NPS (75 μM) + FCS (75 μM), NPS (150 μM) + FCS (0 μM) sob mesma concentração de cobre) e letras minúsculas entre as concentrações de cobre (0, 100 e 200 μM sob mesmo tratamento) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de cinco repetições e DP

Tabela 11 – Fator de bioacumulação (FBC) de plântulas de milho (*Zea mays* L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Cu		FBC	
	(μM)	Parte aérea	Raiz	
Água	100	0.65 ± 0.01 Bb	11.27 ± 0.16 Ca	
	200	0.90 ± 0.03 Aa	11.33 ± 0.06 ABa	
NPS (0 μM) + FCS (150 μM)	100	0.91 ± 0.03 Aa	13.06 ± 0.25 ABa	
	200	0.82 ± 0.06 Aa	10.97 ± 0.57 Bb	
NPS (75 μM) + FCS (75 μM)	100	0.87 ± 0.01 Aa	13.44 ± 0.30 Aa	
	200	1.20 ± 0.10 Aa	10.98 ± 0.35 Bb	
NPS (150 μM) + FCS (0 μM)	100	0.79 ± 0.03 Aba	11.99 ± 0.61 BCa	
	200	0.84 ± 0.05 Aa	12.55 ± 0.33 Aa	

Colunas com letras maiúsculas diferentes entre tratamentos (água, NPS (0 μM) + FCS (150 μM), NPS (75 μM) + FCS (75 μM), NPS (150 μM) + FCS (0 μM) sob mesma concentração de cobre) e letras minúsculas entre as concentrações de cobre (100 e 200 μM sob mesmo tratamento) indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de cinco repetições e DP

Tabela 12 – Fator de translocação (FT) de plântulas de milho (*Zea mays* L.) tratadas com nitroprussiato de sódio e ferrocianeto de sódio submetidas à toxicidade por cobre.

Tratamento	Cu (μM)		
	0	100	200
	FT		
Água	0.4552 ± 0.2128 ABa	0.0571 ± 0.0004 Ab	0.0820 ± 0.0012 Abb
NPS (0 μM) + FCS (150 μM)	0.1804 ± 0.0117 ABa	0.0732 ± 0.0006 Ab	0.0756 ± 0.0060 Bb
NPS (75 μM) + FCS (75 μM)	0.2046 ± 0.0469 Ba	0.0649 ± 0.0023 Ac	0.1105 ± 0.0120 Ab
NPS (150 μM) + FCS (0 μM)	0.4809 ± 0.0695 Aa	0.0686 ± 0.0063 Ab	0.0640 ± 0.0059 Bb

Letras maiúsculas diferentes na coluna e letras minúsculas diferentes na linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores descritos correspondem às médias de cinco repetições e DP

4.4 Discussão

O fitato é uma molécula que possui extrema afinidade em quelar componentes de carga positiva como nutrientes minerais divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} e Cu^{2+}), elementos traço, proteínas e carboidratos (Kumar et al., 2016). O aumento nos teores dos minerais Ca^{2+} ,

Mg^{2+} , Zn^{2+} nas raízes dos tratamentos com Cu, verificados neste trabalho, podem ser devido que durante a germinação ocorrem aumento da atividade das fitases e reduções nos teores de ácido fítico (Ribeiro et al., 1999), aumentando a biodisponibilidade de vários minerais durante a germinação (Sangronis et al., 2007).

O Cu induz mudanças nas propriedades da membrana e função de transportadores e canais iônicos (Cambrollé et al., 2015), podendo ser responsável pelos desequilíbrios nas concentrações de nutrientes (Cambrollé et al., 2013). O Cu apresenta maior afinidade por ligantes duros presentes nas raízes (Kopittke et al., 2014), as paredes celulares possuem uma forte capacidade de acumular cátions metálicos (Chandra & Kumar, 2017), sendo como barreiras eficientes na translocação da maioria dos metais (Wang et al.; 2013).

O excesso de cobre pode perturbar a mobilização de nutrientes, afetando as amilases (Kranner et al., 2011) atividade proteolítica e inibição da transferência de nutrientes de cotilédones para o embrião (Karmous et al., 2012), inativação de enzimas armazenadas e inibição da síntese de novas enzimas (Kukkola et al., 1998), o transporte de elétrons e o metabolismo primário da semente (Williams, 2015).

Na membrana plasmática (MP) localizam-se as H^+ -ATPases do tipo P, as quais acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de H^+ para fora da célula (do citoplasma para o apoplasto), tendo seu papel fisiológico associado a nutrição e expansão celular (Duby & Boutry, 2009). As plantas têm uma complexa rede de transportadores envolvidos no equilíbrio intracelular a fim de evitar o acúmulo de Cu, outros tipos de transportadores de Cu, são as ATPases tipo P de metais pesados (Yruela, 2009).

Zancheta et al. (2011) pesquisando fitoextração de cobre por milho (*Pennisetum glaucum* cv. BRS 1501), sorgo (*Sorghum bicolor* cv. Vassoura) afirmam que o Cu foi acumulado preferencialmente no sistema radicular e, portanto, translocado em baixa proporção para a parte aérea.

O comprimento radicular é parâmetro importante para a avaliação do efeito do metal, pois, a radícula é o primeiro órgão da plântula que entra em contato com a solução contaminada (Feng et al., 2016), perturbando o alongamento da raiz, impedindo a redistribuição de auxina (Yuan et al., 2013), ou por escassez de nutrientes para o embrião devido à baixa mobilização de reservas dos cotilédones (Karmous et al., 2012).

O cianeto tem capacidade de gerar um potencial elétrico ao inibir o transporte iônico eletrogênico (Cardoso et al., 2013), sendo responsável pela inibição de vários processos metabólicos, sendo o seu efeito tóxico mais notado a nível da inibição da enzima terminal da cadeia respiratória (Garcia et al., 2004).

O papel direto do NO nas enzimas hidrolíticas foi demonstrado em trigo, observando um aumento de atividade da β -amilase (Zhang et al., 2005), o NO auxilia no desenvolvimento de raízes laterais e raízes adventícias (Molina-Favero, 2008), sua regulação as respostas aos estresses depende de sua concentração (Mur et al. 2012), seus efeitos dependem de alterações químicas nas proteínas (Fungillo et al., 2014), agindo por interações celulares por meio de óxido-redução onde em condições biológicas e, na presença de O_2 , o radical óxido nítrico

(NO[•]) é susceptível à oxidação e à redução, podendo ser transformado em outras espécies reativas de nitrogênio, como por exemplo, a redução de um elétron do radical NO[•] que dá origem ao ânion nitroxil NO⁻, cuja meia-vida é curta, pois reage rapidamente com o O_2 , dando origem ao peroxinitrito (ONOO⁻)(Kotapati et al., 2017).

O NO atua em interferência com íons de cálcio (Ca^{2+}) para formar uma rede de sinalização complexa em resposta a estresses abióticos (Gohari et al., 2020). Em altas concentrações, o Cu leva à ativação dos canais de influxo de Ca^{2+} ativando, assim, a morte celular programada, inibindo o alongamento da raiz (Rodrigo-Moreno et al., 2013). Uma resposta fisiológica das plantas ao estresse é aumento nas concentrações de Ca no citoplasma (Epstein & Bloom, 2006), estando envolvido na regulação dos processos fisiológicos da planta e na adaptação ao estresse (Hasanuzzaman et al., 2018), o Ca^{2+} também promove o acúmulo de solutos orgânicos, como a prolina (Colmer et al., 1996).

Benites (2012) explica que o Mg^{+2} tem forte influência sobre o enchimento dos grãos, tem papel fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Wiend, 2007), essencial para a síntese das clorofilas (Benites et al., 2015). De acordo com Bucker-Neto et al (2017), sob condições de estresse de metais pesados, as plantas mostram um rápido aumento na produção de etileno e reduzem o crescimento e desenvolvimento da planta. Parece haver uma correlação positiva entre NO e etileno, onde o NO estimula a síntese de etileno e vice-versa (Zhu et al., 2017), *aumentando* os níveis de auxina em raízes afetando o transporte de Mg^{+2} (Liu et al., 2018).

Segundo Ozturk et al. (2006) verificaram após o início da germinação das sementes de milho, foram encontrados teores elevados de Zn na raiz e no coleóptilo (200 mg kg^{-1}), o que aponta para uma grande remobilização deste elemento nesta fase. Iwai et al. (2012), verificaram em sementes de arroz que uma parte do Zn estava ligado ao ácido fitico e também podem ser encontrados ácidos orgânicos, tais como malato ou citrato (Shahzad et al., 2014). Verificaram elevado acúmulo do Zn em tecidos meristemáticos de plântulas de trigo (Ozturk et al., 2006), o NO tem a capacidade de reduzir o acúmulo de Zn (Buet et al., 2014), resultado diferentes foram verificados neste trabalho.

Foi verificada uma correlação entre a inibição do crescimento radicular e a concentração de Fe nas raízes, o crescimento em um substrato com um nível de Cu tóxico está comumente ligado a uma diminuição do teor de Fe nas raízes e folhas, devido o Fe ser substituído pelo Cu (Festa & Thiele, 2011).

O acúmulo de NO em *Arabidopsis* levou à liberação de Fe das paredes celulares e aumentando os níveis de Fe disponível (Zhu et al., 2018), o NO desempenha um papel importante na homeostase interna de Fe (Simontacchi et al., 2012). A presença de complexos de baixo peso molecular entre Fe e NO em plantas pode influenciar a disponibilidade e entrega interna de Fe (Buet, 2015).

Marschner (2012) afirma que os íons podem competir diretamente pelo transporte, sendo que essa competição é influenciada pelas propriedades do transporte e pela diferença na concentração dos íons na solução, sendo assim, podemos inferir que o aumento da concentração de Cu levou à redução do teor de Fe e Mn nas plântulas, portanto, estabelecendo relação antagônica entre esses nutrientes.

4.3.1 Fator de bioacumulação (FBC) e Fator de translocação (FT)

Quanto maior o FBC mais forte é o acúmulo de metais pesados na planta. Quanto maior o FT mais a planta poderia transportar metais pesados para as partes superiores da planta (Wang, 2013). O fator de translocação (FT) indica a capacidade de uma planta de translocar ou transferir metais de suas raízes para sua parte aérea. Zvobgo et al. (2018), o FT é classificado em: baixo ($FT < 0.01$), moderadamente baixo ($0.01 \leq FT < 0.10$), alto ($0.10 \leq FT < 0.50$) e muito alto ($FT \geq 0.50$). O valor de FT menor que 1, indica que o metal foi acumulado nas raízes das plantas e valores maiores de FT indicam translocação do metal para a parte aérea da planta (Esringü et al., 2014).

Quando as plantas são estressadas por metais pesados, elas têm a capacidade de regular ativamente a concentração desses elementos (Fernández et al., 2017). O efeito negativo da toxicidade do Cu é, principalmente, no crescimento e na morfologia das raízes, onde o Cu é absorvido e acumulado nas raízes (Rehman et al., 2019), o Cu está fortemente ligado às paredes celulares das raízes (Kabata-Pendias, 2011), e a sua translocação para a parte aérea é impedida (Rui et al., 2015).

4.5 Conclusão

Houve maior acúmulo de Cu nas raízes verificando que a aplicação de NO na forma de NPS não atenuou a toxicidade de Cu em relação aos teores de nutrientes nas plântulas de milho em crescimento inicial.

As dosagens de NPS e FCS causaram toxidez nas plântulas de milho alterando o equilíbrio mineral e a mobilização dos teores de nutrientes das raízes para as partes aéreas.

Agradecimentos

Agradecemos a Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos, a UFRA - Universidade Federal Rural da Amazônia, ao grupo de Estudos de Biodiversidade em Plantas Superiores- EBPS e ao Museu Paraense Emílio Goeldi pelas análises nutricionais.

REFERÊNCIAS

- Asati, A., Pichhode, M., & Nikhil, K. (2016). Efeito dos metais pesados nas plantas: uma visão geral. *International Journal of Innovation Management*, 3, 56–66.
- Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M.A. (2013) Phytoremediation of heavy metals- Concepts and application. *Chemosphere*, v. 91, p. 869-881.
- Ameh, C.M. S. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 71, 103-220.
- Benites, V.M. Magnésio: o elemento esquecido nas adubações. In: *Workshop Centro Tecnológico COMIGO*, 11, 2012, Rio Verde. Anais...Rio Verde: COMIGO, 2012. p.11-12.
- Benites, V.M., Caetano, J.O. & Guimarães, G.S. (2015). Relatório técnico do projeto de cooperação técnico-financeira Embrapa/Ibar: potencial agrícola do óxido de magnésio e do gesso agrícola no sistema soja-milho em solos oxídicos do sudoeste goiano. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. Embrapa Solos. Rio de Janeiro. pp. 41
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., & Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3. ed. New York: Springer.
- Bücker-Neto, L., Paiva, A.L.S., Machado, R.D., Rafael, A.R.A. & Margis-Pinheiro, M. (2017). Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genetics and Molecular Biology*, 40, 373–386.
- Buet, A., Moriconi, JI, Santa-María, G.E. & Simontacchi, M. (2014). Uma fonte exógena de óxido nítrico modula o estado nutricional do zinco em plantas de trigo. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 337–345.
- Buet, A., & Simontacchi, M. (2015). Nitric oxide and plant iron homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 39-46. doi: 10.1111 / nyas.12644
- Cambrollé, J., García, J.L., Figueroa, M.E. & Cantos, M. (2015). Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. *Chemosphere* 120, 171–178.
- Cambrollé, J., Mancilla-Leytón, J. M., Muñoz-Valles, S., Figueroaluque, E., Luque, t. & Figueroa, M. E. (2013). Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 50-57.
- Cardoso, C. A. (2013). *Demonstração de atividade bioelétrica em capim Marandu (Brachiaria brizantha cv. Marandu)* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
- Chandra, R. & Kumar, V. (2017). Fitoextração de metais pesados por plantas nativas em potencial e sua observação microscópica do crescimento de raízes em lodo de destilaria estabilizado como uma ferramenta prospectiva para fitorremediação in situ de resíduos industriais. *Environmental Science and Pollution Research.*, 24, 1 – 15.

Chaves, L. H. G., França, E.F.M., Araújo, P.L. & França, C.P. (2010). Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. *Revista Ciência Agronômica*, 41.

Colmer, T.D., Fan, T.W.M., Higashi, R.M. & Läuchli, A. (1996). Interactive effects of Ca²⁺ and NaCl stress on the ionic relations and proline accumulation in the primary root tip of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiology*, 97, 421-424.

Cunha, C. S. M. (2017) *Metais pesados em solos, plantas e qualidade da água em área de mineração fósforo-uranífera* (Tese de Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Ceará.

De Marco, R., Silva, R. F., Scheid, D. L., Ros, C.O. & Silva, V. R. (2017). Alteração de Orgânicos e *Eucalyptus grandis* para Fitoestabilização em Solo Contaminado com Cobre. *Floresta e Ambiente*, 24, 1-9.

Del Río, L.A. (2015). ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2827-2837.

Duby, G. & Boutry, M. (2009). The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 457, 645-655.

Esringü, A., Turan, M., Güneş, A., Karaman, M. R. (2014). Roles of *Bacillus megaterium* in remediation of boron, lead, and cadmium from contaminated soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45, 1741- 1759.

Epstein, E. & Bloom, A.J. (2006). *Nutrição Mineral de Plantas: princípios e perspectivas*. 3 ed. Londrina, Planta. p.403.

Feng, R., Liao, G., Guo, J., Wang, R., Xu, Y., Ding, Y., Mo, L., Fan, Z. & Li, N. (2016). Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. *Environmental and Experimental Botany*, 122, 29-38.

Fernández, O.E., Bacchettab, G., Lallenac, A.M., Navarrod, F.B., Ortiza, I. & Jiménez, M.N. (2017). Uso de procedimentos de extração sequencial BCR para solos e previsões de transferência de metais de plantas em rejeitos de minas contaminados na Sardenha. *Journal of Geochemical Exploration*, 172, 133 – 141.

Festa, R.A. & Thiele, D.J. (2011). Cobre: um metal essencial na biologia. *Current Biology*, 21, R877 – R883. doi: 10.1016 / j.cub.2011.09.040.

Fritsche-Neto, R., & Borém, A. (2015). *Phenomics How Next-Generation Phenotyping is Revolutionizing Plant Breeding*. Switzerland: Springer Press.

Fungillo, L.; Skelly, M. J., Loake, G. J., Spoel, S. H., & Salgado, I. (2014). S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications*, 5(1), 5401.

- Gracia, R., & Shepherd, G. (2004). Envenenamento por cianeto e seu tratamento. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 24 (10), 1358-1365.
- GohariG, Z., Alavi, E., Esfandiari, S., Panahirad, S., & Hajihoseinlou, V. (2020). Fotopoulos interaction between hydrogen peroxide and sodium nitroprusside following chemical priming of *Ocimum basilicum* L. against salt stress. *Physiologia Plantarum*, 168, 361-373.
- Hasanuzzaman, M.H., Oku, K., Nahar, M.H.M.B., Bhuyan, J. Al M. & Baluska, M. F. (2018). Nitric oxide-induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnol*, 12, 77-92.
- Iwai, T., Takahashi, M., Oda, K., Terada, Y. & Yoshida, K.T. (2012). Dynamic changes in the distribution of minerals in relation to phytic acid accumulation during rice seed development. *Plant Physiology*, 160, 2007-2014.
- Kabata-Pendias A. (2011). *Trace elements in soils and plants*. 4. ed. Boca Raton: CRC Press.
- Karmous, J., Khadija, A. & Chaoui, E. El Ferjani. (2012). Atividades proteolíticas em cotilédones de *Phaseolus vulgaris* sob estresse de cobre. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18, 337 – 343.
- Kranner, L. C. (2011). Metais e sementes: implicações bioquímicas e moleculares e seu significado para a germinação de sementes. *Botânica Ambiental e Experimental*, 72, 93 – 10.
- Kopittke, P. M., Menzies, N. W., Wang, P., Mckenna, B. A., Wehr, J. B., Lombi, E., Kinraide, T. B. & Blamey, F. P. (2014). The rhizotoxicity of metal cations is related to their strength of binding to hard ligands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33, 268-277.
- Kong, I. C. (2013). Joint effects of heavy metal binary mixtures on seed germination, root and shoot growth, bacterial bioluminescence, and gene mutation. *Journal of Environmental Sciences*, 25, 889–894.
- Ko, K.S., Lee, P.K. & Kong, I.C. (2012) Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 1343–1350.
- Kukkola, S. H. (1998). Observações estruturais em agulhas expostas a níveis elevados de cobre e níquel. *Chemosphere*, 36, 727 – 732.
- Kumar, A., Chanderman, A., Makolomakwa, M., Perumal, K. & Singh, S. (2016). Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46, 556-591.
- Liu, M., Zhang, H., Fang, X., Zhang, Y. & Jin, C. (2018). Auxin acts downstream of ethylene and nitric oxide to regulate magnesium deficiency-induced root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, 59, 1452–1465.

Lopes, M. J. S., Dias Filho, M. B., Castro, T. H. R., & Silva, G. B. (2018). Light and plant growth promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. *GrassandForageScience*, 73(2),493-499. <https://doi.org/10.1111/gfs.12336>

Marques, D.M., Silva, A.B., Mantovani, J.R., Pereira, D.S. & Souza T.C. (2018). Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. *Revista Árvore*, 42, 67-62.

Marschner, P. (2012). *Mineral nutrition of higher plants*. 3ª ed. Austrália: Elsevier, 651 p.

Mikula, K., Izydorczyk, G., Skrzypczak, D., Mironiuk, M., Moustakas, K., Witek-Krowiak, A. & Chojnacka, K. (2020). Controlled release micronutrient fertilizers for precision agriculture: a review. *Science of The Total Environment, Amsterdam*, 712, 136-365.

Miyazawa, M., Pavan, M. A., Muraoka, T., Carmo, C. A. F. S. & Melo, W. J. (2009). *Análise química de tecido vegetal*. In: Silva, F. C. (ed.). Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília: Embrapa informação tecnológica, Cap.1, p.193-233.

Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S. & Lamattina, L. (2008). Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasiliense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *APS Journals*, 21, 1001-1009.

Mur, L.A.J., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G. V, & Gupta, K.J. (2012). Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 5, 1–17. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls052>.

Nadeem, M., Mollier, A., Morel, C., Vives, A., Prud'homme, L. & Pellerin, S. (2012). Maize (*Zea mays* L.) endogenous seed phosphorus remobilization is not influenced by exogenous phosphorus availability during germination and early growth stages. *Plant and Soil*, 357, 13-24.

Nakagawa, J. (1999). Testes de vigor baseados na avaliação de plântulas. In: Krzyzanowski FC, Vieira RD, França-Neto JB (ed.) *Vigor de sementes: conceitos e testes*, Londrina: ABRATES, p. 2:1- 2:21.

Nazir et al., (2019). Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress. *Chemosphere*, 230, 544-558

Nunes, José Luis da Silva. *Milho*. Disponível em:https://www.agrolink.com.br/culturas/milho/informacoes/importancia_361402.html. Acesso em: 01 nov. 2018.

Ozturk, L., Yazici, M.A., Yucel, C., Torun, A., Cekic, C., Bagci, A., Ozkan, H., Braun, H.J., Sayers, Z. & Cakmak, I. (2006). Concentration and localization of zinc during seed development and germination in wheat. *Physiologia Plantarum*, 128, 144-152.

- Rehman, M., Liu, L., Wang, Q., Saleem, M. H., Bashir S., Ullah, S. & Peng, D. (2019). Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. *Environmental science and pollution research international*, 26, 18003-18016.
- Ribeiro, M.L.L., Ida, E.I. & Oliveira, M.C.N. (1999). Efeito da germinação de soja CV. BR-13 e Paraná sobre ácido fítico, fósforo total e inibidores de tripsina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília*, 34, 31-36.
- Rodrigo-Moreno, A., Andrés-Colás, N., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Peñarrubia, L., & Shabala, S. (2013). Os transportadores de membrana plasmática permeáveis ao cálcio e ao potássio são ativados pelo cobre nas pontas das raízes de *Arabidopsis* : ligando o transporte de cobre à produção de radical hidroxila citosólica. *Plant Cell Environ*, 36, 844–855. doi: 10.1111 / pce.12020.
- Rui, H., Chen, C., Zhang, X., Zhang, F., & Shen, Z. (2015). Cd-induced oxidative stress and lignification in the roots of two *Vicia sativa* L. varieties with different Cd tolerances. *Journal of Hazardous Materials*, 15, 30045-30050.
- Sangronis, E. & Machado, C. J. (2007). Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *Food Science and Technology*, 40, 116-120.
- Shaek, S. S., Carciofi, M., Martens, H. J., Hebelstrup H. K. & Blennow, A. (2014). Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. *Journal of Experimental Botany*, 65, 2257– 2270.
- Shahzad, Z., Rouached, H. & Rakha, A. (2014). Combating mineral malnutrition through iron and zinc biofortification of cereals, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 329-346.
- Sharma, Y.K., Singh, H. & Mandal, N. (2012). *Effects of phosphorus and copper levels on yield and nutrients uptake by wheat*. Ann. Pl. Sil. Res. New Delhi.
- Simontacchi, M., Buet, A., Lamattina, L. & Puntarulo, S. (2012). Exposição a o óxido nítrico aumenta o conteúdo de complexos nitrosil-ferro nos eixos embrionários do sorgo. *Ciência Vegetal*, 183, 159–166.
- Soriano, D., Huante, P., Buen, A.G. & Orozco-Segovia, A. (2013). Seed reserve translocation and early seedling growth of eight tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. *Plant Ecology*, 214, 3161–3175.
- Thounaojam, T.C., Mazumdar, P., Panda, P., Kumar, D., Sharma, G.D., Sahoo, L. & Sanjib, P. (2014). Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice. *Plant Physiology and Biomistry*, 83.
- Kotapati, K.V., Palaka, B.K., & Ampasala, D.R. (2017). Alleviation of nickel toxicity in finger millet (*Eleusine coracana* L.) germinating seedlings by exogenous application of salicylic acid and nitric oxide. *The Crop Journal*, 5(3), 240-250.

- Wang, Q.H., Liang, X., Dong, Y.J., Xu, L.L., Zhang, X.W., Hou, J. & Fan, Z.Y. (2013). Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass. *Plant Growth Regul.*, 69, 11–20.
- Wang, W.H., Luo, X.G., Liu, L., Zhang, Y., & Zhao, H.Z. (2018). Ramie (*Boehmeria nivea*)'s uranium bioconcentration and tolerance attributes. *Journal of environmental radioactivity*, 184, 152-157.
- Wiend, T. (2007). *Palestra: Magnésio no solo e nas plantas*. Potabrasil, São Paulo, SP. Informações Agrônômicas.nº 117.
- Williams, M.E. (2015). Plant Nutrition 3: Micronutrients and metals. *The Plant Cell*, 27, 1-20.
- Xu, Y. et al. Toxicidade de sulfadiazina e cobre e sua interação com mudas de trigo (*Triticuma estivum* L.). *Ecotoxicologia e Segurança Ambiental*, v. 142, p. 250-256. 2017.
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36, 409-430.
- Yuan, H.-M., Xu, H.-H., Liu, W.-C. e Lu, Y.-T. (2013). O cobre regula o alongamento da raiz primária por meio da redistribuição de auxina mediada por PIN1. *Plant and Cell Physiology*, 54, 766–778. doi: 10.1093 / pcp / pct030.
- Zancheta, A. C. F., Abreu, C. A., Zambrosi, F. C. B., Erismann, N. M. & Lagôa, A. M. A. (2011). Fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva. *Bragantia*, 70, 737-744.
- Zhang, E.L.I. (2019). Genotypic differences and glutathione metabolism response in wheat exposed to coppe. *Environmental and Experimental Botany*, 157, 250-259.
- Zhang, H., Shen, W.B., Zhang, W. & Xu, L.L. (2005). A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta* 220, 708-716.
- Zhu, C.Q., Zhang, J.H. & Zhu, L.F. (2018). NH⁺4 facilita a reutilização do ferro nas paredes celulares do arroz (*Oryza sativa*) raízes em condições de deficiência de ferro. *Botânica Ambiental e Experimental*, 151, 21–31.
- Zhu, X.F., Zhu, C.Q., Wang, C., Dong, X.Y. & Shen, R.F. (2017). Nitric oxide acts upstream of ethylene in cell wall phosphorus reutilization in phosphorus-deficient rice. *Journal of Experimental Botany*, 68, 753–760.
- Zvobgo, G., LwalabaT, J.L.W., Sehar, S., Mapodzeke, J. M., Shamsi, I. H. & Zhang, G. (2018). The Tolerance Index and Translocation Factor were Used to Identify the Barley Genotypes with High Arsenic Stress Tolerance. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49, 50–62.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As sementes e as plântulas de milho da variedade K9606VIP3 com 7 DAS mostraram-se mais sensíveis em relação a toxicidade por Cu, verificando que as dosagens de NPS, doador do NO, não foram capazes de mitigar a toxicidade de Cu na emergência, no coeficiente de velocidade de emergência, tempo médio de emergência, comprimento total, comprimento da parte aérea, prolina na raiz e no percentual de plântulas anormais. As concentrações de cobre causaram desequilíbrio mineral influenciando negativamente os teores de nutrientes. As dosagens de NPS e FCS causaram toxidez, alterando a mobilização dos nutrientes nas plântulas em crescimento inicial. O NO promoveu aumento no comprimento da raiz, na massa seca da parte aérea e na massa seca das raízes das plântulas que não receberam concentrações de Cu, promovendo aumento no índice de velocidade de emergência no tratamento com 100 μM de Cu reduzindo o teor de prolina na parte aérea.

Verificou-se nas plantas de milho analisadas no 55º dia que as dosagens de NO e as concentrações de Cu de 60 e 200 mg kg^{-1} não influenciaram nas variáveis de trocas gasosas, o teor de clorofila medido pelo índice SPAD e as variáveis biométricas (altura, área foliar, número de folhas), observando aumento no diâmetro do colmo das plantas que receberam as concentrações de Cu.

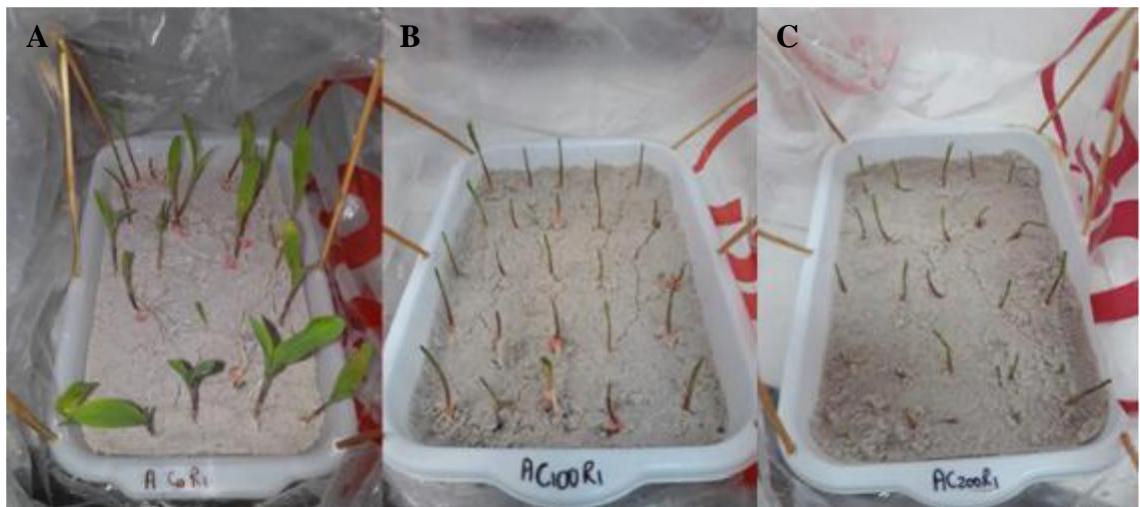
As variáveis da fluorescência da clorofila *a* demonstraram o efeito do NO presente no NPS e do cianeto presente no FCS no aumento da dissipação causada pelo processo fotoquímico onde a energia é utilizada na redução do NADP. As concentrações de 60 e 200 mg kg^{-1} de Cu não afetaram negativamente as variáveis da fluorescência da clorofila *a* atuando como um micronutriente dentro dos limites favoráveis.

ANEXO

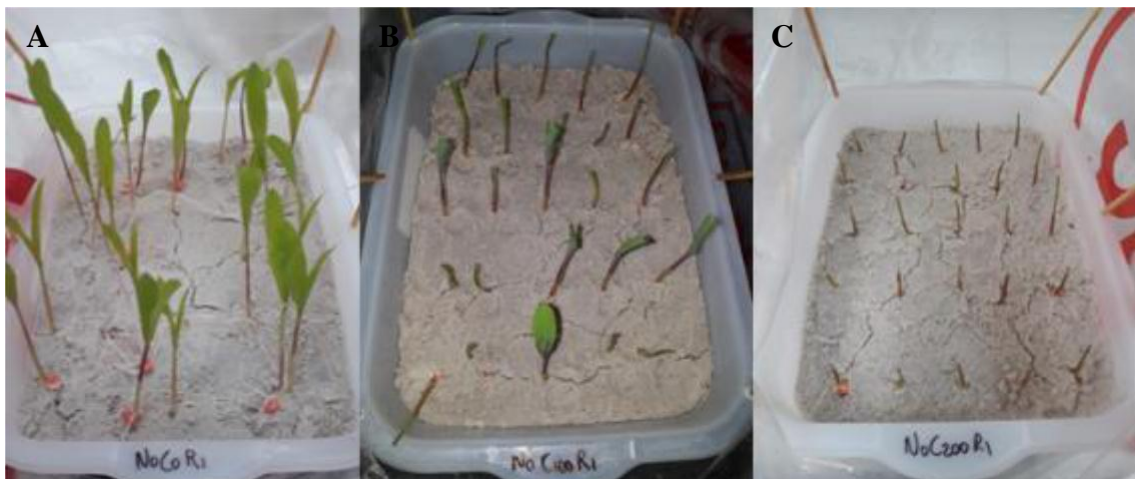
EXPERIMENTO I



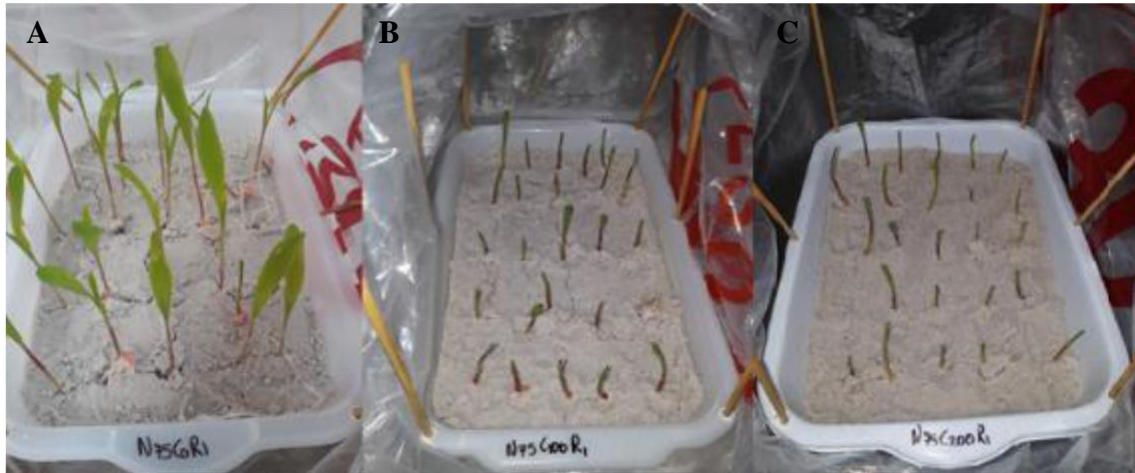
Condução do experimento no laboratório de sementes (ICA_UFRA-Campus Belém)



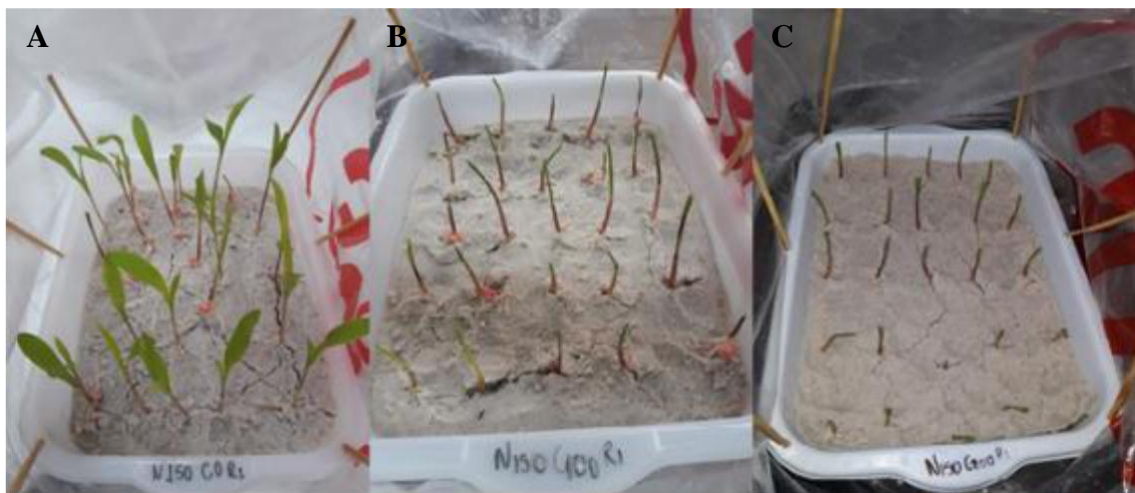
Plântulas dos tratamentos com água deionizada (A); água deionizada com $100\mu\text{M}$ de cobre (B) e água deionizada com $200\mu\text{M}$ de cobre (C)



Plântulas dos tratamentos com NPS ($0\mu\text{M}$) + FCS ($150\mu\text{M}$) com $0\mu\text{M}$ de cobre (A); NPS ($0\mu\text{M}$) + FCS ($150\mu\text{M}$) com $100\mu\text{M}$ de cobre (B) e NPS ($0\mu\text{M}$) + FCS ($150\mu\text{M}$) com $200\mu\text{M}$ de cobre (C)



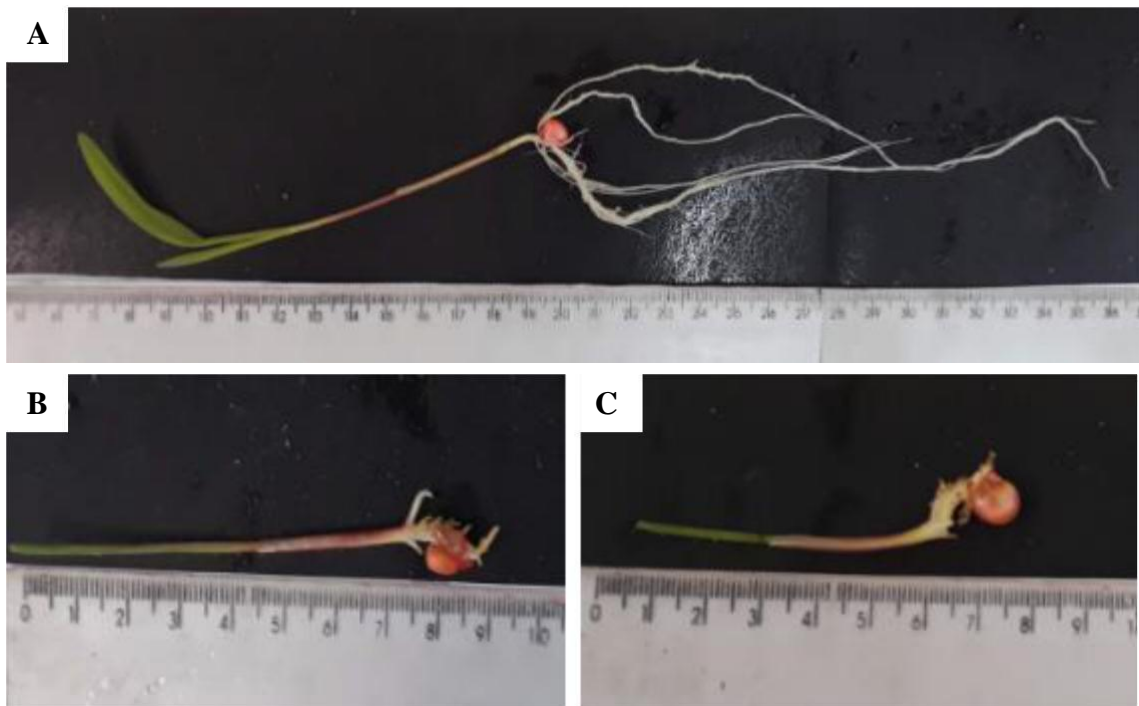
Plântulas dos tratamentos com NPS (75 μ M) + FCS (75 μ M) com 0 μ M de cobre (A); NPS (75 μ M) + FCS (75 μ M) com 100 μ M de cobre (B) e NPS (75 μ M) + FCS (75 μ M) com 200 μ M de cobre (C)



Plântulas dos tratamentos com NPS (150 μ M) + FCS (0 μ M) com 0 de cobre (A); NPS (150 μ M) + FCS (0 μ M) com 100 μ M de cobre (B) e NPS (150 μ M) + FCS (0 μ M) com 200 μ M de cobre (C)



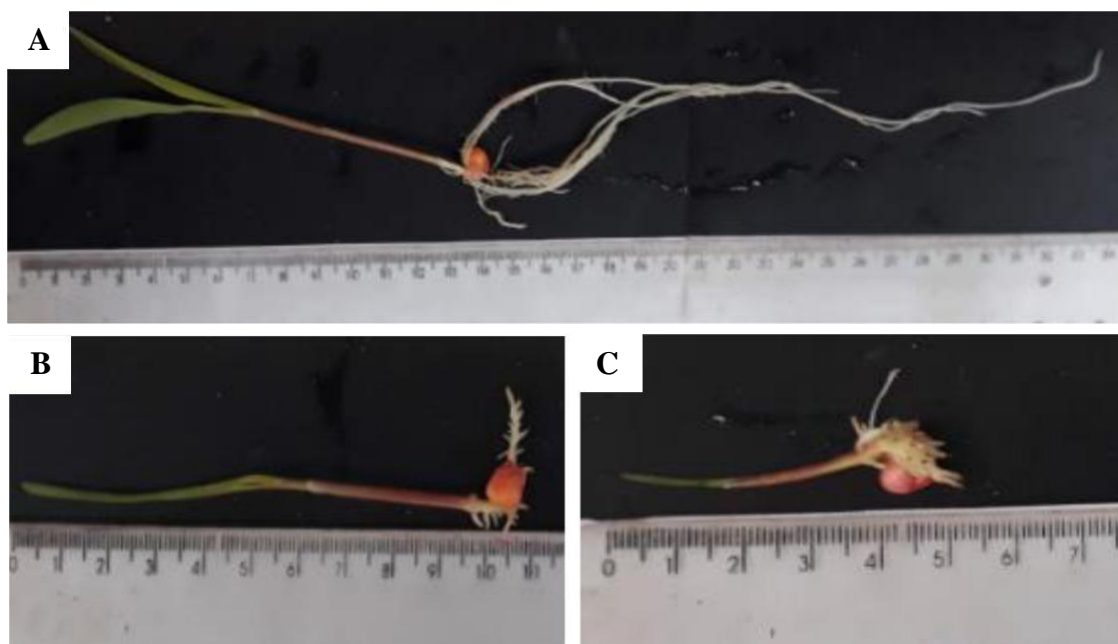
Plântulas dos tratamentos com água deionizada- AC0R6 (A); água deionizada com 100 μ M de cobre- AC100 R1 (B) e água deionizada com 200 μ M de cobre- AC200 R7 (C)



Plântulas dos tratamentos com NPS (0 μ M) + FCS (150 μ M) com 0 μ M de cobre- N0C0R5 (A); NPS (0 μ M) + FCS (150 μ M) com 100 μ M de cobre- N0C100R5 (B) e NPS (0 μ M) + FCS (150 μ M) com 200 μ M de cobre- N0C200R8 (C)



Plântulas dos tratamentos com NPS (75 μ M) + FCS (75 μ M) com 0 μ M de cobre- N75C0R4 (A); NPS (75 μ M) + FCS (75 μ M) com 100 μ M de cobre- N75C100R1(B) e NPS (75 μ M) + FCS (75 μ M) com 200 μ M de cobre- N75C200R4 (C)



Plântulas dos tratamentos com NPS (150 μ M) + FCS (0 μ M) com 0 de cobre- N150C0R5 (A); NPS (150 μ M) + FCS (0 μ M) com 100 μ M de cobre- N150C100R3 (B) e NPS (150 μ M) + FCS (0 μ M) com 200 μ M de cobre- N150C200R4 (C)

EXPERIMENTO II



Solo incubado com os tratamentos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0, 60 e 200 mg kg^{-1}) e semeio de sementes de milho (*Zea mays* L.) variedade K9606 VIP3.



Condução do experimento em casa de vegetação



Medição de teor de clorofila através do índice SPAD-502 (Minolta) e trocas gasosas (IRGA, LI-COR 6400-XT, Lincon, USA)