

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

EVENS CLAIRVIL

**MODULAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E
TOLERÂNCIA AO CÁDMIO (Cd) EM *Alternanthera
tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURANTE O
CULTIVO *IN VITRO* E O POTENCIAL DO ZINCO (Zn)
COMO MITIGADOR DE ESTRESSE INDUZIDO PELO
Cd**

SÃO MATEUS – ES

Fevereiro de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

**MODULAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E
TOLERÂNCIA AO CÁDMIO (Cd) EM *Alternanthera
tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURANTE O
CULTIVO *IN VITRO* E O POTENCIAL DO ZINCO (Zn)
COMO MITIGADOR DE ESTRESSE INDUZIDO PELO
Cd**

EVENS CLAIRVIL

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para a obtenção do título de mestre em Agricultura Tropical.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo

Coorientador: Dr. João Paulo Rodrigues Martins

São Mateus – ES

Fevereiro de 2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

- C585 Clairvil, Evens, 1988-
m Modulações morfofisiológicas e tolerância ao cádmio (Cd) em
Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae) durante o cultivo
in vitro e o potencial do zinco (Zn) como mitigador de estresse
induzido pelo Cd / Evens Clairvil. - 2021.
94 f. : il.
- Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo.
Coorientador: João Paulo Rodrigues Martins.
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário
Norte do Espírito Santo.
1. Metais pesados. 2. Cultivo in vitro. 3. Fluorescência da
clorofila a. 4. Espécie bioacumuladora. I. Barcelos Passos Lima
Gontijo, Andreia. II. Rodrigues Martins, João Paulo. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário
Norte do Espírito Santo. IV. Título.

CDU: 63

EVENS CLAIRVIL

“Modulações morfofisiológicas e tolerância ao cádmio (Cd) em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) durante o cultivo *in vitro* e o potencial do zinco (Zn) como mitigador de estresse induzido pelo Cd”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof(a). Dr(a). Andreia Barcelos Passos
Lima Gontijo
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



Prof(a). Dr(a). Sara Dosseau Arantes
INCAPER



Prof(a). Dr(a). Luiz Carlos de Almeida
Rodrigues
Universidade Federal de Alfenas

DEDICATÓRIA

Com a expressão da minha gratidão, dedico este modesto trabalho:

À Deus todo poderoso

À minha querida mãe Sylvie Clairvil e à minha esposa Jupcie Clairvil que nunca pararam de formular orações por mim, me apoiar e ajudar para que eu possa alcançar meus objetivos.

Ao engenheiro agrônomo Socrate Léon, Sra. Berguite Altenor, Pastor Jackson Dumarssais, Sra. Rita Mésidor, por seu apoio moral e seus preciosos conselhos ao longo de meus estudos.

À prof. Dr. Edney Leandro da Vitória e sua família e a família dos Santos Cardoso por seus inabaláveis apoiadores.

À Dr. João Paulo Rodrigues Martins e Prof^a. Dr^a. Andreia Barcelos Passos Lima gontijo pelo apoio e infinita paciência.

Aos meus amigos, a todos os envolvidos nesse trabalho, a todos os bolsistas haitianos e a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical (PPGAT), pela oportunidade e estrutura concedida para a realização desse trabalho. À CAPES, pela concessão das bolsas de estudos. Ao CNPq e CAPES pelo fomento à pesquisa e apoio ao programa de pós-graduação. A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo e ao meu coorientador Dr. João Paulo Rodrigues Martins, pela oportunidade e confiança, e também pela orientação e paciência durante os dois anos de mestrado. Aos prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto do Laboratório ecofisiologia, prof. Dr. Edney Leandro da Vitória e prof. Dr. Edilson Romais Schmidt do Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas (DCAB). Também aos demais professores do PPGAT, por todo conhecimento compartilhado. Ao Luiz Carlos de Almeida Rodrigues pela assistência técnica. A todos os amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas CEUNES-UFES pelo convívio harmonioso, pelo apoio em todos os momentos dessa jornada. Agradeço aos amigos, Lorenzo Toscano Conde, Franciele Pereira Rossini, Rosiane Cipriano, Samuel Werner Moreira, Samira Leite, Priscila da Conceição de Souza Braga e Thayna dos Santos Silva pela grande ajuda na condução dos experimentos e com contribuições importantíssimas de informações, bem como pela amizade. Aos meus amigos Tatielle dos Santos Cardoso, Tatiane dos Santos Cardoso, Maria Luzia dos Santos Cardoso, Marcilia Maria Fantin Fandão, Pedro Ribeiro Figueiredo Couto, Fabrício Bonini Zampirolo, Edelin Jean-Milien, Jonas Cherenfant, Ermano Prevoir, Emmanuel Fontaine, Doidely Saint-Jean e meus colegas do PPGAT. A minha mãe Sylvie Clairvil e minha esposa Jupcie Clairvil, pela dedicação, pelos conselhos, apoio, paciência, otimismo, alegria, pelo incentivo e pelo amor incondicional. E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais uma etapa da minha vida.

Enfim, agradeço à Deus e a vida, pelos caminhos traçados, que me permitiram conhecer pessoas maravilhosas também a permanecer forte no espírito, nas ações e lutar com as vicissitudes da vida sempre com o coração embelezado.

*" Pense em colocar seu futuro no palco,
você saberá seu lugar na sociedade amanhã "*

Evens CLAIRVIL

Sumário

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	4
2. CAPÍTULOS	8
2.1. Capítulo I: MODULATION OF PHYSIOLOGICAL RESPONSES AND TOLERANCE OF <i>Alternanthera tenella</i> Colla (AMARANTHACEAE) TO CADMIUM DURING <i>IN VITRO</i> CULTIVATION	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
Lista de tabelas	13
Lista de figuras	14
INTRODUCTION	15
Materials and methods	17
Plant material and <i>in vitro</i> cultivation with cadmium	17
Extraction and analysis of photosynthetic pigments content	17
Evaluation of the transient or multiphase fluorescence emission kinetics (O- J-I-P) and the JIP test.....	18
Modulated chlorophyll a fluorescence	20
Analysis of growth traits and Cd tolerance index.....	21
Statistical analysis.....	22

Results	22
Photosynthetic pigments content	22
Chlorophyll a fluorescence transients.....	23
Modulated chlorophyll a fluorescence	25
Plant growth and Cd tolerance index.....	26
Discussion	29
Conclusion.....	32
References	33
2.2. Capítulo II: ZINCO E CÁDMIO COMO FATORES MODULADORES DAS RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DE <i>Alternanthera tenella</i> Colla (AMARANTHACEAE) EM CONDIÇÕES CONTROLADAS	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT	41
Lista de tabelas	43
Lista de figuras.....	44
INTRODUÇÃO	46
Material e métodos	48
Material vegetal e exposição ao Cd e Zn	48
Crescimento vegetal e índice de tolerância (IT)	49
Análises anatômicas	50
Avaliação da cinética de emissão de fluorescência transiente ou multifásica (O-J-I-P) e do teste JIP	51
Análise estatística	53
Resultados.....	54
Características de crescimento das plantas <i>in vitro</i> e índice de tolerância ..	54
.....	55
Análises anatômicas (caulinares/folhares)	55
Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> das plantas <i>in vitro</i>	59
Discussão	66
Conclusão	72
Referências	72

RESUMO

CLAIRVIL, Evens, M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2021; **MODULAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E TOLERÂNCIA AO CÁDMIO (Cd) EM *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* E O POTENCIAL DO ZINCO (Zn) COMO MITIGADOR DE ESTRESSE INDUZIDO PELO Cd**; Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Coorientador: João Paulo Rodrigues Martins.

O excesso de elementos-traço no meio ambiente é tóxico para os seres vivos e mostra a necessidade de elementos de alívio de estresse no habitat. O cádmio (Cd) não tem papel biológico e é considerado tóxico para as plantas. O zinco (Zn), por meio de seu potencial de desintoxicação de elementos-traço e de aumentar a atividade fotossintética, tem sido citado como um atenuante aos efeitos deletérios induzidos pelo Cd. Neste contexto, propõe-se avaliar as modulações morfofisiológicas e tolerância de plantas da espécie *Alternanthera tenella* ao Cd em condições controladas, além de verificar o potencial do Zn como mitigador de estresse induzido pelo Cd. Foram realizados dois experimentos que serão apresentados e descritos, nos capítulos I e II, respectivamente, desta dissertação. No primeiro experimento, segmentos nodais de *A. tenella* foram cultivados em frascos contendo meio MS semi-sólido suplementado com 0, 50, 100 e 150 μM de Cd. Foram determinados, após 30 dias de cultivo, o peso fresco e seco total das

plantas, além do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, fluorescência da clorofila *a* e índice de tolerância (IT). Este estudo demonstrou que o Cd reduziu a biomassa e o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, induziu disfunções fotoquímicas com as diminuições de q_L , q_N e q_P e aumentou W_L , W_K e Φ_{NO} (indicativo de fotodanos). Além disso, as plantas apresentaram um nível de IT baixo (≥ 21.7) na faixa de concentração analisada. *A. tenella* não tolera concentrações superiores a 100 μM de Cd e apresentou nível de respostas fisiológicas claramente dependente das concentrações desse metal. No segundo experimento, segmentos nodais de *A. tenella* crescidos em meio MS Zn-modificado (sem Zn) foram cultivados em frascos contendo meio MS semi-sólido suplementado com três níveis de Cd (0, 75 ou 150 μM) e Zn (0, 750 ou 1500 μM). Novamente, após 30 dias de cultivo, a anatomia das folhas e do caule, o peso seco total das plantas, além da fluorescência da clorofila *a* e índice de tolerância (IT) foram determinados. As estruturas anatômicas (caulinares/foliares) das plantas apresentaram redução em função de ambos elementos-traço. Com a exposição apenas com Cd, as plantas apresentaram distúrbios fisiológicos, comprometendo seu crescimento. A suplementação de Zn no meio tem efeito positivo no desempenho fisiológico das plantas, em concentrações $\leq 750 \mu\text{M}$ ele pode amenizar parcialmente os efeitos deletérios do Cd. As plantas cultivadas com Zn e Cd exibiram um IT intermediário ($\approx 40,68$), comprovando o potencial do Zn como mitigador de estresse induzido pelo Cd em plantas. Sendo assim, do ponto de vista ecotoxicológico, o excesso dos ambos elementos-traço (Cd e Zn) representa toxicidade à espécie estudada.

Palavras-chave : Espécie bioacumuladora, fitorremediação, cultivo *in vitro*, fluorescência da clorofila *a*, elementos-traço.

ABSTRACT

CLAIRVIL, Evens, M.Sc .; Federal University of Espirito Santo; February 2021; **MORPHOPHYSIOLOGICAL MODULATIONS AND CADMIO TOLERANCE (Cd) IN *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURING IN VITRO CULTIVATION AND THE ZINC POTENTIAL (Zn) AS STRESS MITIGATOR INDUCED BY Cd**; Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Co-advisor: João Paulo Rodrigues Martins.

The excess of trace elements in the environment is toxic to living beings and shows the need for stress relief elements in the habitat. Cadmium (Cd) has no biological role and is considered toxic to plants. Zinc (Zn), through its potential to detoxify trace elements and increase photosynthetic activity, has been cited as a mitigation to the harmful effects induced by Cd. In this context, it is proposed to evaluate the morphophysiological modulations and tolerance of plants of the species *Alternanthera tenella* to Cd under controlled conditions, in addition to verifying the potential of Zn as a mitigator of stress induced by Cd. Two experiments were carried out that will be presented and described, in chapters I and II, respectively, of this dissertation. In the first experiment, nodal segments of *A. tenella* were grown in flasks containing semi-solid MS medium supplemented with 0, 50, 100 and 150 μM of Cd. After 30 days of cultivation, the total fresh and dry weight of the plants were determined, in addition to the content of photosynthetic pigments, chlorophyll a fluorescence and tolerance index (IT). This study showed that Cd reduced the

biomass and the content of photosynthetic pigments, induced photochemical dysfunctions with decreases in q_L , q_N and q_P and increased W_L , W_K and Φ_{NO} (indicative of photodanes). In addition, the plants had a low IT level (≥ 21.7) in the analyzed concentration range. *A. tenella* does not tolerate concentrations greater than 100 μM of Cd and showed a level of physiological responses clearly dependent on the concentrations of this metal. In the second experiment, nodal segments of *A. tenella* grown in Zn-modified MS medium (without Zn) were grown in flasks containing semi-solid MS medium supplemented with three levels of Cd (0, 75 or 150 μM) and Zn (0, 750 or 1500 μM). Again, after 30 days of cultivation, the anatomy of the leaves and stem, the total dry weight of the plants, in addition to the chlorophyll a fluorescence and tolerance index (TI) were determined. The anatomical structures (stem/leaf) of the plants showed a reduction due to both trace elements. With exposure only to Cd, the plants showed physiological disturbances, compromising their growth. Supplementation of Zn in the medium has a positive effect on the physiological performance of plants, in concentrations $\leq 750 \mu\text{M}$ it can partially alleviate the deleterious effects of Cd. Plants cultivated with Zn and Cd exhibited an intermediate IT (≈ 40.68), proving the potential of Zn as a stress reliever induced by Cd in plants. Thus, from an ecotoxicological point of view, the excess of both trace elements (Cd and Zn) represents toxicity to the species studied.

Keywords: Bioaccumulative species, phytoremediation, *in vitro* culture, chlorophyll a fluorescence, trace elements.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A presença de metais pesados (ou elementos-traço) nos diferentes tipos de biótopo é de grande risco para a biocenose, independentemente de sua dose ou forma química, pois afetam todas as formas de vida no ecossistema (AYANGBENRO et al., 2017). Muitos desses metais podem ser acumulados no ambiente de forma natural (vulcões que enviam grandes quantidades de gases e partículas, raios que emitem óxidos de nitrogênio e ozônio, erosão que produz poeira) ou por ações antropogênicas (através da aplicação de fertilizantes químicos, a instalação de fábricas e o estabelecimento de áreas de mineração); eles apresentam riscos ecológicos de alto potencial, afetando a qualidade da água, microrganismos do solo, saúde humana e superfícies agrícolas (CAROLIN, et al. 2017; MEN et al., 2018), podendo comprometer milhares de hectares de áreas agrícolas, além da fauna e flora quando eles estão em grandes quantidades (SEGURA et al., 2016).

Diversas avaliações ambientais demonstraram como altas concentrações de metais pesados podem afetar a biota a longo prazo e diretamente os solos (LIMA NETO et al., 2017). Assim, a presença em grandes quantidades de metais pesados no meio ambiente é uma ameaça para os seres vivos que lá se instalam (SARWAR et al., 2017).

Alguns metais quando em excesso, como o zinco (Zn), ferro (Fe), selênio (Se), manganês (Mn), cádmio (Cd) e cobre (Cu), podem induzir alterações na anatomia e fisiologia de algumas espécies vegetais prejudicando o crescimento e desempenho fotossintético das plantas (BENÁKOVÁ et al., 2017; BONANNO et al., 2017; TURKYILMAZ et al., 2018).

Por outro lado, alguns metais pesados não apresentam qualquer função conhecida no metabolismo vegetal e podem ser tóxicos mesmo em quantidade mínima, diminuindo o crescimento ou mesmo induzindo a senescência das plantas. Um exemplo é o Cd, que quando presente em grandes quantidades pode causar danos na morfofisiologia das plantas, tais como clorose e necrose, diminuição do conteúdo de pigmentos fotossintéticos; tais sintomas são típicos de estresse ao excesso de metais pesados nas plantas (COSTA et al., 2018). Além disso, segundo Asopa et al. (2016) o Cd é um metal facilmente móvel, de grande risco de acordo com sua suscetibilidade a ser absorvido pelas raízes e se translocar pela parte aérea das plantas, diminuindo assim, as atividades fisiológicas e enzimáticas pelo seu acúmulo nas plantas.

Diferente do Cd, o Zn é um elemento essencial para atividades enzimáticas, considerado um micronutriente essencial, está envolvida no transporte de elétrons e no crescimento das plantas (ROOSTA et al., 2018). É exigido em pequenas quantidades pelas plantas e quando em excesso pode causar estresse oxidativo, inibição do crescimento e do aparato fotossintético e fotodanos (SIDHU et al., 2020; TIECHER et al., 2017).

O efeito atenuante do Zn sob condições de estresse induzido pelo Cd já foi comprovado para algumas espécies vegetais (SANCHEZ-THOMAS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017; DU et al., 2020).

As concentrações de Zn podem promover a diminuição da absorção de Cd pelo sistema radicular das plantas e assim, reduzir o transporte do Cd para as folhas e melhorar a atividade fotossintética das plantas estressadas pelo Cd (SANTOS et al., 2020). Por outro lado, essa exposição combinada dos dois metais também pode ser tóxica devido aos efeitos deletérios apresentados no aparato fotossintético ou por afetar o crescimento de certas espécies vegetais (OLIVEIRA e TIBBETT, 2018; ZHU et al., 2018; SZOPINSKI et al., 2019). Nesse contexto, os efeitos negativos do Cd devem ser mitigados no que se refere à co-exposição ao micronutriente Zn.

O entendimento de como os metais pesados são acumulados e como atuam na fisiologia das plantas pode ser promissor para a seleção de espécies fitorremediadoras ou bioindicadoras, como já verificada também em condições *in vitro* (MARTINS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017; SCHMITE et al., 2019). De acordo com Giampaoli et al. (2012) as técnicas *in vitro* permitem isolar o estresse induzido pelos oligoelementos sem qualquer interferência externa. Alguns estudos realizados *in vitro* com o uso de Cd demonstram que a presença de uma alta concentração desse metal pode causar efeitos deletérios sobre o desenvolvimento e a subsequente geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em nível celular e produzir sintomas visíveis que indicam toxicidade (tais como clorose ou necrose) ou levar a uma diminuição na performance fotossintética e na taxa de crescimento das plantas (YOUSEFI et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; MANQUIÁN-CERDA et al., 2016).

Dentre as análises fisiológicas, as técnicas de fluorescência da clorofila a podem ser eficazes em estudos envolvendo estresse em plantas, por correlacionar o nível de estresse com o desempenho do aparato fotossintético. Da mesma forma, mudanças anatômicas também são úteis para indicar o nível de tolerância ao metal pesado. Algumas mudanças específicas são fundamentais para o ajuste das plantas ao estresse de metais pesados (Martins et al. 2020; Rodrigues et al. 2017).

De modo geral, a família Amaranthaceae possui 65 gêneros e aproximadamente 1000 espécies originárias de zonas tropicais, subtropicais e da América do Sul. O gênero *Alternanthera* é composto por 80 espécies, das quais 30 delas podem ser encontradas em território brasileiro (MOREIRA e BRAGANÇA, 2011). Algumas espécies dessa família como *Alternanthera tenella* podem desenvolver uma abordagem extraordinária para fixar carbono usando apenas a fotossíntese C₂, intermediária entre C₃ e C₄, podem capturar, concentrar e reassimilar o CO₂ liberado pela fotorrespiração (LUNDGREN, 2020).

Além disso, *A. tenella* é uma herbácea usada na medicina tradicional, amplamente difundida no território brasileiro especialmente em áreas de mineração e já foi descrita como uma espécie bioacumuladora de Cd por Rodrigues et al. (2017). Contudo, no presente trabalho visamos mostrar de um ponto de vista mais aprofundado o nível de estresse das plantas de *A. tenella* expostas a altas concentrações de Cd e/ou Zn, principalmente no que se refere como esses elementos-traço podem afetar o aparato fotossintético (fisiologia) das plantas de

fotossistema II (FSII) até fotossistema I (FSI), por análises da fluorescência da clorofila *a*.

As respostas morfofisiológicas observadas por Rodrigues et al. (2017) mostraram que o Cd pode comprometer o crescimento de plantas de *A. tenella*, o que poderia reduzir o seu emprego como espécie fitorremediadora. Assim, o objetivo dessa dissertação foi avaliar as modulações morfofisiológicas e a tolerância de plantas de *A. tenella* ao Cd em condições controladas, além de verificar o potencial do Zn como mitigador de estresse induzido por esse metal.

Referências

AMMAR, R.; KANBAR, H. J.; KAZPARD, K.; WAZNE, M.; EL SAMRANI, M. G.; AMACHA, N.; SAAD, Z.; CHOU, L. Role of phosphogypsum and NPK amendments on the retention or leaching of metals in different soils. **Journal of environmental management**, v. 178, p. 20-29, 2016.

ASOPA, P. P.; BHATT, R.; SIHAG, S.; KOTHARI, S. L.; KACHHWAHA, S. Effect of cadmium on physiological parameters of cereal and millet plants—a comparative study. **International journal of phytoremediation**, 2017, vol. 19, no 3, p. 225-230.

AYANGBENRO, A.; BABALOLA, O. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. **International journal of environmental research and public health**, 2017, vol. 14, no 1, p. 94.

BENÁKOVÁ, M.; AHMADI, H.; DUČAIOVÁ, Z.; TYLOVÁ, E.; CLEMENS, S.; TŮMA, J. Effects of Cd and Zn on physiological and anatomical properties of hydroponically grown *Brassica napus* plants. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017, vol. 24, no 25, p. 20705-20716.

BONANNO, G.; BORG, J. A.; DI MARTINO, Vincenzo. Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: a comparative assessment. **Science of the Total Environment**, 2017, vol. 576, p. 796-806.

CAROLIN, C. F.; KUMAR, P. S.; SARAVANAN, A.; JOSHIBA, G. J.; NAUSHAD, M. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. **Journal of environmental chemical engineering**, 2017, vol. 5, no 3, p. 2782-2799.

COSTA, M. B.; TAVARES, F. V.; MARTINEZ, C. B.; COLARES I. G.; MARTINS C. M. G. Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. **Ecotoxicology and environmental safety**, 2018, vol. 155, p. 117-124.

DELADINO, L.; ALVAREZ, I.; DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; MOLINA-GARCÍA, A. D.; & SCHNEIDER TEIXEIRA, A. Betalains and phenolic compounds of leaves and stems of *Alternanthera brasiliensis* and *Alternanthera tenella*. **Food research international**, 2017, vol. 97, p. 240-249.

DORNELES, A. O. S.; PEREIRA, A. S.; POSSEBOM, G.; PELIGRINOTTI TAROUÇO, C.; ROSSATO, L. V.; ALMERI TABALDI, L. Ameliorate the cadmium toxicity in *Solanum tuberosum* L. plants with selenium and silicon application. **Advances in Horticultural Science**, 2019, vol. 33, no 1, p. 49-56.

DU, J.; ZENG, J.; MING, X.; HE, Q.; TAO, Q.; JIANG, M.; ... YU, X. (2020). The presence of zinc reduced cadmium uptake and translocation in *Cosmos bipinnatus* seedlings under cadmium/zinc combined stress. **Plant Physiology and Biochemistry**.

GIAMPAOLI, P.; TRESMONDI, F.; LIMA, G. P. P.; KANASHIRO, S.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; TAVARES, A.R. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown in vitro. **Biologia plantarum**, 2012, vol. 56, no 1, p. 83-88.

JOHANSEN DA (1940). **Plant microtechnique**, 2nd ed. New York, p 523.

KANDEL, S. L.; FIRRINCIELI, A.; JOUBERT, P. M.; OKUBARA, P. A.; LESTON, N. D.; MCGEORGE, K. M.; ... DOTY, S. L. An in vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of Salicaceae endophytes. **Frontiers in microbiology**, 2017, vol. 8, p. 386.

LIMA NETO, D. E.; GUERRA, M. B. B.; THOMAZINI, A.; DAHER, M.; DE ANDRADE, A. M.; & SCHAEFER, C. E. G. R. Soil Contamination by Toxic Metals Near an Antarctic Refuge in Robert Island, Maritime Antarctica: A Monitoring Strategy. **Water, Air, & Soil Pollution**, 2017, vol. 228, no 2, p. 66.

LUNDGREN, M. R. (2020). C 2 photosynthesis: a promising route towards crop improvement? **New Phytologist**.

MANQUIÁN-CERDA, K.; ESCUDEY, M.; ZÚÑIGA, G.; ARANCIBIA-MIRANDA, N.; MOLINA, M.; & CRUCES, E. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro. **Ecotoxicology and environmental safety**, 2016, vol. 133, p. 316-326.

MARTINS, J. P. R. ; VASCONCELOS, L. L. DE. ; BRAGA, P. DA C. DE S. ; ROSSINI, F. P. ; CONDE, L. T.; RODRIGUES, L. C. DE A. ; ... GONTIJO, A. B. P. L. (2020). Morphophysiological responses, bioaccumulation and tolerance of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) to excess copper under in vitro conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**.

MARTINS, J. P. R.; MARTINS, A. D.; PIRES, M. F.; JUNIOR, R.A.B.; REIS, R.O.; DIAS, G.D.M.; PASQUAL, M. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 2016, vol. 126, no 1, p. 43-57.

MEN, C.; LIU, R.; XU, F.; WANG, Q.; GUO, L.; & SHEN, Z. Pollution characteristics, risk assessment, and source apportionment of heavy metals in road dust in Beijing, China. **Science of the total environment**, 2018, vol. 612, p. 138-147.

MOREIRA HJDC, BRAGANÇA HBN (2011) Manual de identificação de plantas infestantes. **FMC Agricultura**, São Paulo.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiologia plantarum**, v.15, n., p.473-497, 1962.

OLIVEIRA, D. V. H.; & TIBBETT, M. (2018). Tolerance, toxicity and transport of Cd and Zn in *Populus trichocarpa*. **Environmental and Experimental Botany**, 155, 281–292.

RODRIGUES, L. C. A.; MARTINS, J. P. R.; DE ALMEIDA JÚNIOR, O.; GUILHERME, L. R. G.; PASQUAL, M.; & DE CASTRO, E. M. Tolerance and potential for bioaccumulation of *Alternanthera tenella* Colla to cadmium under in vitro conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 2017, vol. 130, no 3, p. 507-519.

ROOSTA H.R.; ESTAJI A. ; NIKNAM F.: Effect of iron, zinc and manganese shortage-induced change on photosynthetic pigments, some osmoregulators and chlorophyll fluorescence parameters in lettuce. – **Photosynthetica** 56: 606-615, 2018.

SANCHEZ-THOMAS, R.; MORENO-SANCHEZ, R., & GARCIA-GARCIA, J. D. (2016). Accumulation of zinc protects against cadmium stress in photosynthetic *Euglena gracilis*. **Environmental and Experimental Botany**, 131, 19–31.

SANTOS D. M. L. S. ; DE ALMEIDA, A.-A. F. ; DA SILVA, N. M. ; OLIVEIRA, B. R. M.; SILVA, J. V. S. ; JUNIOR, J. O. S. ; ... BALIGAR, V. C. (2020). Mitigation of cadmium toxicity by zinc in juvenile cacao: Physiological, biochemical, molecular and micromorphological responses. **Environmental and Experimental Botany**, 104201.

SARWAR, N.; IMRAN, M.; SHAHEEN, M. R.; ISHAQUE, W.; KAMRAN, M. A.; MATLOOB, A.; ... HUSSAIN, S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. **Chemosphere**, 2017, vol. 171, p. 710-721.

SCHMITE, B. F. P.; BITOBROVEC, A.; HACKE, A. C. M.; PEREIRA, R. P.; WEINERT, P. L.; & DOS ANJOS, V. E. In vitro bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastro-intestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea. **Food chemistry**, 2019, vol. 281, p. 285-293.

SEGURA, F. R.; NUNES, E. A.; PANIZ, F. P.; PAULELLI, A. C. C.; RODRIGUES, G. B.; BRAGA, G. Ú. L.; ... BATISTA, B. L. Potential risks of the residue from Samarco's

mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, 2016, vol. 218, p. 813-825.

SHEKARI, L.; AROIEE, H.; MIRSHEKARI, A.; & NEMAT, H. Protective role of selenium on cucumber (*Cucumis sativus* L.) exposed to cadmium and lead stress during reproductive stage role of selenium on heavy metals stress. **Journal of plant nutrition**, 2019, vol. 42, no 5, p. 529-542.

SIDHU G.P.S. ; BALI A.S. ; SINGH H.P. et al.: Insights into the tolerance and phytoremediation potential of *Coronopus didymus* L. (Sm) grown under zinc stress. – **Chemosphere** 244: 125350, 2020.

STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In Mathis, P. (ed) **Photosynthesis: from light to biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic publishers, p. 977-80, 1995.

SZOPINSKI, M. ; SITKO, K.; GIERON, Ź. ; RUSINOWSKI, S. ; CORSO, M. ; HERMANS, C. ; ... MALKOWSKI, E. (2019). Toxic Effects of Cd and Zn on the Photosynthetic Apparatus of the *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* Pseudo-Metallophytes. **Frontiers in Plant Science**, 10.

TIECHER T.L. ; TIECHER T. ; CERETTA C.A. et al.: 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. – **Sci. Hortic.**-Amsterdam 222: 203-212, 2017.

TURKYILMAZ, A.; CETIN, M.; SEVIK, H.; ISINKARALAR, K.; & SALEH, E. A. A. Variation of heavy metal accumulation in certain landscaping plants due to traffic density. **Environment, Development and Sustainability**, 2018, p. 1-14.

WELLBURN AR. 1994. The Spectral Determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total Carotenoides, Using Various solvents with Spectrophotometers of different resolution. **J Plant Physiol**. 144 (3); 307-313.

YOUSEFI, Z.; KOLAH, M.; MAJD, A.; & JONOUBI, P. Effect of cadmium on morphometric traits, antioxidant enzyme activity and phytochelatin synthase gene expression (SoPCS) of *Saccharum officinarum* var. cp48-103 in vitro. **Ecotoxicology and environmental safety**, 2018, vol. 157, p. 472-481.

ZAZA, S.; DE BALOGH, K.; PALMERY, M.; PASTORELLI, A. A.; & STACCHINI, P. Human exposure in Italy to lead, cadmium and mercury through fish and seafood product consumption from Eastern Central Atlantic Fishing Area. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2015, vol. 40, p. 148-153.

ZHU, L.; LI, T.; WANG, C. ; ZHANG, X. ; XU, L. ; XU, R., & ZHAO, Z. (2018). The effects of dark septate endophyte (DSE) inoculation on tomato seedlings under Zn and Cd stress. **Environmental Science and Pollution Research**.

2. CAPÍTULO

**2.1. Capítulo I: MODULATION OF PHYSIOLOGICAL RESPONSES AND
TOLERANCE OF *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) TO
CADMIUM DURING *IN VITRO* CULTIVATION**

(Artigo submetido para a revista *Israel Journal of Plant Sciences*)

RESUMO

CLAIRVIL, Evens, M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2021; **MODULAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E TOLERÂNCIA AO CÁDMIO (Cd) EM *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* E O POTENCIAL DO ZINCO (Zn) COMO MITIGADOR DE ESTRESSE INDUZIDO PELO Cd**; Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Coorientador: João Paulo Rodrigues Martins.

O uso de espécies vegetais que apresentam respostas fisiológicas claras aos metais pesados, tais como cádmio (Cd), pode auxiliar no monitoramento ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas de plantas de *Alternanthera tenella* ao Cd em condições *in vitro*, além de verificar o grau de tolerância e o seu potencial bioindicador. Segmentos nodais de *A. tenella* foram cultivados em frascos contendo meio MS semi-sólido suplementado com 0, 50, 100 e 150 μM de Cd. O peso fresco e seco total das plantas, além do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, fluorescência da clorofila *a* e índice de tolerância (IT) foram determinados após 30 dias de cultivo. Plantas submetidas ao Cd apresentaram redução da biomassa e do conteúdo de pigmentos fotossintéticos. O declínio da razão de Chl *a/b* indicou os efeitos deletérios do Cd, como comprovado pelo decréscimo na densidade de centros de reação ativos (RC/CS_M). Os níveis de

comprometimento na funcionalidade ou integralidade estrutural das membranas dos tilacóides (W_L) e na atividade do complexo de evolução do oxigênio (W_K) foram aumentados em função das concentrações de Cd. As diminuições de q_L , q_N e q_P observadas nas plantas expostas ao Cd demonstraram disfunções fotoquímicas. Além disso, o aumento de Φ_{NO} indicou a presença de fotodanos. As plantas apresentaram um nível de IT baixo (≥ 21.7) na faixa de concentração analisada. O nível de respostas fisiológicas de *A. tenella* é claramente dependente da concentração de Cd, o que torna ainda mais promissor o uso dessa espécie como bioindicadora para esse metal.

Palavras-chave : Bioindicador, fluorescência da clorofila a, fluxo de transporte de elétrons, metal pesado, cultura de tecidos.

ABSTRACT

CLAIRVIL, Evens, M.Sc .; Federal University of Espirito Santo; February 2021; **MORPHOPHYSIOLOGICAL MODULATIONS AND CADMIO TOLERANCE (Cd) IN *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURING IN VITRO CULTIVATION AND THE ZINC POTENTIAL (Zn) AS STRESS MITIGATOR INDUCED BY Cd**; Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Co-advisor: João Paulo Rodrigues Martins.

The use of plants that present clear physiological responses to heavy metals such as cadmium (Cd) can assist in environmental monitoring. The aim was to evaluate physiological responses of Cd in *Alternanthera tenella* plants under *in vitro* conditions and to assess the its tolerance level and bioindicator potential. Nodal segments of *A. tenella* were grown in flasks containing semi-solid MS medium supplemented with 0, 50, 100 and 150 μM Cd. The total fresh and dry weight of the plants, in addition to the content of photosynthetic pigments, chlorophyll *a* fluorescence and tolerance index (TI) were determined after 30 days of cultivation. Plants submitted to Cd showed a reduction in biomass and photosynthetic pigments content. The decline in the Chl *a/b* ratio indicated the deleterious effects of Cd, as evidenced by the decrease in the density of active reaction centers ($\text{RC}/\text{CS}_\text{M}$). The levels of deterioration in the functionality or structural integrity of the thylakoid membranes (W_L) and the activity of the oxygen evolution complex (W_K) increased as a function of

Cd concentrations. The decreases in photochemical and non-photochemical quenching (qP and qN, respectively) observed in plants exposed to Cd indicated photochemical dysfunctions. Additionally, the increase in the quantum yield of non-regulated energy dissipation (Φ_{NO}) indicated the presence of photodamage. Plants had a low/intermediate TI level (≥ 21.7) in the analyzed concentration range. The level of physiological responses of *A. tenella* is dependent on the concentration of Cd, which makes the use of this species even more promising as a bioindicator for this metal.

Keywords: Bioindicator, chlorophyll a fluorescence, electron transport, heavy metal, tissue culture.

Lista de tabelas

TABLE 1. Abbreviations of the parameters, formulas and description of the data derived from the transient fluorescence of chlorophyll *a*. For review see Strasser et al. (2004), Yusuf et al. (2010), and Wang et al. (2016)..... 18

TABLE 2. Abbreviations, formulas and description of the parameters of modulated chlorophyll fluorescence. For review see Kramer et al. (2004), Goltsev et al. (2016), and Tsai et al. (2019). 20

TABLE 3. Parameters of the chlorophyll *a* modulated fluorescence from *A. tenella* plants after 30 days of *in vitro* cultivation in presence of Cd. From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) denoted with the same letter in the column are not significantly different at a 5% level of significance. R^2 values refer to linear adjustment..... 26

Lista de figuras

FIGURE 1. Content of photosynthetic pigments from *A. tenella* plants (grown *in vitro* for 30 days) as a function of Cd concentration (0, 50, 100, or 150 μM). From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) denoted with the same letter are not significantly different at a 5% level of significance. 23

FIGURE 2. OJIP transients of chlorophyll *a* fluorescence as a function of Cd concentration (0, 50, 100, and 150 μM) during *in vitro* cultivation of *A. tenella*. (A) polyphasic chlorophyll *a* fluorescence emission curve; (B) relative fluorescence between points O and P; (C) Kinetic differences between points O and K; (D) Kinetic differences between points O and J. From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) denoted with the same letter are not significantly different at a 5% level of significance..... 24

FIGURE 3. JIP test parameters obtained from *A. tenella* plants after 30 days of *in vitro* cultivation, exposed to different concentrations of cadmium (Cd) (0, 50, 100, or 150 μM). For each parameter, means denoted with an asterisk (*) differ significantly from each other according to the Tukey test at a 5% level of significance. ^{ns} = not significant. The means of each parameter were normalized in relation to the control (0 μM Cd = 1). ⁽¹⁾ = 0.74 (linear); ⁽²⁾ = $R^2 = 0.98$ (linear); ⁽³⁾ = $R^2 = 0.95$ (linear); ⁽⁴⁾ = $R^2 = 0.88$ (linear); ⁽⁵⁾ = $R^2 = 0.91$ (linear); ⁽⁶⁾ = $R^2 = 0.95$ (linear); ⁽⁷⁾ = $R^2 = 0.97$ (linear); ⁽⁸⁾ = $R^2 = 0.99$ (linear); ⁽⁹⁾ = $R^2 = 0.89$ (quadratic); ⁽¹⁰⁾ = $R^2 = 0.94$ (linear); ⁽¹¹⁾ = $R^2 = 0.93$ (linear); ⁽¹²⁾ = $R^2 = 0.99$ (linear); ⁽¹³⁾ = $R^2 = 0.99$ (linear); ⁽¹⁴⁾ = $R^2 = 0.88$ (linear).25

FIGURE 4. Growth traits and tolerance index (%) of *A. tenella* plants after 30 days of *in vitro* cultivation, exposed to different concentrations of cadmium (Cd) (0, 50, 100, or 150 μM). From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) for each trait denoted with the same letter are not significantly different at a 5% level of significance. 29

INTRODUCTION

Heavy metals can be present in ecosystems at high concentrations, which can affect all forms of life (Ayangbenro and Babalola 2017). They can come from industrial or natural processes and accumulate in the environment (Carolin et al. 2017; Men et al. 2018). Several studies have demonstrated how high concentrations of heavy metals can affect the biota in the long term and directly affect soils (Lima Neto et al. 2017; Enya et al. 2019; Vongdala et al. 2019).

When in excess, metals such as zinc (Zn), iron (Fe), selenium (Se), manganese (Mn), cadmium (Cd), and copper (Cu) can induce changes in the anatomy and physiology of some plant species (Benáková et al. 2017; Bonanno et al. 2017; Turkyilmaz et al. 2020). In plants, Cd can induce phytotoxicity, slowing growth and damaging plant morphophysiology via chlorosis, necrosis, reducing photosynthetic pigment content, or inducing senescence of plants when present in high concentrations (Socha et al. 2015; Rodrigues et al. 2017). These are typical

symptoms of stress due to excess of heavy metals in plants (Costa et al. 2018). The Cd has great mobility and may be absorbed by the roots of the plants and translocated to the aerial part. Its accumulation in plants is also related to decreased enzyme activity and photosynthetic pigments content (Asopa et al. 2017).

The understanding of how heavy metals are accumulated and how they act in plant physiology can be promising for the selection of bioindicator or bioaccumulative species, as already verified *in vitro* by some authors (Martins et al. 2016, 2020; Rodrigues et al. 2017; Wiszniewska et al. 2017; Dogan 2019). In a study with seedlings of *Saccharum officinarum* (Poaceae), the presence of Cd at high concentrations caused deleterious effects on growth and changes in the content of reactive oxygen species (ROS). Such responses can induce oxidative stress and lead to a decrease in photosynthetic rate and growth rate (Yousefi et al. 2018). Similarly, low concentrations of Cd reduced growth, caused oxidative damage, and reduced the antioxidant activity in blueberry plants (*Vaccinium corymbosum* L.) (Manquían-Cerda et al. 2016). This highlights the importance of analyzing the physiological changes of plant species capable of accumulating Cd, which may help in the use of these plants in biomonitoring contaminated areas.

The chlorophyll a fluorescence is a technique used to verify the physiological status of plants exposed to heavy metals. Through the use of modulated fluorescence, this technique allows for the detection of the effects of stress factors quickly and non-destructively, reporting energy dissipaters and the effective quantum yields of photosystem II (PSII). They also describe the kinetic phases of the transient or multiphase photosynthetic fluorescence emission curves (O-J-I-P) and the JIP test through non-modulated fluorescence. Thus, the use of these techniques can assist in the identification of plants for biomonitoring (Cabrita et al. 2016).

Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae) is an herbaceous plant widely found in Brazil, especially in areas subjected to environmental degradation, such as mining areas. *A. tenella* has already proven the ability to bioaccumulate Cd, which makes it promising for phytoremediation (Rodrigues et al. 2017). However, additional studies with this species can also verify its potential use as a bioindicator in areas contaminated by Cd. Therefore, the aim of this study was to evaluate the physiological modulations induced by Cd in *A. tenella* plants and to assess its bioindicator potential.

Materials and methods

Plant material and in vitro cultivation with cadmium

A. tenella plants were previously established and multiplied *in vitro*, as recommended by Rodrigues et al. (2017). Plants with similar morphology were used as a source of explants (nodal segments). Nodal segments of approximately 2.5 ± 0.5 cm were cut with a scalpel and transferred to 500 mL glass flasks containing 30 mL MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 15 g L^{-1} sucrose and solidified with 6 g L^{-1} agar. The culture medium was supplemented with a cadmium concentration gradient (0, 50, 100, or $150 \text{ }\mu\text{M Cd}$). The source of Cd used was $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. The experiment was conducted with five nodal segments per glass flask. The pH of all media was adjusted to 5.8 before autoclaving at $120 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 minutes. After inoculating the explants in a laminar flow chamber, the plant material was grown in the growth chamber at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 days with a 16-hour photoperiod under slim LED lamps (Blumenau® 36W/6500K) emitting $70 \text{ }\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation.

Extraction and analysis of photosynthetic pigments content

On the 30th day of cultivation, the extraction of the photosynthetic pigment content was performed on leaf discs from randomly collected plants with a known

fresh mass (0.020-0.029g). The plant material was transferred to test tubes containing 5 mL of 80% acetone solution and kept refrigerated at 4°C for 48 hours (Martins et al. 2019). The content of photosynthetic pigments was determined with the aid of Genesys™ 10S UV-Vis spectrometer (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, USA). The absorbance was recorded in the following spectra: λ = 663 (A_{663}), 645 (A_{645}), and 470 nm (A_{470}) for chlorophyll *a* (Chl *a*), chlorophyll *b* (Chl *b*), and carotenoids (Car), respectively. The calculations were performed as described in Wellbrun (1994) and the results were expressed in microgram of pigment per microgram of fresh weight ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW).

Evaluation of the transient or multiphase fluorescence emission kinetics (O-J-I-P) and the JIP test

The chlorophyll *a* fluorescence transients were measured on the 30th day of cultivation with Cd. The measurements were performed in 15 plants for each treatment, between 8:00 a.m. and 10:00 a.m., using the HandyPEA portable fluorometer (Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, United Kingdom). The measurements were made on the second leaf completely expanded from the apex, which was adapted to the dark for 30 min with the aid of leaf clips (Hansatech®). The parameters of the JIP test were calculated based on fluorescence intensities from 20 μs (minimum fluorescence; F_0) to a maximum level of 300 ms (maximum fluorescence; F_m) using the Biolyzer software (Bioenergetics Laboratory, University of Geneva, Switzerland). Normalizations were performed in the O-P, O-K, and O-J intervals [$V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_m - F_0)$, $V_{OK} = [(F_t - F_0) / (F_K - F_0)]$, and $V_{OJ} = [(F_t - F_0) / (F_J - F_0)$, respectively]. Treatment with no Cd (0 μM Cd) was used as the control. The normalizations and calculations of the test JIP parameters (Table 1) were performed following the method described by Strasser et al. (2004).

TABLE 1. Abbreviations of the parameters, formulas and description of the data derived from the transient fluorescence of chlorophyll *a*.

Fluorescence parameters	Description
Extracted fluorescence parameters	
$F_0 = F_{0.02\text{ms}}$	Initial fluorescence yield of dark-adapted sample with all PSII

F_m	centers open. Maximum fluorescence yield of dark-adapted sample with all PSII centers closed.
F_t	Fluorescence at time t after start of actinic illumination.
$F_L = F_{0.15ms}$	Fluorescence intensity at 0.15 ms.
$F_K = F_{0.3ms}$	Fluorescence intensity at 0.3 ms.
$F_J = F_{2ms}$	Fluorescence intensity at 2 ms.
$F_I = F_{30ms}$	Fluorescence intensity at 30 ms.
$F_P = F_{300ms} \approx F_m$	Fluorescence intensity at 300 ms.
Calculated parameters	
$F_v = F_m - F_0$	Variable fluorescence.
F_v/F_0	Ratio of photochemical to nonphotochemical quantum efficiencies (PSII potential activity).
$V_K = (F_K - F_0)/(F_m - F_0)$	Relative variable fluorescence at the phase K. of the fluorescence induction curve.
$V_J = (F_J - F_0)/(F_m - F_0)$	Relative variable fluorescence at the phase J of the fluorescence induction curve.
$V_I = (F_I - F_0)/(F_m - F_0)$	Relative variable fluorescence at the phase I of the fluorescence induction curve.
$W_L = (F_L - F_0)/(F_K - F_0)$	Represents the changes in the fluidity of the thylakoid membrane and damages to its function and structural integrity.
$W_K = (F_K - F_0)/(F_J - F_0)$	Represents the damage to oxygen evolving complex OEC.
RC/CS_M	Density of active reaction center per cross-section.
Specific energy fluxes	
ABS/RC	Absorption flux per reaction center (RC) at $t = 0$.
TR_0/RC	Trapping flux (leading to Q_A reduction) per RC at $t = 0$.
ET_0/RC	Electron transport flux (further than Q_A^-) per RC at $t = 0$.
DI_0/RC	Dissipated energy flux per RC at $t = 0$.
Quantum yields and probabilities	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = [1 - (F_0/F_m)] = F_v/F_m$	Maximum quantum yield of primary photochemistry at ($t = 0$).
$\phi E_0 = ET_0/ABS = [1 - (F_0/F_m)] \times \psi_0 = \phi P_0 \times \psi_0$	Quantum yield of electron transport (at $t = 0$).
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_m)$	Quantum yield of energy

$\psi_0 = ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$	dissipation (at $t = 0$). Probability (at $t = 0$) that a trapped exciton moves an electron into the electron transport chain beyond Q_A^- .
$\delta R_0 = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Efficiency/probability with which an electron from the intersystem electron carriers moves to reduce end electron acceptors at the PSI acceptor side.
Performance and structure–function indexes	
$SFI_{(ABS)} = RC/ABS \times \phi P_0 \times \psi_0$	Structure-function index.
$PI_{(ABS)} = RC/ABS \times [\phi P_0/(1 - \phi P_0)] \times [\psi_0/(1 - \psi_0)]$	The performance index on absorption basis.
$PI_{(total)} = PI_{(ABS)} \times [\delta R_0/(1 - \delta R_0)]$	Overall performance index, which measures the performance up until the final electron acceptors of PSI.

For review see Strasser et al. (2004), Yusuf et al. (2010), and Wang et al. (2016).

Modulated chlorophyll a fluorescence

To evaluate the modulated chlorophyll a fluorescence, 12 plants from each treatment were randomly selected. Measurements were performed between 8:00 am and 10:00 am using the MINI-PAM-II portable fluorometer (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Germany), according to the experimental protocol described by Kramer et al. (2004). Before the readings, the plants were kept inside the flasks and adapted to the dark for at least 30 min. Measurements were made using a leaf clip (DLC-8, Walz GmbH) attached to the MINI-PAM sensor. The measurement time was 4 min and each reading provided values for the effective quantitative yield of the PSI and/or PSII (Table 2).

TABLE 2. Abbreviations, formulas and description of the parameters of modulated chlorophyll fluorescence.

Fluorescence parameters	Description
Fs	The steady-state fluorescence.

F_0'	Minimal fluorescence yield of illuminated sample with all PS II centers open.
F_m'	Maximal fluorescence yield of illuminated sample with all PSII centers closed.
$\Phi_{PSII} = Y(II) = (F_m' - F_s)/F_m'$	Effective photochemical quantum yield of PSII.
$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$	Photochemical quenching.
$qL = qP \times (F_0'/F_s)$	The fraction of PSII centers in open states based on a lake model for the photosynthetic unit.
$qN = (F_m - F_0')/(F_m - F_0)$	Non-photochemical quenching.
$ETR = \Phi_{PSII} \times 0.50 \times PPFDa$	Rate of linear electron flow (PPFDa designates the rate of light absorption by a sample expressed in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
$\Phi_{NPQ} = Y(NPQ) = 1 - \Phi_{PSII} - 1/(NPQ + 1 + qL \times (F_m/F_0 - 1))$	Quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in PSII.
$\Phi_{NO} = Y(NO) = 1/(NPQ + 1 + qL \times (F_m/F_0 - 1))$	Quantum yield of non-regulated energy dissipation.
For review see Kramer et al. (2004), Goltsev et al. (2016), and Tsai et al. (2019).	

Analysis of growth traits and Cd tolerance index

On the 30th day of cultivation, 25 plants were randomly collected from each treatment and divided into five different groups (repetitions) for analysis of growth characteristics. The fresh weight of the aerial part and roots were analyzed, as well as the total dry weight (aerial part + roots), and the values were expressed in g plant⁻¹.

For the tolerance index (TI), the *A. tenella* plants were completely dehydrated in a forced-air oven (70°C) to obtain their dry weight (aerial part + roots). To evaluate the growth capacity of the plants of *A. tenella* at different concentrations of Cd, the dry weight (DW) of the plants from each treatment was determined and used for the TI calculations (Wilkins 1957). The tolerance index was calculated as follow:

$$TI = [(DW_{Cd - treatment}) / (DW_{control})] \times 100$$

In which,

TI = tolerance index; range: 0 (maximum sensitivity = 0%) to 1 (maximum tolerance = 100%)

$DW_{Cd - treatment}$ = dry weight of the plants grown in the presence of Cd.

$DW_{control}$ = overall average dry weight of plants in the control treatment.

Statistical analysis

The experimental plan followed a completely randomized design. The data obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA) and the means compared by the Tukey test at a 5% level of significance. In addition, to verify significant adjustments to the trend models, the data were submitted to regression analysis. The analyses were performed in the software Sisvar® (Ferreira, 2011).

Results

Photosynthetic pigments content

The plants grown in the presence of Cd showed a significant decrease in the content of Chl *a*, Car, Chl *a+b*, and the chlorophyll ratio (Chl *a/b*) as a function of the Cd concentration (Fig. 1). No changes were observed for the content of Chl *b*. Plants

grown with 150 μM Cd showed a reduction of about 55% in the Chl $a+b$ content. Similarly, a linear reduction ($R^2 = 0.87$) was observed for the Chl a/b ratio with increasing Cd concentration (Fig. 1).

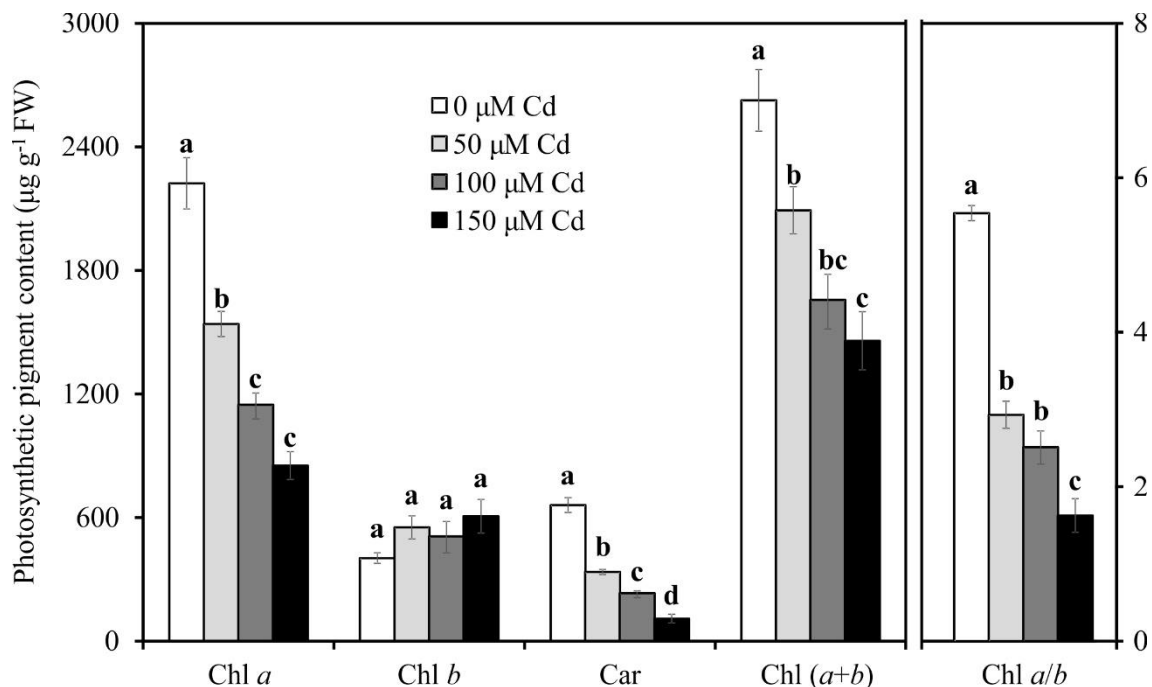


FIGURE 1. Content of photosynthetic pigments from *A. tenella* plants (grown *in vitro* for 30 days) as a function of Cd concentration (0, 50, 100, or 150 μM). From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) denoted with the same letter are not significantly different at a 5% level of significance.

Chlorophyll a fluorescence transients

Regardless of the conditions imposed, all plants remained photosynthetically active. However, on the 30th day of cultivation, changes in the OJIP transients were observed as a function of Cd concentrations. For the plants grown at the 150 μM Cd concentration, an increase in F_0 was observed without significant changes in F_m values (Figs. 2A and 3). The relative fluorescence between the O-P points (V_{OP}) showed an evident increase in the 0.3 (V_K) and 2 ms (V_J) points in plants grown with 100 and 150 μM Cd in comparison to the control (Figs. 2B and 3). The normalizations between points O (20 μs) and K (0.3 ms) and between points O (20 μs) and J (2 ms)

indicated the appearance of positive L- and K-bands, respectively, in all treatments that submitted to Cd (Figs. 2C - D). The values of W_L and W_K showed a linear increase as a function of Cd concentrations ($R^2 = 0.96$ and $R^2 = 0.99$, respectively).

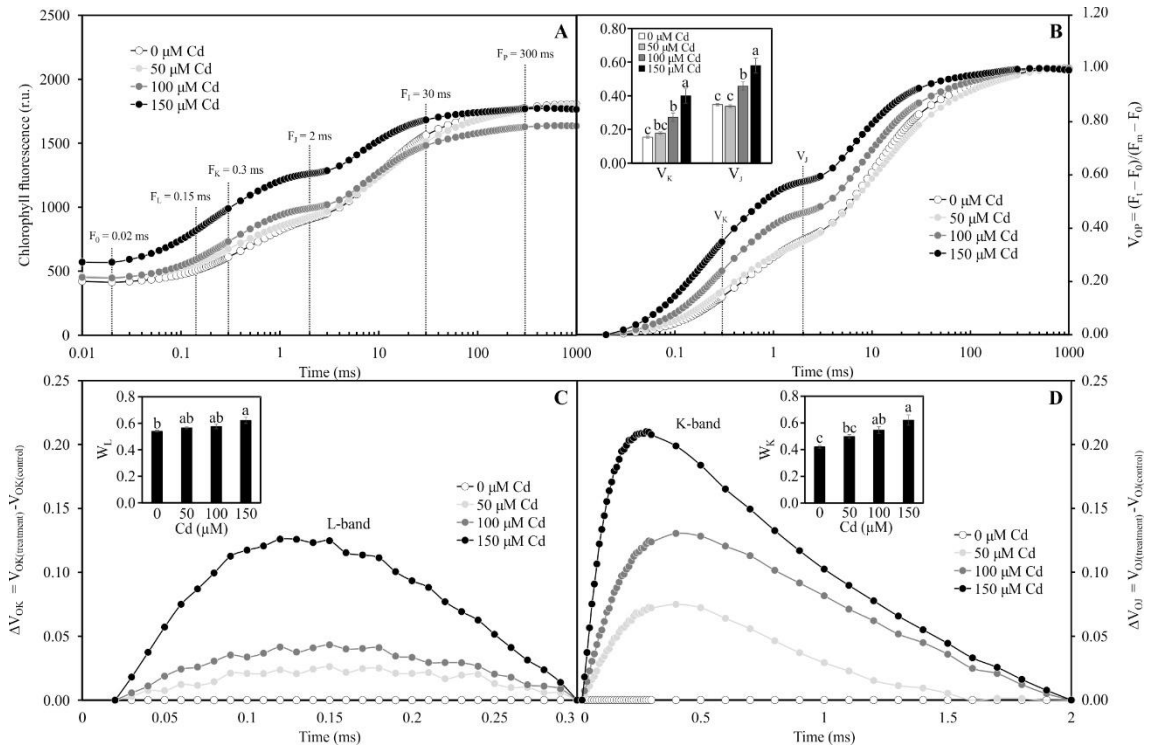


FIGURE 2. OJIP transients of chlorophyll *a* fluorescence as a function of Cd concentration (0, 50, 100, and 150 μM) during *in vitro* cultivation of *A. tenella*. (A) polyphasic chlorophyll *a* fluorescence emission curve; (B) relative fluorescence between points O and P; (C) Kinetic differences between points O and K; (D) Kinetic differences between points O and J. From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) denoted with the same letter are not significantly different at a 5% level of significance.

The parameters of the JIP test were normalized in relation to the control (0 μM Cd) and are presented in Fig. 3. The parameters related to the photochemical efficiency and functionality of the photosynthetic apparatus [F_v/F_0 , ψ_0 , $SFI_{(ABS)}$, ϕE_0 , ϕP_0 , $PI_{(ABS)}$, and $PI_{(total)}$] decreased when the plants were exposed to Cd. In contrast, the photochemical dissipation quantum yield (ϕD_0) increased significantly, especially in plants grown at the 150 μM Cd concentration. Similarly, the values related to the specific flow of energy per reaction center (ABS/RC , TR_0/RC , and DI_0/RC) increased with increasing Cd concentrations ($R^2 = 0.97$; 0.99; and 0.94, respectively). ET_0/RC values were higher in plants exposed to the 50 μM Cd concentration. Plants exposed to Cd showed a reduction in RC/CS_M values (-32%) in comparison to control plants.

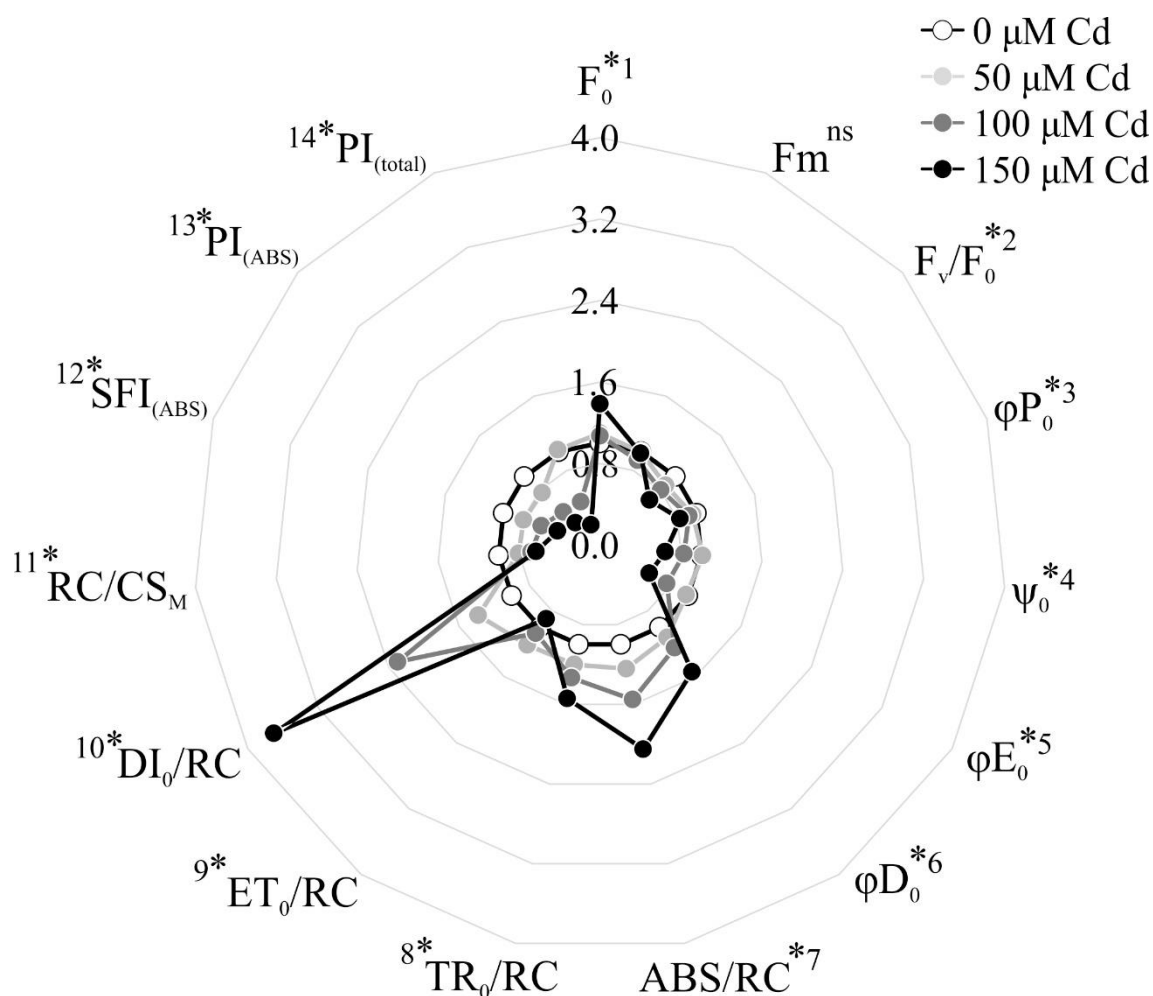


FIGURE 3. JIP test parameters obtained from *A. tenella* plants after 30 days of in vitro cultivation, exposed to different concentrations of cadmium (Cd) (0, 50, 100, or 150 μM). For each parameter, means denoted with an asterisk (*) differ significantly from each other according to the Tukey test at a 5% level of significance. ^{ns} = not significant. The means of each parameter were normalized in relation to the control (0 μM Cd = 1). ⁽¹⁾ = 0.74 (linear); ⁽²⁾ = $R^2 = 0.98$ (linear); ⁽³⁾ = $R^2 = 0.95$ (linear); ⁽⁴⁾ = $R^2 = 0.88$ (linear); ⁽⁵⁾ = $R^2 = 0.91$ (linear); ⁽⁶⁾ = $R^2 = 0.95$ (linear); ⁽⁷⁾ = $R^2 = 0.97$ (linear); ⁽⁸⁾ = $R^2 = 0.99$ (linear); ⁽⁹⁾ = $R^2 = 0.89$ (quadratic); ⁽¹⁰⁾ = $R^2 = 0.94$ (linear); ⁽¹¹⁾ = $R^2 = 0.93$ (linear); ⁽¹²⁾ = $R^2 = 0.99$ (linear); ⁽¹³⁾ = $R^2 = 0.99$ (linear); ⁽¹⁴⁾ = $R^2 = 0.88$ (linear).

Modulated chlorophyll a fluorescence

The parameters of the modulated chlorophyll *a* fluorescence also varied according to the Cd concentrations used in the *in vitro* cultivation of *A. tenella*. The values of Φ PSII, ETR, Φ NPQ, and quenching coefficients (qP, qN, qL) showed a linear reduction in response to increasing Cd concentrations. In contrast, Φ NO increased in plants grown in the presence of Cd (Table 3).

TABLE 3. Parameters of the chlorophyll *a* modulated fluorescence from *A. tenella* plants after 30 days of *in vitro* cultivation in presence of Cd.

Cd (μ M)	Φ PSII	ETR	qP	qN	qL	Φ NPQ	Φ NO
0	0.228 $\pm$ 0.006 ^a	18.02 $\pm$ 0.44 ^a	0.37 $\pm$ 0.01 ^a	0.57 $\pm$ 0.03 ^a	0.18 $\pm$ 0.01 ^a	0.35 $\pm$ 0.02 ^a	0.41 $\pm$ 0.02 ^b
50	0.225 $\pm$ 0.009 ^a	17.70 $\pm$ 0.74 ^a	0.34 $\pm$ 0.02 ^a	0.48 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.16 $\pm$ 0.01 ^a	0.30 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.03 ^b
100	0.126 $\pm$ 0.012 ^b	10.05 $\pm$ 0.97 ^b	0.19 $\pm$ 0.06 ^b	0.29 $\pm$ 0.06 ^{bc}	0.08 $\pm$ 0.01 ^b	0.19 $\pm$ 0.04 ^b	0.68 $\pm$ 0.04 ^a
150	0.102 $\pm$ 0.016 ^b	8.18 $\pm$ 1.30 ^b	0.16 $\pm$ 0.05 ^b	0.26 $\pm$ 0.05 ^c	0.06 $\pm$ 0.01 ^b	0.18 $\pm$ 0.04 ^b	0.71 $\pm$ 0.04 ^a
	R ² = 0.88	R ² = 0.88	R ² = 0.91	R ² = 0.92	R ² = 0.93	R ² = 0.92	R ² = 0.92

From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) denoted with the same letter in the column are not significantly different at a 5% level of significance. R² values refer to linear adjustment.

Plant growth and Cd tolerance index

The different concentrations of Cd added to the culture medium also influenced plant growth. The fresh weights of the aerial part and roots showed a linear reduction as a function of Cd concentrations (R² = 0.89 and R² = 0.87, respectively) (Fig. 4A). The plants treated with 100 and 150 μ M of Cd showed visual

symptoms of toxicity, such as chlorosis and leaf necrosis. While plants exposed to 150 μM Cd showed a mortality rate of around 18%, the other treatments had a 100% survival rate. Regarding the total dry weight, a linear reduction was observed as a function of Cd concentrations ($R^2 = 0.97$) (Fig. 4B). Similarly, the tolerance index also decreased ($R^2 = 0.96$) with increasing Cd concentrations (Fig. 4C).

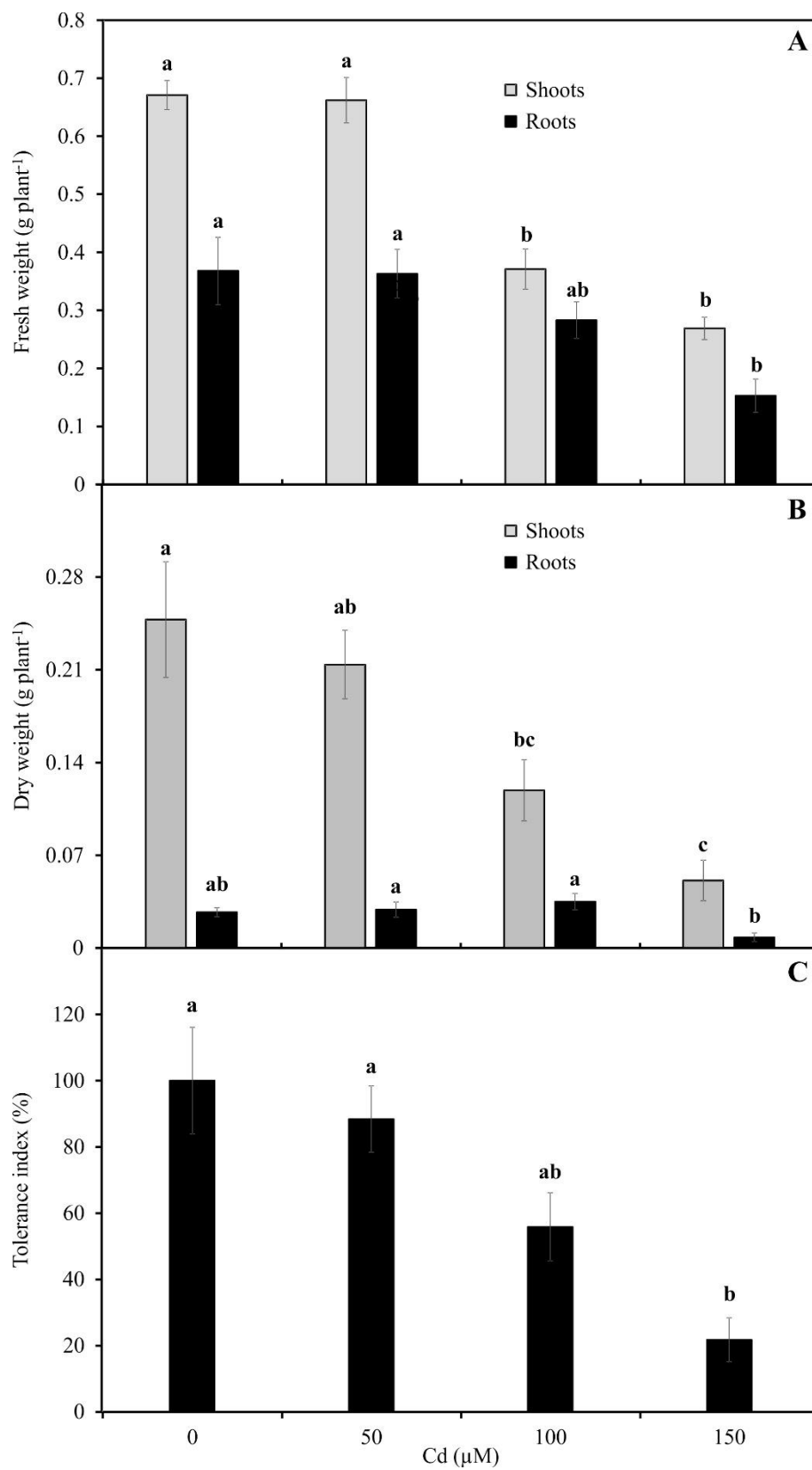


FIGURE 4. Growth traits and tolerance index (%) of *A. tenella* plants after 30 days of *in vitro* cultivation, exposed to different concentrations of cadmium (Cd) (0, 50, 100, or 150 μ M). From the Tukey test results, means ($\pm$ SE) for each trait denoted with the same letter are not significantly different at a 5% level of significance.

Discussion

In this study, Cd concentrations had a clear influence on physiological responses and the degree of tolerance of *A. tenella* plants. The changes observed in the content of photosynthetic pigments in plants may be related to changes in the content of ROS and chlorophyll catabolism as a result of the toxic effects of high Cd concentrations, as previously reported by Wiszniewska et al. (2017) and Wang et al. (2020). The decrease in the photosynthetic pigments content may be also associated with lipid peroxidation, damage to membranes and/or leaf tissues, and inactivation of enzymes (Maleki et al. 2017). In this study, the stress caused by Cd was confirmed in *A. tenella* by the reductions in Chl *a+b* content and Chl *a/b* ratio. This response is directly associated with an imbalance in the content of Chl *a* and Chl *b* and damage to the density of active reaction centers (RCs), as evidenced by the values of RC/CS_M. These reductions in the levels of photosynthetic pigments in plants grown with a high concentration of heavy metals can lead to a reduction in the rate of photosynthesis and deterioration of the photochemical activities of PSII (Farooq et al. 2016; Ulusu et al. 2017).

The analysis of chlorophyll *a* fluorescence kinetics indicated disturbances induced by the presence of Cd, which altered the reduction and/or oxidation of the plastoquinone pool (PQ) (Andrade Junior et al. 2019). The significant increase between the 0.3 (*V_K*) and 2 ms (*V_J*) points of the relative fluorescence (*V_{OP}*) indicates lower primary photochemical efficiency in plants exposed to stress conditions. This is a result of damage to the oxygen-evolving complex (OEC) and reduced quinone A (*Q_A⁻*) accumulation (Kalaji et al. 2014; Fryzova et al. 2017; Zhang et al. 2017). Changes in *V_K* values and photoinhibition of PSII in plants exposed to heavy metals

have been reported by previous studies (Huihui et al. 2020). These damages to the OEC result in a reduction in the supply of electrons and cause inhibition in the transfer of electrons on the acceptor side of the PSII (Gupta 2020). The reduction in OEC activity can induce incomplete water cleavage and generate H_2O_2 , which can lead to oxidative damage in the PSII (Zhang et al. 2017). Additionally, the observed increase in V_J values is indicative of partial blocking of electron transfer from Q_A to quinone B (Q_B) in the electron transport chain on the receiving side of the PSII, or even a deceleration of electron transport after Q_A (Chen et al. 2014). This effect was observed in this study since plants of *A. tenella* exposed to concentrations higher than 50 μM Cd showed a reduction in electron transfer beyond Q_A .

Positive K- and L-bands are indicators of physiological damage to plants even before any visual manifestations of such damages (Goltsev et al. 2016). An L-band with pronounced positive amplitude in plants grown in the presence of high Cd concentrations indicated disturbances in the *A. tenella* membranes of thylakoid and decreased connectivity between PSII subunits (Martins et al. 2020). This physiological effect was confirmed by increases in W_L values in plants exposed to Cd, especially the ones exposed to 150 μM of Cd. Similarly, a positive K-band is also related to physiological disorders and may indicate partial inactivation of the OEC (Kalaji et al. 2016). This partial inactivation of the OEC resulted in an increase in W_K , which represents damages to electron transport from the OEC to $P680^+$ (Pollastrini et al. 2017; Zhang et al. 2018).

An increase in the initial fluorescence values (F_0) may indicate a reduction in the number of active RCs and interpreted as a decrease in the constant rate of captured energy (Lotfi et al. 2018). F_0 changes without changes in F_m translate into a decrease in F_v . This reduction in F_v indicates structural damage to thylakoids and results in a decrease in ϕP_0 (F_v/F_m) and F_v/F_0 , which leads to lower photosynthetic efficiency and the occurrence of photodamage (Martins et al. 2015). The decrease of the F_v/F_0 ratio reflects the decline in electron transport due to the lower activity of the OEC on the electron donor side of the PSII (Pontes et al. 2020). Structural damage to thylakoids and impaired OEC activity was observed in plants exposed to Cd, as shown by the W_L and W_K values.

The decrease in ϕP_0 values due to the stress induced by Cd in *A. tenella* plants indicated photochemical damage and photoinhibition in PSII, which led to an increase in energy dissipation (ϕD_0). According to Martins et al. (2015), increases in

ϕD_0 reflect a reduction in the transport dynamics and use of the excitation energy of these plants. Decreases in the values of ϕE_0 and ψ_0 are also a sign of less efficient electron transport, especially from Q_A to Q_B (Emamverdian et al. 2015; Bonnano et al. 2017; Zhang et al. 2017).

The increase in ABS/RC and TR_0/RC observed in plants exposed to Cd indicate that there was inactivation of RCs, which can lead to the inactivation of OEC (Kalaji et al. 2014; Meng et al. 2016; Zhang et al. 2017). This can be confirmed by the values of F_0 , RC/CS_M , W_K , and the K-band. This result is also confirmed by the fact that there was a significant decrease in the Chl *a/b* ratio in plants exposed to Cd, which indicates a decrease in the number of active RCs. The reduction in active RCs indeed led to an increase in DI_0/RC , as well as ϕD_0 , and this translates into energy dissipation in the form of heat. The dissipated energy is considered as a protection mechanism against photodamage (Wang et al. 2016). Although a small increase in ET_0/RC values (22% higher) was observed in plants grown in the presence of 50 μM Cd, it did not lead to a significant increase in electron transport, as shown by the values of ϕE_0 and ψ_0 .

Photosynthetic performance parameters such as $PI_{(ABS)}$, $PI_{(total)}$, and structural ($SFI_{(ABS)}$) explain how the stress factors affected the performance and integrality of the photosynthetic apparatus (Kalaji et al. 2016). The decrease in $SFI_{(ABS)}$ and $PI_{(ABS)}$ in plants grown at 100 and 150 μM of Cd reflects the limitations of these plants in conserving energy to promote the good performance of PSII (Stibert et al. 2018). In addition, the reduced values of $PI_{(total)}$ in plants exposed to Cd indicated that the photodamages occurred beyond the intersystem (Yusuf et al. 2010; Kalaji et al. 2014).

Additional analyses based on modulated fluorescence showed the deleterious effects of Cd. The low values of $\Phi PSII$, qP , and qL , as well as ϕP_0 , indicate inhibition of PSII activity and reduction of the open state fraction of RCs (Andrade Junior et al. 2019; Imran et al. 2019). Furthermore, the decrease in ETR observed in plants exposed to Cd can be interpreted as a low functionality of thylakoids linked to the electron transport chain from PSII to PSI (Papadakis et al. 2007). This confirms the damage in the thylakoid membranes that was inferred from the values of W_L and positive amplitudes of the L-band.

The photodamages in plants exposed to Cd were also confirmed by the values of qN , ΦNO , and ΦNPQ . These parameters quantify the dissipation of excess energy

in the form of heat. The dissipation process is important because it prevents damage to the PSII caused by excess excitation energy (Öquist and Huner 1993). The decreased values of q_N and increased values of Φ_{NO} observed in plants cultivated in the presence of Cd indicated a lower photoprotective capacity (Shu et al. 2019; Lu et al. 2020). In this study, the dissipation of excess energy was performed in a less controlled manner as verified by Φ_{NPQ} . A significant reduction in Φ_{NPQ} values reflects a decrease in photoprotective mechanisms for dissipating excess excitation energy in a harmless form of heat (Chen et al. 2017). Therefore, such responses suggest that photoprotective regulation mechanisms have become partially ineffective.

The phytotoxic effects of Cd in high concentrations resulted in significant growth reductions, which led to less accumulation of fresh weight from *A. tenella* plants exposed to concentrations of 100 and 150 μM of Cd. In addition, the sensitivity to Cd observed in the performance of the photosynthetic apparatus was reflected in the TI. According to Lux et al. (2004), while TI values higher than 60 are considered high; values between 35 and 60 are intermediate; and low when lower than 35. In this study, *A. tenella* plants showed high and intermediate tolerance under 100 μM of Cd or lower. When exposed to higher concentrations (150 μM), these plants showed low tolerance, which is consistent with the values of fluorescence parameters. Thus, the physiological characteristics of *A. tenella* plants proved to be sensitive and efficient as indicators of the level of Cd in the environment.

Conclusion

In conclusion, exposure to high concentrations of Cd can modulate the physiological responses of *A. tenella* plants grown *in vitro*. The Cd leads to physiological changes that indicated less functionality and structural integrity of the photosynthetic apparatus (W_L , $SFI_{(ABS)}$, RC/CS_M , $Chl\ a/b$, and $PI_{(total)}$). The levels of physiological responses and tolerance were dependent on the concentration of Cd.

These characteristics indicate the potential and promising use of this species for bioindication and monitoring of areas contaminated with Cd.

References

- Andrade Junior, W.V., Oliveira Neto, C.F., Santos Filho, B.G., Amarante, C.B., Cruz, E.D., Okumura, R.S., Barbosa, A.V.C., Sousa, D.J.P., Teixeira, J.S.S., Botelho, A.S. (2019). Effect of cadmium on young plants of *Virola surinamensis*. *AoB Plants*. 11:plz022.
- Asopa, P.P., Bhatt, R., Sihag, S., Kothari, S.L., Kachhwaha, S. (2017). Effect of cadmium on physiological parameters of cereal and millet plants - a comparative study. *Int. J. Phytoremediat.* 19:225–230.
- Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O. (2017). New strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Pu.* 14:94.
- Benáková, M., Ahmadi, H., Dučaiová, Z., Tylová, E., Clemens, S., Tůma, J. (2017). Effects of Cd and Zn on physiological and anatomical properties of hydroponically grown *Brassica napus* plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24:20705–20716.
- Bonanno, G., Borg, J.A., Martino, V. (2017). Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: A comparative assessment. *Sci. Total Environ.* 576:796–806.
- Cabrita, M.T., Gameiro, C., Utkin, A.B., Duarte, B., Caçador, I., Cartaxana, P. (2016). Photosynthetic pigment laser-induced fluorescence indicators for the detection of changes associated with trace element stress in the diatom model species *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ. Monit. Assess.* 188:285.
- Carolin, C.F., Kumar, P.S., Saravanan, A., Joshiba, G.J., Naushad, M. (2017). Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* 5:2782–2799.
- Chen, S.G., Strasser, R.J., Qiang, S. (2014). *In vivo* assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiol. Biochem.* 84:10–21.

- Chen, Y., Wang, Z., Shen, Z., Ou, Z., Xu, D., Yuan, Z., Zhou, S. (2017). Effects of oxytetracycline on growth and chlorophyll fluorescence in rape (*Brassica campestris* L.). *Pol. J. Environ. Stud.* 26:995.
- Costa, M.B., Tavares, F.V., Martinez, C.B., Colares I.G., Martins C.M.G. (2018). Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. *Ecotox. Environ. Safe.* 155:117–124.
- Dogan, M. (2019). Effect of cadmium, chromium, and lead on micropropagation and physio-biochemical parameters of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. cultured *in vitro*. *Rend. Lincei Sci. Fis.* 30:351–366.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.* 2015:756120.
- Enya, O., Lin, C., Qin, J. (2019). Heavy metal contamination status in soil-plant system in the Upper Mersey Estuarine Floodplain, Northwest England. *Mar. Pollut. Bull.* 146:292–304.
- Farooq, M.A., Ali, S., Hameed, A., Bharwana, S.A., Rizwan, M., Ishaque, W., Faridc, M., Mahmood, K., Iqbal, Z. (2016). Cadmium stress in cotton seedlings: Physiological, photosynthesis and oxidative damages alleviated by glycinebetaine. *S. Afr. J. Bot.* 104:61–68.
- Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v.35, p.1039-1042, Nov. 2011.
- Fryzova, R., Pohanka, M., Martinkova, P., Cihlarova, H., Brtnicky, M., Hladky, J., Kynicky, J. (2017). Oxidative stress and heavy metals in plants. *Ver. Environ. Contam. T.* 245:129–156.
- Goltsev, V.N., Kalaji, H.M., Paunov, M., Băba, W., Horaczek, T., Mojski, J., Kociel, H., Allakhverdiev, S.I. (2016). Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus. *Russ. J. Plant Physiol.* 63:869–893.
- Gupta, R. (2020). Manganese Repairs the Oxygen-Evolving Complex (OEC) in Maize (*Zea mays* L.) Damage During Seawater Vulnerability. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20:1387–1396
- Huihui, Z., Xin, L., Zisong, X., Yue, W., Zhiyuan, T., Meijun, A., Yuehui, Z., Wenxu, Z., Nan, X., Guangyu, S. (2020). Toxic effects of heavy metals Pb and Cd on mulberry (*Morus alba* L.) seedling leaves: Photosynthetic function and reactive oxygen species (ROS) metabolism responses. *Ecotox. Environ. Safe.* 195:110469.
- Imran, M., Hu, S., Luo, X., Cao, Y., Samo, N. (2019). Phytoremediation through *Bidens pilosa* L., a nonhazardous approach for uranium remediation of contaminated water. *Int. J. Phytoremediat.* 21:752–759.
- Kalaji, H.M., Oukarroum, A., Alexandrov, V., Kouzmanova, M., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I.A., Cetner, M.D., Allakhverdiev, S.I., Goltsev, V. (2014). Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by *in vivo* chlorophyll a fluorescence measurements. *Plant Physiol. Biochem.* 30:1–10.

- Kalaji, H.M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I.A., Cetner, M.D., Łukasik, I., Goltsev, V., Ladle, R.J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiol. Plantarum*. 38:102.
- Kramer, D.M., Johnson, G., Kiirats, O., Edwards, G.E. (2004). New fluorescence parameters for the determination of Q_A , redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth. Res.* 79:209–218.
- Lima Neto, E., Guerra, M.B.B., Thomazini, A., Daher, M., Andrade, A.M., Schaefer, C.E.G.R. (2017). Soil contamination by toxic metals near an Antarctic refuge in Robert Island, Maritime Antarctica: a monitoring strategy. *Water Air Soil Pollut.* 228:66.
- Lotfi, R., Kalaji, H.M., Valizadeh, G.R., Behrozyar, E.K., Hemati, A., Gharavi-Kochebagh, P., Ghassemi, A. (2018). Effects of humic acid on photosynthetic efficiency of rapeseed plants growing under different watering conditions. *Photosynthetica*. 56:962–970.
- Lu, N.H., Wu, L.M., Yang, R., Li, H., Shan, C.J. (2020). Neodymium improves the activity of ascorbate-glutathione cycle and chloroplast function of wheat seedlings under chromium stress. *Photosynthetica*. 58:748–754.
- Lux, A., Sotnikova, A., Opatrna, J., Greger, M. (2004). Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiol. Plantarum*. 120:537–545.
- Maleki, M., Ghorbanpour, M., Kariman, K. (2017). Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. *Plant Gene*. 11:247–254.
- Manquían-Cerda, K., Escudey, M., Zúñiga, G., Arancibia-Miranda, N., Molina, M., Cruces, E. (2016). Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown *in vitro*. *Ecotox. Environ. Safe*. 133:316–326.
- Martins, J.P.R., Schimildt, E.R., Alexandre, R.S., Falqueto, A.R., Otoni, W.C. (2015) Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. *In Vitro Cell. Dev. Pl.* 51:471–481.
- Martins, J.P.R., Martins, A.D., Pires, M.F., Braga Junior, R.A., Reis, R.O., Dias, G.D.M., Pasqual, M. (2016). Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 126:43–57.
- Martins JPR.; RodrigueS LCA.; Silva TS.; Santos ER.; Falqueto AR.; Gontijo ABPL (2019) Sources and concentrations of silicon modulate the physiological and anatomical responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) during *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 137:397–410.
- Martins, J.P.R., Vasconcelos, L.L., Braga, P.D.C.S., Rossini, F.P., Conde, L.T., Rodrigues, L.C.A., Falqueto, A.R., Gontijo, A.B.P.L. (2020). Morphophysiological responses, bioaccumulation and tolerance of *Alternanthera tenella* Colla

(Amaranthaceae) to excess copper under in vitro conditions. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01917-z>

Men, C., Liu, R., Xu, F., Wang, Q., Guo, L., Shen, Z. (2018). Pollution characteristics, risk assessment, and source apportionment of heavy metals in road dust in Beijing, China. *Sci. Total Environ.* 612:138–147.

Meng, L.L., Song, J.F., Wen, J., Zhang, J., Wei, J.H. (2016). Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. *Photosynthetica.* 54:414–421.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15:473–497.

Öquist, G., Huner, N.P.A. (1993). Cold-hardening-induced resistance to photoinhibition of photosynthesis in winter rye is dependent upon an increased capacity for photosynthesis. *Planta.* 189:150–156.

Papadakis, I.E., Giannakoula, A., Antonopoulou, C.P., Moustakas, M., Avramaki, E., Therios, I.N. (2007). Photosystem II activity of *Citrus volkameriana* (L.) leaves as affected by Mn nutrition and irradiance. *Photosynthetica.* 45:208–213.

Pollastrini, M., Nogales, A.G., Benavides, R., Bonal, D., Finer, L., Fotelli, M., Gessler, A., Grossiord, C., Radoglou, K., Strasser, R.J., Bussotti, F. (2017). Tree diversity affects chlorophyll a fluorescence and other leaf traits of tree species in a boreal forest. *Tree Physiol.* 37:199–208.

Pontes, M.S., Graciano, D.E., Antunes, D.R., Santos, J.S., Arruda, G.J., Botero, E.R., Grillo, R., Lima, S.M., Andrade, L.H.C., Caires, A.R.L., Santiago, E.F., Santiago, E.F. (2020). *In vitro* and *in vivo* impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms. *J. Hazard. Mater.* 396:122484.

Rodrigues, L.C.A., Martins, J.P.R., Almeida Júnior, O., Guilherme, L.R.G., Pasqual, M., Castro, E.M. (2017). Tolerance and potential for bioaccumulation of *Alternanthera tenella* Colla to cadmium under in vitro conditions. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 130:507–519.

Shu, S., Yuan, R., Shen, J., Chen, J., Wang, L., Wu, J., Sun, J., Wang, Y., Shirong, G. (2019). The positive regulation of putrescine on light-harvesting complex ii and excitation energy dissipation in salt-stressed cucumber seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 162:283–294.

Socha, P., Bernstein, N., Rybanský, Ľ., Mészáros, P., Gálusová, T., Spieß, N., Libantová, J., Moravčíková, J., Matušíková, I. (2015). Cd accumulation potential as a marker for heavy metal tolerance in soybean. *Isr. J. Plant Sci.* 62:160–166.

Stirbet, A., Lazár, D., Kromdijk, J., Govindjee. (2018). Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynthetica.* 56:86–104.

Strasser, R.J., Srivastava, A., Tsimilli-Michael, M. (2004). Analysis of fluorescence transient, In: Papageorgiou, G., Govindjee (eds.). *Chlorophyll Fluorescence: a*

signature of photosynthesis, advances in photosynthesis and respiration, vol. 19, Springer, Dordrecht, pp.321–362.

Tsai, Y.C., Chen, K.C., Cheng, T.S., Lee, C., Lin, S.H., Tung, C.W. (2019). Chlorophyll fluorescence analysis in diverse rice varieties reveals the positive correlation between the seedlings salt tolerance and photosynthetic efficiency. *BMC Plant Biol.* 19:403.

Turkylmaz, A., Cetin, M., Sevik, H., Isinkaralar, K., Saleh, E.A.A. (2020). Variation of heavy metal accumulation in certain landscaping plants due to traffic density. *Environ. Dev. Sustain.* 22:2385–2398.

Ulus, Y., Öztürk, L., Elmastaş, M. (2017). Antioxidant capacity and cadmium accumulation in parsley seedlings exposed to cadmium stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 64:883–888.

Vongdala, N., Tran, H.D., Xuan, T.D., Teschke, R., Khanh, T.D. (2019). Heavy metal accumulation in water, soil, and plants of municipal solid waste landfill in Vientiane, Laos. *Int. J. Environ. Res. Pu.* 16:22.

Wang, Y.W., Xu, C., Lv, C.F., Wu, M., Cai, X.J., Liu, Z.T., Song, M.X., Chen, G.X., Lv, C.G. (2016). Chlorophyll a fluorescence analysis of high-yield rice (*Oryza sativa* L.) LYPJ during leaf senescence. *Photosynthetica.* 54:422–429.

Wang, P., Richter, A.S., Kleeberg, J.R.W. Geimer, S., Grimm, B. (2020). Post-translational coordination of chlorophyll biosynthesis and breakdown by BCMS maintains chlorophyll homeostasis during leaf development. *Nat. Commun.* 11:1254.

Wellburn, A.R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as total Carotenoides, Using Various solvents with Spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307–313.

Wilkins, D.A. (1957). A technique for the measurement of lead tolerance in plants. *Nature.* 180:37–38.

Wiszniewska, A., Hanus-Fajerska, E., Muszyńska, E., Smoleń, S. (2017). Comparative assessment of response to cadmium in heavy metal-tolerant shrubs cultured *in vitro*. *Water Air Soil Pollut.* 228:304.

Yousefi, Z., Kolahi, M., Majd, A., Jonoubi, P. (2018). Effect of cadmium on morphometric traits, antioxidant enzyme activity and phytochelatin synthase gene expression (SoPCS) of *Saccharum officinarum* var. cp48-103 *in vitro*. *Ecotox. Environ. Safe.* 157:472–481.

Yusuf, M.M., Kumar, D., Rajwanshi, R., Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Govindjee, Sarin, N.B. (2010). Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 1797:1428–1438.

Zhang, L., Su, F., Zhang, C., Gong, F., Liu, J. (2017). Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Int. J. Mol. Sci.* 18:33.

Zhang, H.H., Xu, N., Wu, X., Wang, J., Ma, S., Li, X., Sun, G. (2018). Effects of four types of sodium salt stress on plant growth and photosynthetic apparatus in sorghum leaves. *J. Plant Interact.* 13:506–513.

2.2. Capítulo II: ZINCO E CÁDMIO COMO FATORES MODULADORES DAS RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS DE *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

RESUMO

CLAIRVIL, Evens, M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2021; **MODULAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS E TOLERÂNCIA AO CÁDMIO (Cd) EM *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* E O POTENCIAL DO ZINCO (Zn) COMO MITIGADOR DE ESTRESSE INDUZIDO PELO Cd**; Orientadora: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Coorientador: João Paulo Rodrigues Martins.

O zinco (Zn) desempenha um papel importante no processo fisiológico das plantas devido ao seu potencial para aliviar os estressores presentes nas mesmas. As alterações morfofisiológicas são frequentemente induzidas por elementos-traço tóxicos para as plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas morfofisiológicas das plantas de *Alternanthera tenella* expostas a diferentes concentrações do cádmio (Cd) e Zn em condições controladas, além de verificar o potencial do Zn como amenizador de estresse induzido pelo Cd. Segmentos nodais de *A. tenella* crescidos em meio MS Zn-modificado (sem Zn) foram cultivados em frascos contendo meio MS semi-sólido suplementado com três níveis de Cd (0, 75

ou 150 μM) e Zn (0, 750 ou 1500 μM). Após 30 dias de cultivo foram avaliados o peso seco total das plantas, as alterações anatômicas das folhas e do caule, a fluorescência da clorofila *a* e o índice de tolerância (IT). As estruturas anatômicas (caulinares/foliares) das plantas apresentaram redução em função do Cd e Zn. Com a exposição apenas do Cd as plantas apresentaram distúrbios fisiológicos, comprometendo o seu crescimento. A suplementação de Zn no meio teve efeito positivo no desempenho fisiológico das plantas. Em concentrações $\leq 750 \mu\text{M}$ ele pode amenizar parcialmente os efeitos deletérios do Cd. As plantas cultivadas com Cd e Zn exibiram um IT intermediário ($\approx 40,68$). Os resultados comprovam o potencial do Zn como mitigador de estresse induzido pelo Cd nas plantas. Portanto, do ponto de vista ecotoxicológico, o excesso de ambos elementos-traço (Cd e Zn) representa toxicidade à espécie estudada.

Palavras-chave : Fitorremediação, cultura de tecidos, fluorescência da clorofila *a*, fluxo de transporte de elétrons, metal pesado.

ABSTRACT

CLAIRVIL, Evens, M.Sc .; Federal University of Espirito Santo; February 2021; **MORPHOPHYSIOLOGICAL MODULATIONS AND CADMIO TOLERANCE (Cd) IN *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE) DURING IN VITRO CULTIVATION AND THE ZINC POTENTIAL (Zn) AS STRESS MITIGATOR INDUCED BY Cd**; Advisor: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo, Co-advisor: João Paulo Rodrigues Martins.

Zinc (Zn) plays an important role in the physiological process of plants due to its potential to relieve the stressors present in them. Morphophysiological changes are often induced by trace elements toxic to plants. The objective of this work was to evaluate the morphophysiological responses of *Alternanthera tenella* plants exposed to different concentrations of cadmium (Cd) and Zn under controlled conditions, in addition to verifying the potential of Zn as a stress reliever induced by Cd. Nodal segments of *A. tenella* grown in Zn-modified MS medium (without Zn) were grown in flasks containing semi-solid MS medium supplemented with three levels of Cd (0, 75 or 150 μM) and Zn (0, 750 or 1500 μM). After 30 days of cultivation, the total dry weight of the plants, the anatomical changes of the leaves and stem, the fluorescence of chlorophyll a and the tolerance index (TI) were evaluated. The anatomical structures (stem/leaf) of the plants showed a reduction as a function of Cd and Zn. With the exposure of only Cd, the plants showed physiological disturbances, compromising their growth. The supplementation of Zn in the medium had a positive effect on the physiological performance of the plants. At concentrations $\leq 750 \mu\text{M}$ it can partially mitigate the harmful effects of Cd. Plants grown with Cd and Zn exhibited an intermediate TI (≈ 40.68). The results prove the

potential of Zn as a stress reliever induced by Cd in plants. Therefore, from an ecotoxicological point of view, the excess of both trace elements (Cd and Zn) represents toxicity to the studied species.

Keywords: Phytoremediation, tissue culture, chlorophyll a fluorescence, electron transport flow, heavy metal.

Lista de tabelas

TABELA 1 : Parâmetros do teste JIP obtidos a partir da fluorescência transitória da clorofila a (O-J-I-P) de acordo com Strasser et al. (2004), Ceppi et al. (2012), Goltstev et al. (2016) e Wang et al. (2016).....	51
--	----

Lista de figuras

FIGURA 1. Peso seco (g planta^{-1}) e índice de tolerância (%) de plantas de *Alternanthera tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas pela mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 55

FIGURA 2. Secções transversais do caule de plantas de *Alternanthera tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). co: colênquima, ep: epiderme, vb: feixe vascular, pi: medula. Barra = 200 μm 56

FIGURA 3. Características anatômicas do caule das plantas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Para cada característica anatômica, as médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 57

FIGURA 4. Secções paradérmicas e transversais de folhas de plantas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). st: estômato, ve: elemento de vaso. Barra = 100 μm . 58

FIGURA 5. Tamanho e densidade dos estômatos de folhas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Para cada característica anatômica, as médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn e minúsculas comparando as concentrações de Cd) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 58

FIGURA 6. Número de elementos de vaso de folhas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas da mesma letra (maiúsculas

comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.59

FIGURA 7. Fluorescência variável relativa de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). A-C: fluorescência variável relativa entre F_0 e F_M (V_{OP}); D: fluorescência variável relativa no ponto K (0,3 ms); D: fluorescência variável relativa no ponto J (2 ms); D: fluorescência variável relativa no ponto (30 ms). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 20$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 61

FIGURA 8. Fluorescência transiente da clorofila a entre os pontos O – K e O – J de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). A-C: diferenças cinéticas entre os pontos O e K, mostrando a banda L; D: valores de W_K (representa as alterações na fluidez da membrana dos tilacóides e os danos à sua função e integridade estrutural). E-G: diferenças cinéticas entre os pontos O e J, mostrando a banda K; H: valores de W_K (representa danos no complexo de evolução do oxigênio). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 20$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 62

FIGURA 9. Normalização da fluorescência transiente da clorofila a entre F_0 e F_I ($V_{OI} \geq 1,0$) de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). 63

FIGURA 10. Amplitude da fluorescência variável relativa do aumento de I para P (ΔV_{IP}) e parâmetros do teste JIP de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 20$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 66

INTRODUÇÃO

A contaminação e acúmulo de poluentes industriais no ambiente devido às atividades antrópicas podem levar a prejuízos potenciais à saúde humana decorrentes da exposição contínua de seus componentes (JEONG et al., 2020). Dentre os elementos poluentes e prejudiciais ao ecossistema estão os elementos-traço que podem se acumular no ar, água e solo, principalmente nas áreas de mineração onde seu nível de biodisponibilidade pode ser elevado (LOGIEWA et al., 2020; WANG et al., 2017).

Os elementos-traço podem apresentar efeitos distintos nas plantas (SHAHID et al., 2015; XU et al., 2019). Alguns metais como cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe), cobalto (Co) e manganês (Mn) são considerados essenciais e possuem função conhecida no metabolismo celular das plantas (LANGE et al., 2017; MARTINS et al., 2020). Em contraste, outros como cádmio (Cd), chumbo (Pb), prata (Ag) e mercúrio (Hg) não apresentam qualquer papel metabólico nas plantas e podem induzir sintomas de toxicidade (AMARI et al., 2017; KARRI et al., 2017).

A presença de elementos-traço como Cd em altas concentrações nas plantas pode limitar o crescimento, diminuir o conteúdo de pigmentos, induzir distúrbios no desempenho fotossintético e na anatomia, danos celulares causados pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), além de apresentar sintomas visuais de

estresse como clorose ou necrose e até a morte das plantas (AHMAD et al. 2015; AMARI et al., 2017). Para algumas espécies vegetais, o Cd também pode revelar-se tóxico mesmo em quantidades mínimas, sendo frequentemente considerado como elemento contaminante que prejudica o bom desempenho das atividades fisiológicas ou bioquímicas pela sua presença em plantas (AMARI et al., 2017; SAMIEI et al., 2020).

O Zn é um elemento importante para as plantas, pois desempenha o papel de regulador de processos fisiológicos e metabólicos (cofator das peroxidases, regulador na multiplicação celular) (VERMA et al., 2016; STURIKOVA et al., 2018). Além disso, a concentração de Zn influencia o crescimento e desenvolvimento, bem como o desempenho do fotossistema I (FSI) e/ou fotossistema II (FSII) das plantas (MAZAHERI-TIRANI et al., 2019). Em altas concentrações, o Zn pode competir com outros metais nos sítios de absorção, reduzindo a área foliar, induzindo estresse oxidativo, clorose ou necrose nas plantas, dentre outros efeitos deletérios (ADHIKARI et al., 2016). Dessa forma, a toxicidade dos metais nas plantas depende de seu nível de concentração.

A co-exposição de Cd e Zn nas plantas poderia permitir a desintoxicação induzida pelo Cd e o bom funcionamento das funções celulares. Estudos realizados anteriormente sobre a co-exposição desses dois metais (Cd e Zn) em plantas de *Alternanthera tenella* e de *Cosmos bipinnatus* têm mostrado que o Zn pode estimular a absorção de Cd, proteger as plantas contra os efeitos fitotóxicos ou contribuir na desintoxicação desse metal (RODRIGUES et al., 2017; DU et al. 2020). Em uma perspectiva mais avançada, o presente trabalho examinou o nível dos distúrbios induzidos pelo Cd no aparato fotossintético (por meio da fluorescência da clorofila a) em plantas de *A. tenella* e o papel desempenhado pelo Zn na atenuação de estresse induzido por esse elemento-traço não essencial.

Muitas técnicas podem ser desenvolvidas pelas plantas para sobreviver e se reproduzir mesmo com a presença de altas concentrações de elementos-traço no seu ambiente, até absorver ou acumular poluentes na sua biomassa; a fitorremediação é uma dessas técnicas (CAROLIN et al.2017; RODRIGUES et al., 2017). Algumas espécies da família Amaranthaceae, como *A. tenella*, já foram identificadas por sua capacidade de acumular e estabilizar contaminantes presentes

em solos degradados por mineração ou atividades antrópicas, do ponto de vista ecotoxicológico (PEREIRA et al., 2016; AYANGBENRO et al., 2017; MEN et al., 2018).

A avaliação das respostas morfofisiológicas das plantas sob o efeito de elementos-traço durante o seu desenvolvimento e crescimento pode ser realizada em condições *in vitro*. O cultivo *in vitro* permite um estudo criterioso dos processos fisiológicos e anatômicos, além de isolar os efeitos dos agentes estressores nas plantas (MARTINS et al., 2016; MARTINS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2017). Análises da fluorescência da clorofila *a* em plantas cultivadas sob estresse também podem ser vantajosas para avaliar as alterações fotoquímicas no fotossistema II (FSII) e/ou fotossistema I (FSI) causadas pelos elementos-traço nas plantas (MARTINS et al., 2016).

Tendo em vista o potencial bioacumulador da espécie *A. tenella* apontado por Rodrigues et al. (2017), análises adicionais dos seus mecanismos fisiológicos latentes podem ajudar a entender as estratégias de tolerância ao Cd inclusive em co-exposição ao Zn. Assim, objetivou-se com esse trabalho avaliar as respostas morfofisiológicas das plantas de *A. tenella* expostas a diferentes concentrações do Cd e Zn em condições controladas, além de verificar o potencial do Zn como amenizador de estresse induzido pelo Cd.

Material e métodos

Material vegetal e exposição ao Cd e Zn

Segmentos nodais ($2,5 \pm 0,5$ cm) obtidos de plantas de *A. tenella* previamente cultivadas *in vitro* conforme descrito por Rodrigues et al. (2017) foram empregados como explantes. O material vegetal foi sub-cultivado por 45 dias em frascos de vidro de 500 mL contendo 30 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) modificado (ausência de Zn). A partir dessas plantas foram retirados então novos segmentos nodais, os quais foram transferidos para frascos de vidro de 500 mL contendo 30 mL de meio MS modificado, acrescido das concentrações de Zn (0, 750 ou 1500 μM). Os tratamentos com Zn foram combinados com três níveis de Cd (0, 75 ou 150 μM), totalizando nove tratamentos. O nitrato de cádmio [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] e o sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram empregados como fontes de Cd e Zn, respectivamente.

Em todas as etapas os meios foram suplementados com 20 g L^{-1} de sacarose e solidificados com 6 g L^{-1} de ágar. O pH de todos os meios de cultivo foi ajustado em 5,8 e autoclavado à 120 ° C por 20 minutos e o material vegetal foi mantido em sala de crescimento por 45 dias (multiplicação) e por 30 dias (co-exposição do Zn-Cd) à 26 ± 2 ° C, com fotoperíodo de 16 horas (08:00 h às 00:00 h) sob lâmpadas LED slim (Blumenau® 36W/6500K), emitindo 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa.

Crescimento vegetal e índice de tolerância (IT)

Aos 30 dias de cultivo as plantas de *A. tenella* foram lavadas em água corrente e as características de crescimento foram analisadas em 25 plantas por tratamento, as quais foram aleatoriamente divididas em cinco parcelas distintas (repetições). A quantificação do peso seco (PS) total (g planta^{-1}) (parte aérea + raízes) foi realizada com auxílio de uma balança analítica. O peso seco das plantas (parte aérea e raiz) de *A. tenella* de cada tratamento também foi usado para os cálculos do IT segundo a metodologia proposta por Wilkins, (1957). O IT foi determinado da seguinte forma: $\text{IT} = [(\text{PS}_{\text{tratamento}}) / (\text{PS}_{\text{controle}})] \times 100$, com valores

variantes de IT que podem ir de 0 (sensibilidade máxima = 0%) a 100 (tolerância máxima = 100%).

PS_{tratamento} = Peso seco das plantas cultivadas em meio contendo elemento(s)-traço.

PS_{controle} = Média geral do peso seco das plantas no tratamento controle (0 μ M Cd + 0 μ M Zn).

Análises anatômicas

Ao final do experimento as características anatômicas das plantas de *A. tenella* também foram analisadas. Cinco plantas de cada tratamento foram coletadas aleatoriamente e fixadas em uma solução FAA (formaldeído, ácido acético e etanol a 50% na proporção de 0,5:0,5:9).

Secções transversais do caule (segundo entrenó a partir do ápice) e das folhas (primeira folha completamente expandida a partir do ápice) foram realizadas à mão livre com auxílio de uma lâmina de aço. As secções foram clarificadas com 30% (v/v) de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo), seguido de lavagem para remoção da solução clarificante e coradas com solução de azul de astra (1%) e safranina 1% (KRAUS e ARDUIN, 1997).

Secções paradérmicas também foram realizadas na segunda folha completamente expandida a partir do ápice. Para tal análise, as folhas foram clarificadas em solução de hidróxido de sódio a 5% (volume/peso) e coradas com safranina (MARTINS et al., 2020).

As análises anatômicas foram realizadas em cinco amostras (repetições) diferentes por tratamento. Após a montagem das lâminas, fotomicrografias das secções transversais e paradérmicas foram obtidas com auxílio de um microscópio óptico (Bioval, L-2000A-Flur) acoplado a uma câmera digital Leica EC3 (Wetzlar,

Alemanha). A mensuração das características anatômicas foram realizadas com auxílio do software UTHSCSA-Imagetool® calibrado com uma régua microscópica. As fotomicrografias do caule e folhas foram obtidas de duas secções transversais distintas para cada órgão e as paradérmicas em quatro campos por amostra (repetição). Nas secções caulinares, o número de feixes vasculares e área transversal (μm^2) foram mensurados. Nas secções foliares, foram analisados número de elemento de vaso, densidade estomática (mm^2) bem como o tamanho dos estômatos (μm^2).

Avaliação da cinética de emissão de fluorescência transiente ou multifásica (O-J-I-P) e do teste JIP

As avaliações da cinética de emissão da fluorescência transiente da clorofila a das plantas de *A. tenella* expostas às diferentes concentrações do Cd e Zn foram feitas após 30 dias de cultivo em 20 plantas por tratamento, entre 8:00 h e 10:00 horas e com o auxílio de um fluorômetro portátil HandyPEA (Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, Reino Unido). As mensurações foram realizadas na segunda folha plenamente expandida a partir do ápice. A área foliar analisada foi previamente adaptada ao escuro com o uso de clips foliares (Hansatech®), por 30 minutos. Com base nas intensidades de fluorescência foram obtidos os parâmetros do teste JIP, bem como os transientes OJIP. O tratamento sem a adição de Cd e Zn (0 μM Cd + 0 μM Zn) foi considerado o controle. A interpretação e normalização dos parâmetros do teste JIP estão mostrados na Tabela 1.

TABELA 1. Parâmetros do teste JIP obtidos a partir da fluorescência transitória da clorofila a (O-J-I-P).

Termos e fórmulas	Descrição
$F_{20\mu\text{s}}$	Sinal mínimo de fluorescência medido a 20 μs (corresponde à F_0).

$F_{300\mu s}$	Intensidade de fluorescência aos 300 μs .
$F_L = F_{0,15ms}$	Intensidade de fluorescência aos 0,15 ms.
$F_K = F_{0,30 ms}$	Intensidade de fluorescência aos 0,30 ms.
$F_J = F_{2ms}$	Intensidade de fluorescência aos 2 ms.
$F_I = F_{30ms}$	Intensidade de fluorescência em 30 ms.
$F_P = F_{300ms} \approx F_M$	Intensidade de fluorescência aos 300 ms.
F_0	Fluorescência inicial.
F_M	Fluorescência máxima.
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável.
F_V/F_0	Razão de eficiência quântica fotoquímica para não fotoquímica (atividade potencial de FSII)
$M_0 = dv/dt_0 = [4 \times (F_{300\mu s} - F_0) / (F_M - F_0)]$	Taxa líquida de fechamento do fotossistema II.
F_t	Fluorescência no tempo t após o início da iluminação actínica.
$V_{OP} = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa no tempo t
$V_K = (F_K - F_0)/(F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa na fase K (0,30 ms) da curva de indução de fluorescência.
$V_J = (F_J - F_0) / (F_M - F_0)$	Fluorescência variável relativa na fase J (2 ms) da curva de indução de fluorescência.
$V_I = (F_I - F_0) / (F_M - F_0) (\geq 1.0)$	Fluorescência variável relativa na fase I (30 ms) da curva de indução de fluorescência.
$\Delta V_{IP} = (F_P - F_I) / (F_P - F_0)$	Amplitude da fluorescência variável relativa do aumento de I para P = contribuição relativa do aumento de I para P para o aumento de OJIP.
$W_L = (F_L - F_0) / (F_K - F_0)$	Representa as alterações na fluidez da membrana tilacóide e os danos à sua função e integridade estrutural.
$W_K = (F_K - F_0) / (F_J - F_0)$	Representa danos complexo de evolução do oxigênio (CEO).
$K_p = (ABS/CS) \times k_F \times (1/F_0 - 1/F_M)$	Constante de taxa de desexcitação fotoquímica.
$\phi P_0 = TR_0/ABS = 1 - F_0/F_M = F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo da fotoquímica primária (t = 0).
$\phi E_0 = ET_0/ABS = [1 - (F_0/F_M)] \times \psi E_0 = \phi P_0 \times \psi E_0$	Rendimento quântico do transporte de elétrons (t = 0).
$\phi D_0 = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico de dissipação de energia (t = 0)

$\phi R_0 = RE_0/ABS = \phi P_0 \times \psi E_0 \times \delta R_0$	Rendimento quântico para a redução de aceptores de elétrons terminais no lado aceitador de FSI (RE).
$\psi E_0 = ET_0/TR_0 = (1 - V_J)$	Probabilidade de um elétron se mover além do Q_A^- .
$\psi R_0 = (1 - V_I)$	Eficiência / probabilidade com a qual um elétron capturado do FSII ser transferido para aceptores do FSI.
$ABS/RC = M_0 \times (1/V_J) \times (1/\phi P_0)$	Fluxo de energia absorvida por centro de reação (RC) ativo ou tamanho aparente do complexo antena de um centro de reação ativo do FSII.
$TR_0/RC = M_0 \times (1/V_J)$	Fluxo de energia capturada por RC ativo.
$ET_0/RC = M_0 \times (1/V_J) \times \psi E_0$	Fluxo de elétrons transportados por RC.
$DI_0/RC = ABS/RC - TR_0/RC$	Fluxo de energia dissipada por RC ativo
$RC/CSm = CSm/ABS = \phi P_0 \times (V_J/M_0) \times ABS/CSm$	Densidade de RC ativos por secção transversal.
$SFI_{(ABS)} = (RC/ABS) \times \phi P_0 \times \psi E_0$	Índice de estrutura e funcionamento do FSII.
$PI_{total} = PI_{(ABS)} \times [\delta R_0/(1 - \delta R_0)]$	Índice de desempenho total (até os aceptores finais de elétrons do FSI).

Para revisão, consulte Strasser et al. (2004), Ceppi et al. (2012), Goltstev et al. (2016) e Wang et al. (2016).

Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e em esquema fatorial (3×3), com 3 níveis de Cd (0, 75 e 150 µM) e 3 níveis de Zn (0, 750 e 1500 µM). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de agrupamento Scott-Knott, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com auxílio do programa Sisvar® (FERREIRA, 2011).

Resultados

Efeitos devidos à co-exposição dos ambos elementos-traço (Cd e Zn) foram detectados em todos os parâmetros e ocasionaram modificações morfofisiológicas em plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro*. Diferenças em todos os parâmetros foram encontradas com interação significativa observada tanto nas características de crescimento, na anatomia do caule e das folhas, nos parâmetros de fluorescência transitória da clorofila a e no índice de tolerância.

Características de crescimento das plantas in vitro e índice de tolerância

Após 30 dias de exposição das plantas de *A. tenella* às diferentes concentrações de Cd e/ou Zn, foram observadas diferenças morfológicas no crescimento e no índice de tolerância (IT) (Fig. 1). As plantas cultivadas sem Zn e expostas à 75 ou 150 μM Cd apresentaram necrose e uma taxa de mortalidade de aproximadamente 45%. Sintomas visuais que indicaram toxicidade, como clorose e necrose foliar também foram observados em plantas cultivadas sob a co-exposição de altas concentrações dos metais (75 ou 150 μM + 1500 μM Zn). Com relação as características de crescimento, o peso seco total das plantas apresentou um decréscimo em função das concentrações de Cd quando as plantas foram expostas à 750 e 1500 μM Zn. As plantas cultivadas sem Cd apresentaram maior peso seco total (Fig. 1A). As concentrações de Cd influenciaram também o IT das plantas, sendo observada uma redução linear em função das concentrações de Cd. O IT foi maior nas plantas cultivadas sem Cd e naquelas cultivadas com suplementação de Zn (Fig. 1B).

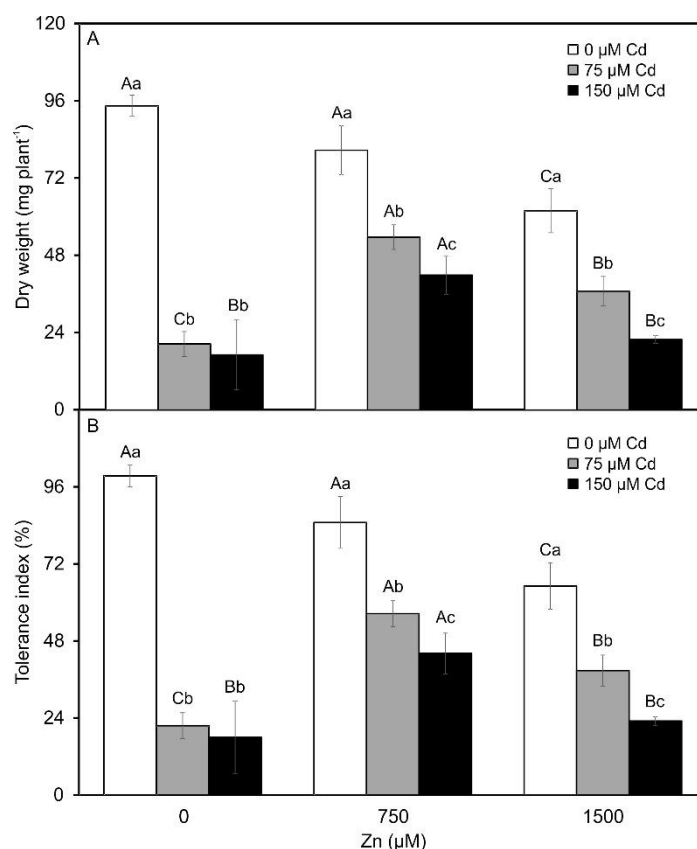


FIGURA 1. Peso seco (g planta⁻¹) e índice de tolerância (%) de plantas de *Alternanthera tenella* aos 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Médias (± erro padrão), $n = 5$, seguidas pela mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Análises anatômicas (caulinares/folhares)

Dentre as características da anatomia caulinar, a área da seção transversal do caule foi afetada apenas pelas concentrações crescentes de Zn, enquanto o número de feixes vasculares sofreu efeito simultâneo do Cd e do Zn (interação entre os fatores).

As plantas cultivadas sem Zn (0 μM) apresentaram os menores valores para área transversal em comparação com as plantas cultivadas com Zn (Fig. 2; Fig. 3A). As plantas crescidas com 0 e 1500 μM Zn apresentaram valores semelhante para o número de feixes vasculares. Dentre as plantas cultivadas com 75 μM Cd, os maiores valores foram observados naquelas expostas à 1500 μM Zn (Fig. 3B).

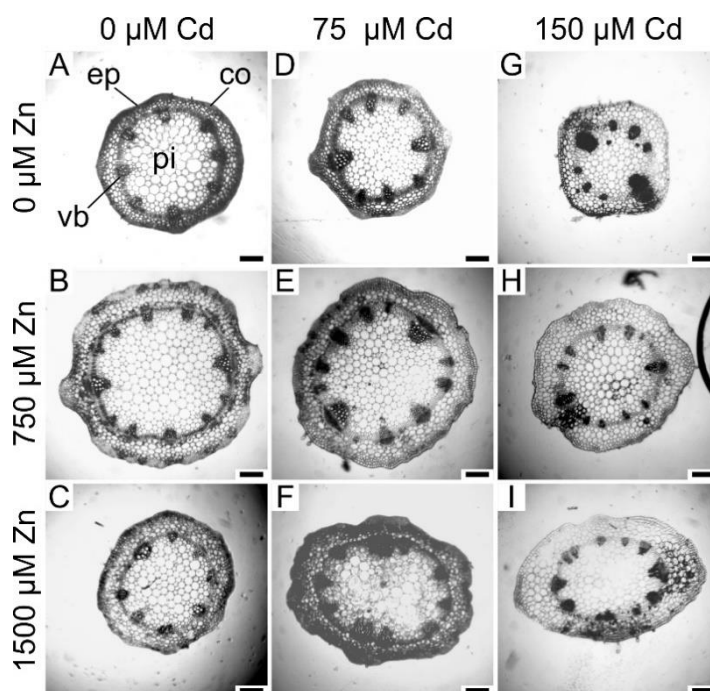


FIGURA 2. Secções transversais do caule de plantas de *Alternanthera tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). co: colênquima, ep: epiderme, vb: feixe vascular, pi: medula. Barra = 200 μm .

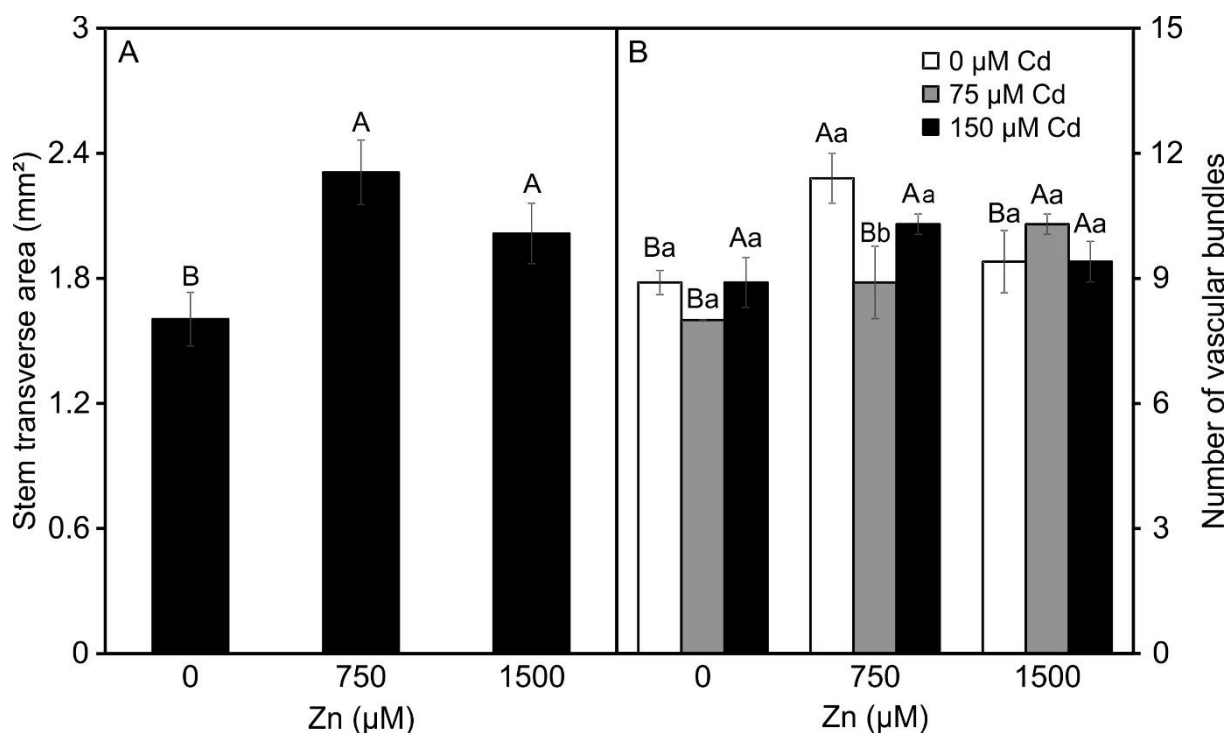


FIGURA 3. Características anatômicas do caule das plantas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 µM) e Zn (0, 750 e 1500 µM). Para cada característica anatômica, as médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Nas folhas, o tamanho dos estômatos foi influenciado apenas pelas concentrações de Cd e a densidade estomática sofreu efeitos de ambos os metais, porém de forma independente (sem interação). As plantas cultivadas com 75 µM Cd apresentaram os maiores estômatos (Fig. 4; Fig. 5A). A densidade estomática aumentou em função das concentrações de Zn. Quando comparada a densidade estomática entre os tratamentos com Cd, um decréscimo acentuado foi verificado nas plantas expostas a esse metal (Fig. 4; Fig. 5B).

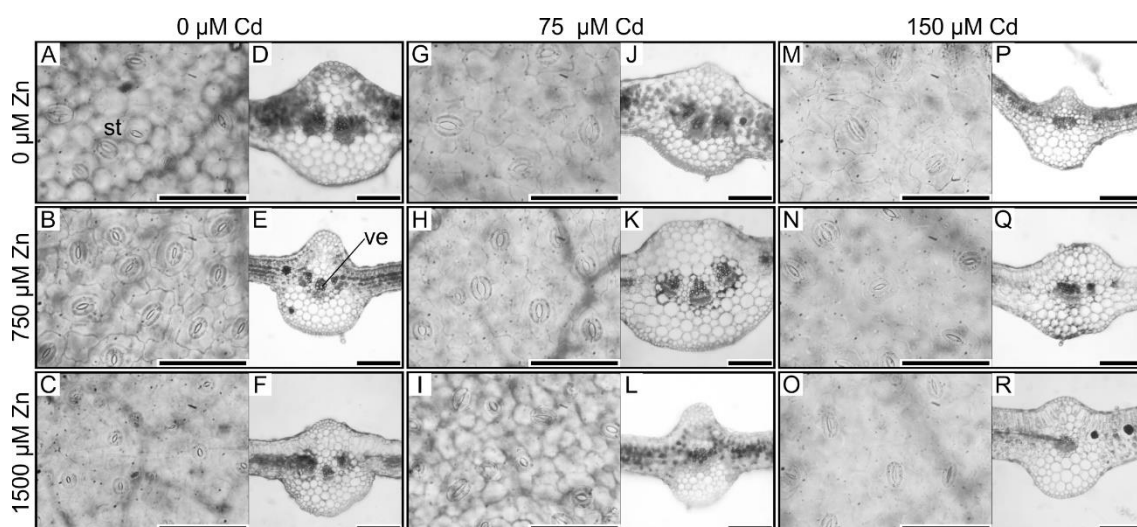


FIGURA 4. Secções paradérmicas e transversais de folhas de plantas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). st: estômato, ve: elemento de vaso. Barra = 100 μm .

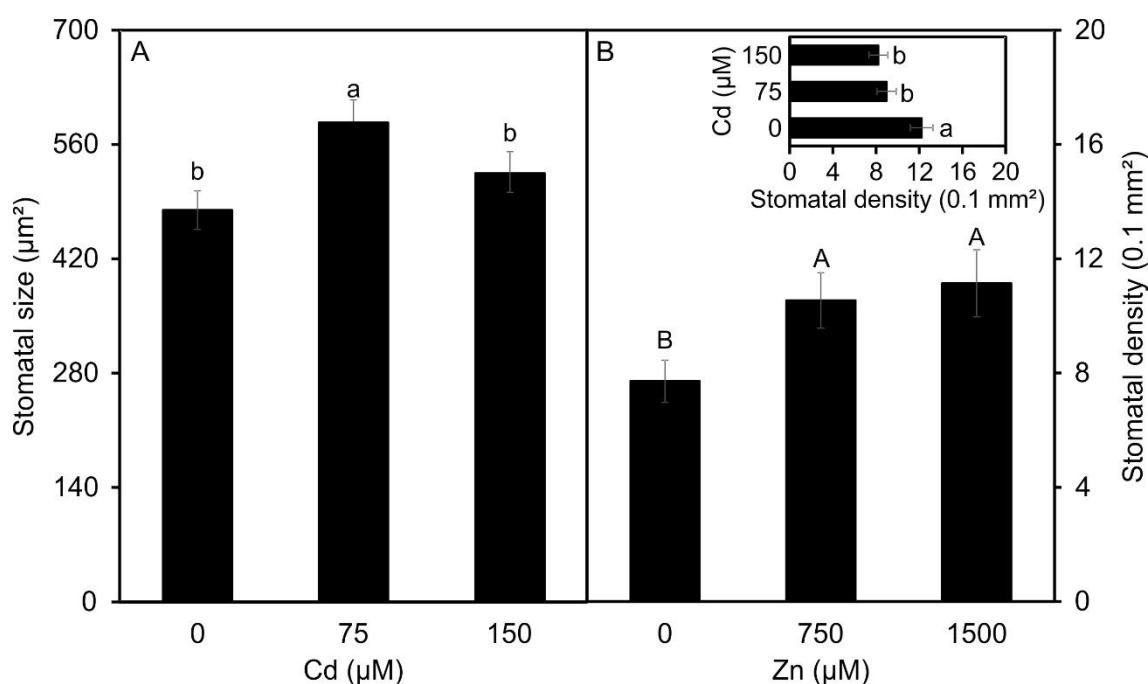


FIGURA 5. Tamanho e densidade dos estômatos de folhas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Para cada característica anatômica, as médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn e minúsculas comparando as concentrações de Cd) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

O número de elementos de vaso, por sua vez, foi influenciado conjuntamente pelo Cd e Zn. Nas folhas crescidas em meio sem Zn, o número de elementos de vaso apresentou um decréscimo em função das concentrações de Cd. Além disso, o número de elemento de vaso foi pronunciado em folhas cultivadas em meio com 750 μM Zn e 75 μM Cd. Na maior concentração de Cd (150 μM), o aumento da concentração de Zn induziu um maior número de elementos de vaso (Fig. 4; Fig. 6).

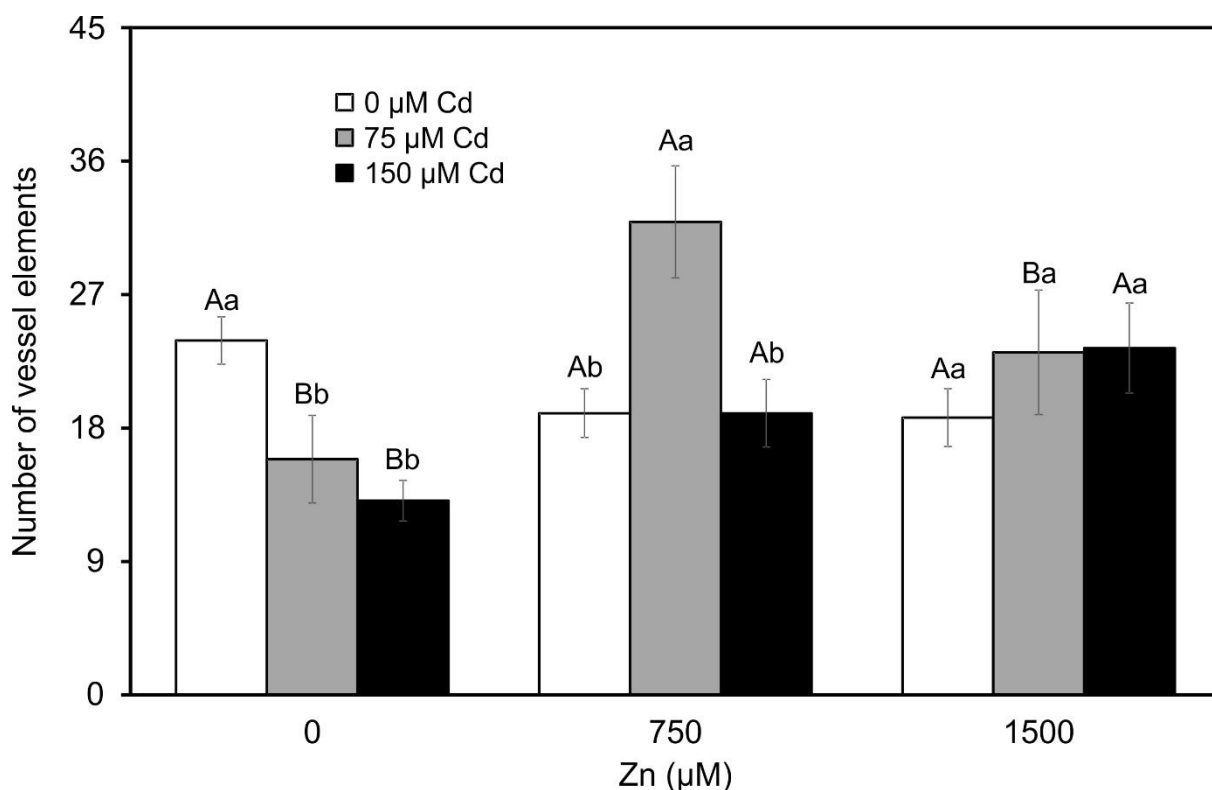


FIGURA 6. Número de elementos de vaso de folhas de *A. tenella* aos 30 dias de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 5$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fluorescência transiente da clorofila a das plantas in vitro

O Cd e o Zn impactaram o aparato fotossintético das plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro* (Figs. 7-10). Alterações foram verificadas em todos os parâmetros do teste JIP e houve interação entre as concentrações de Cd e Zn sobre todas as variáveis relativas à fluorescência. As plantas não expostas ao Cd tiveram uma redução dos valores de V_K e V_J quando cultivadas com Zn; todavia, os valores de V_I foram semelhantes independentemente das concentrações de Zn (Fig. 7). Em contraste, as plantas expostas ao Cd tiveram um aumento de V_K e V_J com o aumento da concentração de Zn (Fig. 7D-E). Os valores de V_I foram maiores nas plantas cultivadas com 150 μM Cd e/ou 1500 μM Zn (Fig. 7F).

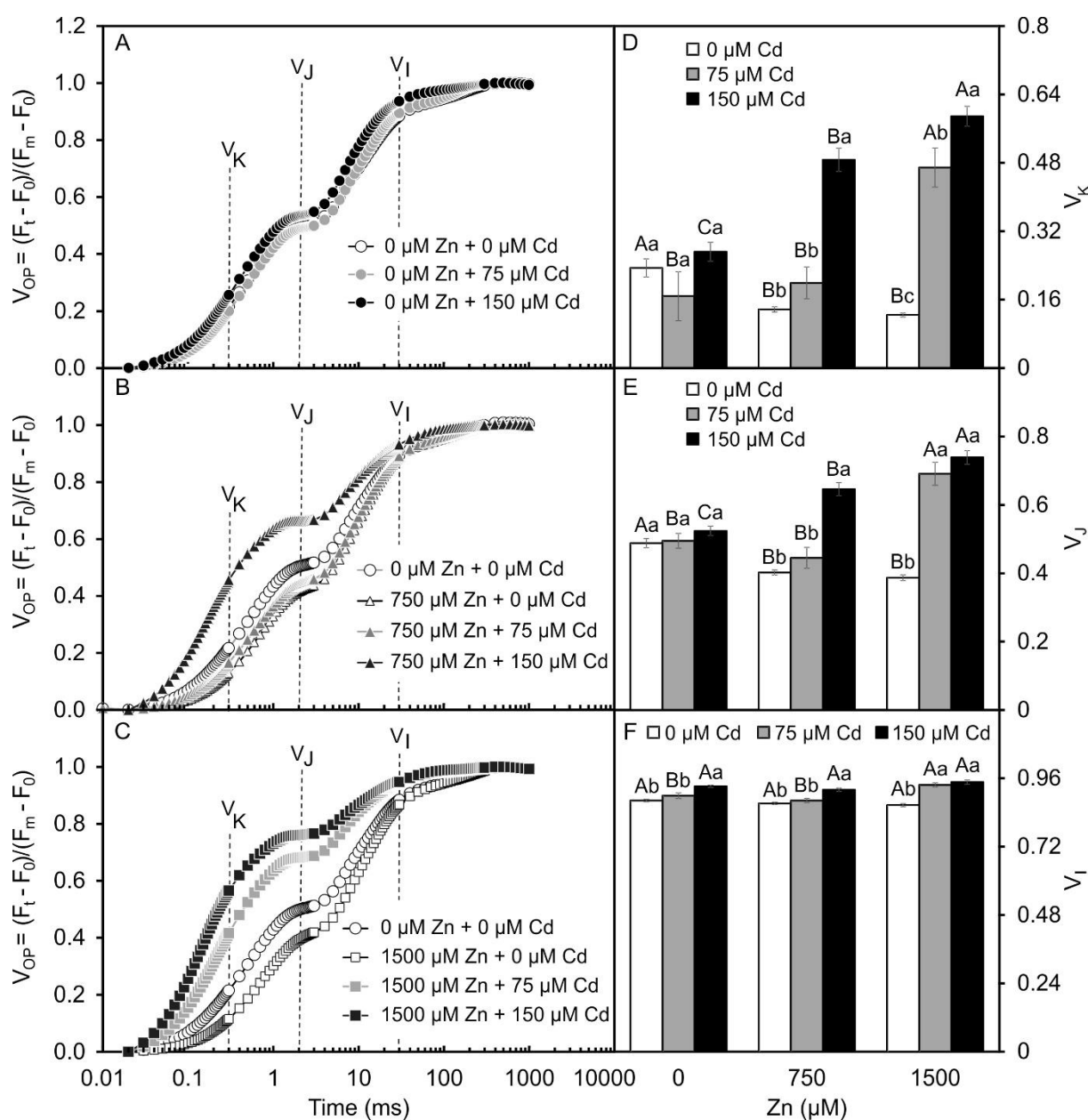


FIGURA 7. Fluorescência variável relativa de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). A-C: fluorescência variável relativa entre F_0 e F_M (V_{OP}); D: fluorescência variável relativa no ponto K (0,3 ms); E: fluorescência variável relativa no ponto J (2 ms); F: fluorescência variável relativa no ponto (30 ms). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 20$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Alterações na funcionalidade e integridade da membrana dos tilacóides (W_L) e do complexo de evolução do oxigênio (CEO) (W_K) foram influenciados por ambos os fatores. Aumentos pronunciados de W_L e W_K foram observados principalmente nas plantas co-expostas à 150 μM Cd e 750 ou 1500 μM Zn. De forma similar, aumentos nos valores de W_L e W_K também foram verificados nas plantas cultivadas com 75 μM Cd + 1500 μM Zn.

Essas respostas foram confirmadas pela formação de amplitudes positivas das banda-L e banda-K nesses tratamentos (Fig. 8).

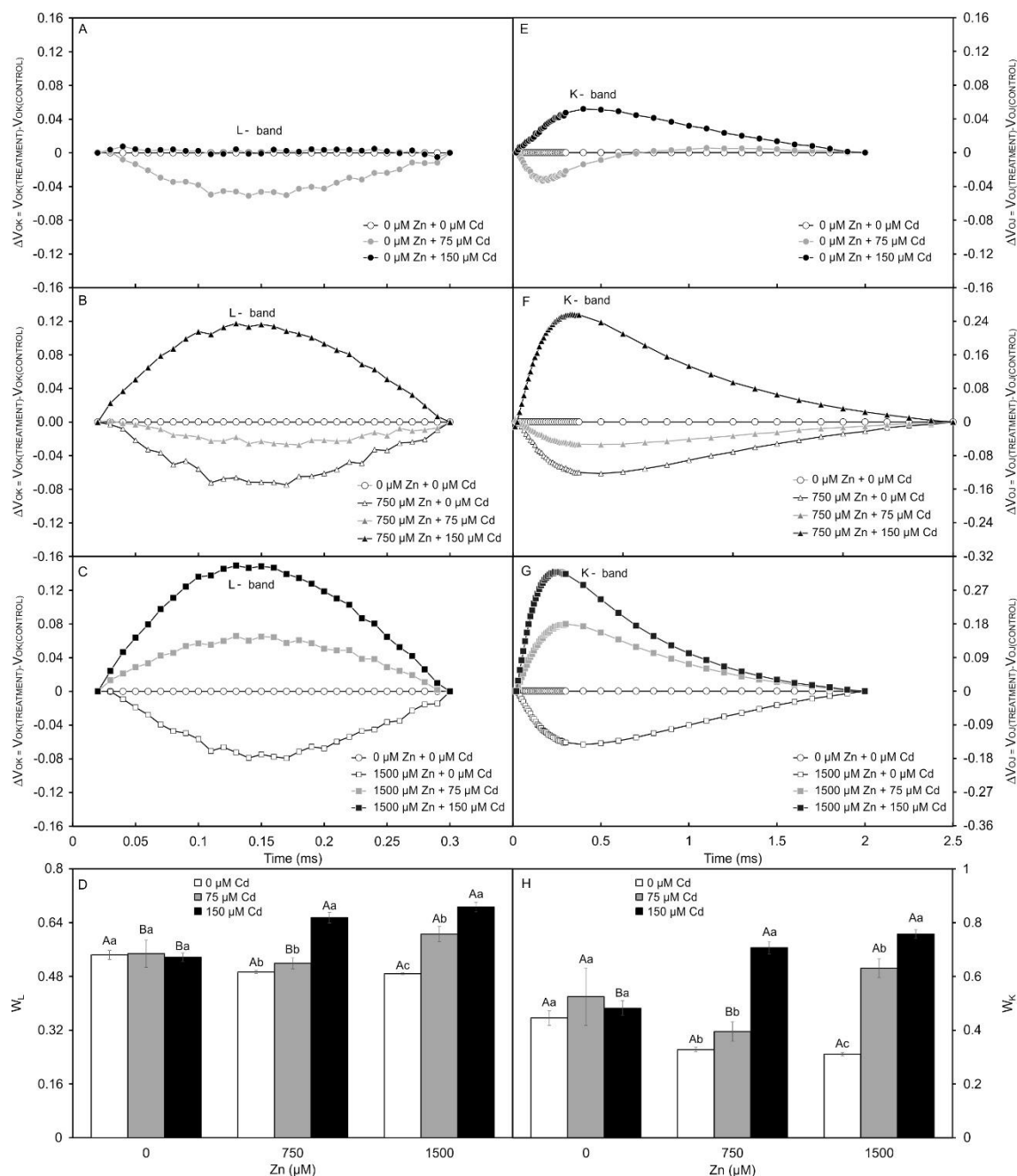


FIGURA 8. Fluorescência transiente da clorofila a entre os pontos O – K e O – J de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). A-C: diferenças cinéticas entre os pontos O e K, mostrando a banda L; D: valores de W_k (representa as alterações na fluidez da membrana dos tilacóides e os danos à sua função e integridade estrutural). E-G: diferenças cinéticas entre os pontos O e J, mostrando a banda K; H: valores de W_k (representa danos no complexo de evolução do oxigênio). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 20$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Alterações na fase O-I ($V_{OI} \geq 1,0$) também foram verificadas em função dos tratamentos. Plantas expostas à 150 μM Cd tiveram uma menor amplitude em relação às aquelas cultivadas sem Cd. As plantas co-expostas ao Cd e 1500 μM Zn também tiveram uma redução da amplitude da curva $V_{OI} \geq 1,0$ (Fig. 9).

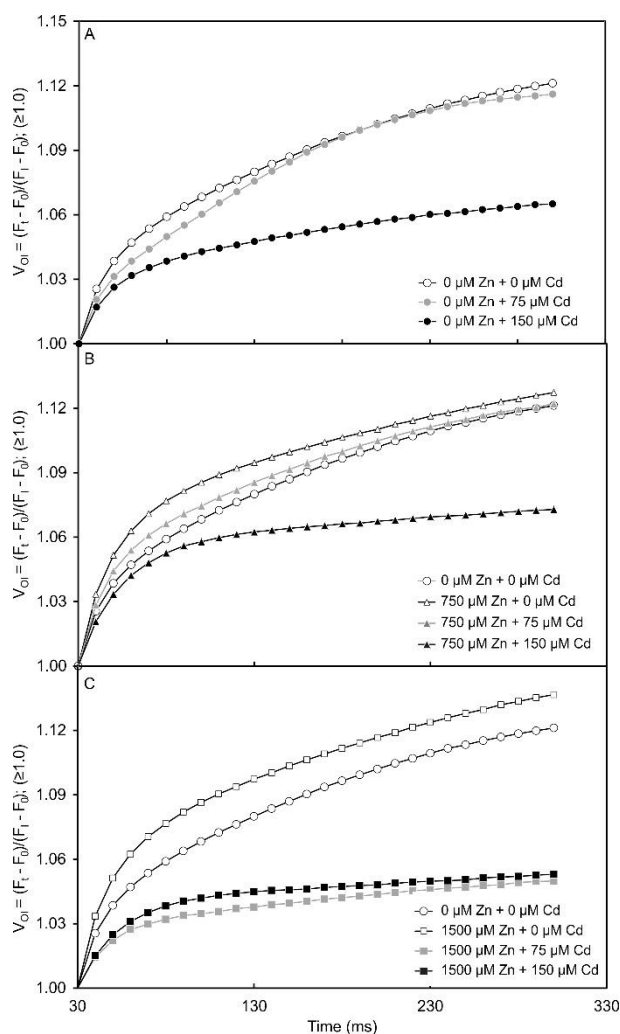


FIGURA 9. Normalização da fluorescência transiente da clorofila a entre F_0 e F_1 ($V_{OI} \geq 1,0$) de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM).

Reduções nos valores do ΔV_{IP} foram verificados nos tratamentos que empregaram 150 μM Cd, bem como no tratamento com 75 μM Cd + 1500 μM Zn (Fig. 10A). As plantas de *A. tenella* crescidas em meio suplementado com 75 e 150 μM Cd mostraram valores da fluorescência inicial (F_0) aumentados. Além disso, sob 150 μM Cd houve um aumento linear de F_0 em função do aumento das

concentrações de Zn (Fig. 10B). Os valores de F_v/F_0 e K_P foram maiores nas plantas cultivadas com Zn (750 μM e 1500 μM) quando os meios não tiveram suplementação de Cd.

Por outro lado, na presença de 150 μM Cd, as plantas apresentaram uma redução de F_v/F_0 e K_P com o aumento da concentração de Zn adicionada ao meio de cultivo (Fig. 10C-D). Com relação aos parâmetros de rendimento quântico, houve um decréscimo significativo de ϕP_0 e ϕE_0 nas plantas crescidas em meio contendo 75 μM Cd + 750 μM Zn, 75 ou 150 μM Cd + 1500 μM Zn (Fig. 10E-F). Nestes tratamentos foi também observado um aumento dos valores de ϕD_0 (Fig. 10G). Os valores de ψR_0 e ϕR_0 decresceram nas plantas cultivadas em meio suplementado com 150 μM Cd, independente da concentração de Zn. Similarmente, houve um decréscimo de ψR_0 e ϕR_0 nas plantas cultivadas com 75 μM Cd + 1500 μM Zn (Fig. 10H-I). Nos meios de cultivo sem Cd, a suplementação de Zn atuou no aumento dos valores de RC/CS_m , $SFI_{(ABS)}$ e PI_{total} (Fig. 10J-L). Contudo, quando foi adicionado Cd e Zn houve uma redução de RC/CS_m , $SFI_{(ABS)}$. A exposição à 150 μM Cd induziu uma redução nos valores de PI_{total} , sendo também verificada uma redução nas plantas cultivadas com 75 μM Cd + 1500 μM Zn (Fig. 10L).

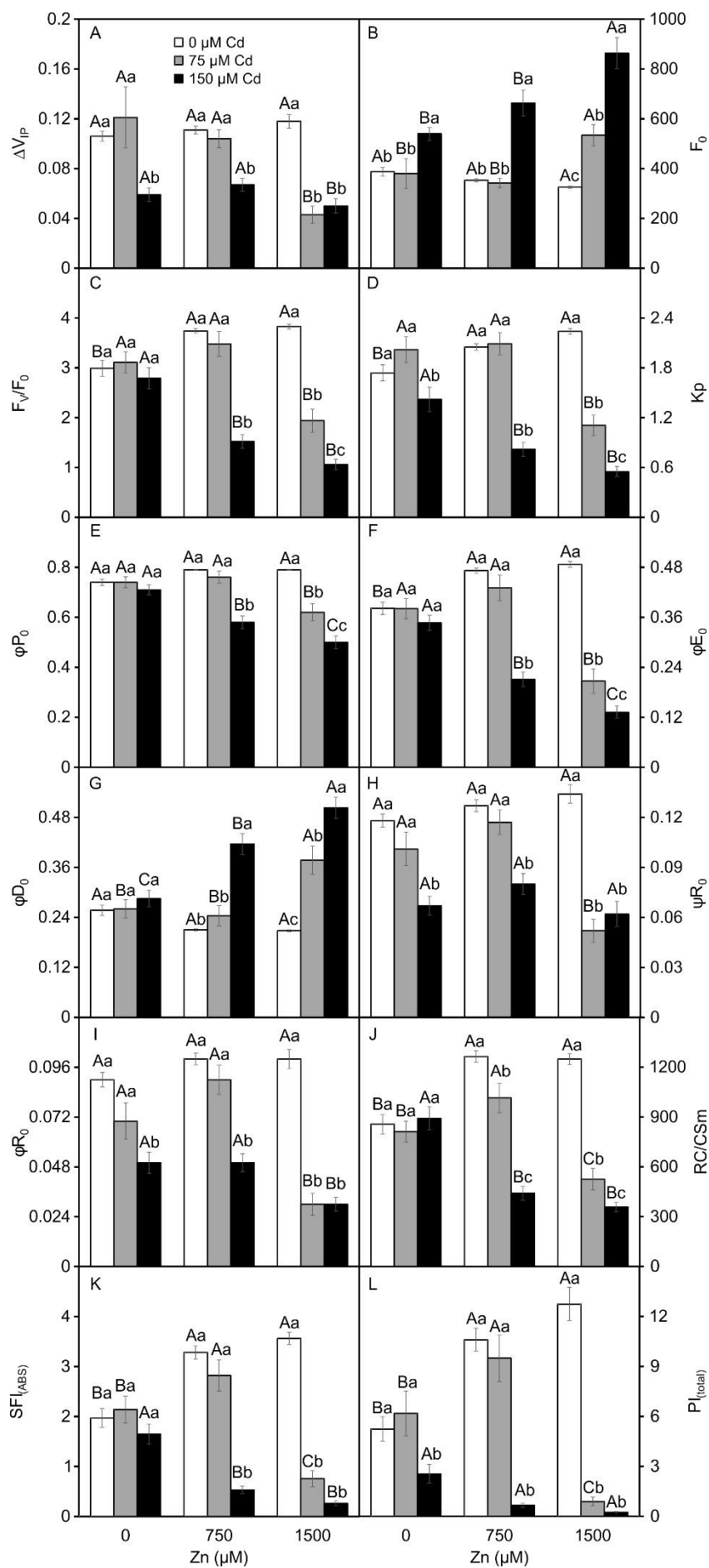


FIGURA 10. Amplitude da fluorescência variável relativa do aumento de I para P (ΔV_{IP}) e parâmetros do teste JIP de plantas de *A. tenella* após 30 de cultivo *in vitro* em função das concentrações de Cd (0, 75 e 150 μM) e Zn (0, 750 e 1500 μM). Médias ($\pm$ erro padrão), $n = 20$, seguidas da mesma letra (maiúsculas comparando as concentrações de Zn em cada concentração de Cd e minúsculas comparando as concentrações de Cd em cada concentração de Zn) não diferem significativamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Discussão

Os processos fisiológicos relacionados ao crescimento, às características anatômicas (caulinares/folhares) e à fluorescência da clorofila a em plantas de *A. tenella* cultivadas *in vitro* sob os efeitos de diferentes concentrações de Cd e/ou Zn foram descritos neste estudo.

A diminuição do peso seco total e a presença dos sintomas visuais como clorose e necrose nas folhas das plantas de *A. tenella* pela presença do Cd confirmaram seu efeito tóxico. O Zn não apresentou um impacto negativo pronunciado no crescimento e no desempenho do aparato fotossintético das plantas. O índice de tolerância (IT) refletiu a sensibilidade das plantas de *A. tenella* aos elementos-traço (Cd e Zn). O IT foi baixo ($IT < 35$) quando as plantas foram cultivadas em meio contendo apenas Cd, intermediário ($35 < IT < 60$) quando estas foram expostas ao Cd e Zn e alto ($IT > 60$) quando foram cultivadas com Zn, de acordo com o IT descrito por Lux et al. (2004) e devido os valores ($IT \approx 19,85$; $IT \approx 40,68$ e $IT \approx 75,07$, respectivamente) apresentados pelas plantas. A redução acentuada no acúmulo de massa em função das concentrações de Cd evidencia a baixa tolerância das plantas dessa espécie a esse elemento-traço em condições de deficiência de Zn. Em contraste, nas concentrações de Zn testadas, foi possível sugerir que o Zn (em concentrações até 750 μM) foi parcialmente eficiente como amenizador de estresse ao Cd. Efeitos semelhantes no crescimento de culturas *in vitro* foram relatados por Pérez-Romero et al. (2016) e Wiszniewska et al. (2017) revelando que

a natureza tóxica do Cd geralmente resulta em distúrbios no crescimento devido ao seu fácil acúmulo nos tecidos vegetais e, portanto, têm um impacto negativo nos processos fisiológicos essenciais, além da foto-oxidação. No entanto, muitas publicações revelam que o Zn pode desempenhar um papel importante nas plantas, aumentando a biomassa das partes aéreas e raízes e facilitando a fotólise da água durante a fotossíntese (ABBAS et al., 2017a; WU et al., 2020).

As características anatômicas das plantas de *A. tenella* estão de acordo com a literatura. Estas continuam a ser descritas sob exposição de elementos-traço em condições *in vitro* afim de entender melhor as modulações das respostas morfológicas desta espécie sob a influência de elementos-traço (RODRIGUES et al., 2017; MARTINS et al., 2020c).

A exposição de Zn estimulou o aumento da área transversal do caule; contudo, esse elemento não teve grande impacto na formação de feixes vasculares nesse órgão. O aumento da área transversal parece estar relacionado à uma resposta positiva do Zn na divisão celular do córtex e medula. Esse elemento está envolvido na síntese de triptofano (precursor da auxina), na divisão celular e na manutenção da estrutura da membrana (LACERDA et al., 2018). Todavia, o Zn, em concentrações elevadas pode induzir mudanças no processo de divisão celular e inibição do alongamento celular (SOMAVILLA et al., 2018; ALAM et al., 2020). Esta afirmativa faz sentido, uma vez que as plantas cultivadas com 1500 μM Zn apresentaram uma tendência ao decréscimo da área transversal. Assim, sob concentrações mais elevadas que as testadas, as plantas possivelmente exibiriam uma redução mais significativa da área transversal do caule.

Nas folhas, alterações na morfologia dos estômatos e na sua densidade são respostas típicas das plantas às condições de estresse, tais como déficit hídrico ou exposição à elementos-traço (ANDRADE et al., 2019; CAINE et al., 2019; MARTINS et al., 2020c; PIRES-LIRA et al., 2020). O Cd induziu uma resposta antagônica à do Zn. A exposição à 75 μM Cd levou a formação de estômatos maiores, o que influencia a absorção de CO_2 e a transpiração. Estômatos menores tentem a ser mais funcionais, mas isso também pode interferir no fluxo de massa (PEREIRA et al., 2016; MARTINS et al., 2019, 2020c). A redução na densidade dos estômatos, bem como um decréscimo no número de elementos de vaso, podem indicar uma

resposta ao Cd que levou a uma redução no fluxo de massa, na absorção e translocação de Cd (dentre outros nutrientes) do meio de cultivo para a parte aérea das plantas. Isso pode estar relacionado a uma estratégia das plantas para resistir ou se adaptar ao excesso de metais pesados (WAFEE et al., 2018).

O número de elementos de vaso nas folhas pode controlar a translocação de elementos absorvidos pelas raízes para a parte aérea (MARTINS et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017). Uma redução na translocação de nutrientes a partir do meio pode ter prejudicado o acúmulo de massa, a quantidade de água necessária para a reação fotossintética e reduzindo o desempenho do aparato fotossintético.

Nas plantas cultivadas sem Zn foi verificado uma redução no número de elementos de vasos em função das concentrações de Cd. Os efeitos da toxicidade do Cd nos tecidos foliares de *A. tenella* também já foram revelados por Rodrigues et al. (2017). De fato, o Cd pode inibir a divisão celular bem como pode alterar o ciclo celular nos tecidos das folhas (HENDRIX et al., 2018).

Os danos verificados na anatomia e morfologia das plantas refletiram na fisiologia. Um aumento em V_K e V_J pode ser um indicativo de danos no sistema envolvido na oxidação das moléculas de água do FSII e bloqueio parcial da transferência de elétrons de Q_A para Q_B na cadeia de transportadora de elétrons no lado receptor de FSII, respectivamente (KALAJI et al., 2016; ZHANG et al., 2017b; MARTINS et al., 2020b,c). Neste contexto, a diminuição dos valores de V_K e V_J observada nas plantas cultivadas apenas com Zn pode indicar uma melhora nas atividades do complexo evolução de oxigênio (CEO) do lado doador de elétrons de FSII e a essencialidade desse elemento para o bom desempenho das atividades fotoquímicas primárias. Em contraste, o aumento dos valores de V_K e V_J observado em função das concentrações de Cd em conjunto com 1500 μM Zn indica a ocorrência de distúrbios na atividade do CEO ou uma redução no Q_A^- acompanhada por uma transferência fraca de elétrons para o Q_B , resultando em uma maior taxa de emissão de fluorescência (MARTINS et al., 2020b,c). Em relação a este fato, os efeitos do Cd se manifestam tanto no lado doador quanto no lado receptor do FSII e afetam as atividades do aparato fotossintético. Assim, embora tóxico em altas concentrações, o Zn é apresentado neste estudo como um elemento mitigador de

estresse induzido pelo Cd nas plantas de *A. tenella* e desempenha funções chaves para fotossíntese e transporte de elétrons.

A formação de uma banda L positiva pode sinalizar distúrbios e conectividade fraca entre subunidades do FSII ou até mesmo danos em membranas dos tilacóides (PAUNOV et al., 2018; ROSA et al., 2018; ZHANG et al., 2018). O aumento dos valores de W_L das plantas cultivadas com altas concentrações de Zn (1500 μM) e Cd pode confirmar esse resultado. A presença de bandas K positivas também pode indicar distúrbios fisiológicos no FSII relacionados à danos no CEO (KALAJI et al., 2016). No mesmo contexto, os autores como Wang et al. (2016), Pollastrini et al. (2017) e Zhang et al. (2018) relatam aumento em W_K , que pode representar danos no transporte de elétrons de CEO para $P680^+$. De fato, a presença de metais pesados em excesso pode indicar efeitos nocivos no transporte de elétrons ligados ao mau desempenho da atividade do aparato fotossintético que representa um alvo importante para contaminantes metálicos, porque que a inibição dos processos bioquímicos e biofísicos da fotossíntese afeta em particular a fisiologia da planta inteira. No presente estudo, a presença de Zn nas plantas cultivadas com 75 μM Cd mostrou melhor desempenho das membranas dos tilacóides e eficiência do CEO no lado doador do FSII, evidenciada pela presença de bandas negativas L e K, com também melhora absorção de energia, desempenho de atividades e conectividade entre as unidades do FSII.

As fases O-I e I-P estão associadas à dinâmica de transferência de elétrons do intersistema para o FSI (SOUZA et al., 2019). Redução de amplitudes no intervalo O-I ($V_{OI} \geq 1,0$) foi observada quando as plantas foram co-expostas à altas concentrações dos dois elementos-traço. Esse decréscimo dos valores de $V_{OI} \geq 1$ pode indicar uma redução no fluxo de elétrons e no tamanho do *pool* dos aceptores de elétrons finais do FSI (YUSUF et al., 2010; SOUZA et al., 2019; BRAGA et al., 2020). De fato, os danos induzidos pelo excesso de Cd levou à uma redução nos valores do ΔV_{IP} , o que sugere que uma menor contribuição de emissão da fluorescência da clorofila a e redução das unidades do FSI (PAUNOV et al., 2018). Dessa forma, um excesso de Cd e Zn nas plantas pode levar a distúrbios no aparato fotossintético.

As atividades do FSII, do intersistema e do FSI, em função dos tratamentos, foram também expressados por meio dos parâmetros do teste JIP. Um aumento de F_0 pode sinalizar uma redução nos centros de reação ativos (RCs) refletindo em uma diminuição na taxa constante de energia capturada (LOTFI et al., 2018). Tal afirmação faz sentido, uma vez que nesse trabalho as plantas expostas à altas concentrações de Cd e Zn apresentaram valores aumentados de F_0 e redução de RC/CSm. Além disso, com o aumento em F_0 e a diminuição dos valores da razão F_v/F_0 foi possível verificar que as plantas expostas a altas concentrações de Cd apresentaram uma redução na taxa constante de energia capturada nos centros do FSII. Um decréscimo dos valores de K_p pode refletir perda abundante de energia nas plantas sob estresse de elementos-traço ou sinalizar danos nos centros do FSII (KUMAR et al., 2020). Valores reduzidos de F_v/F_0 podem refletir no declínio do transporte de elétrons resultante da baixa atividade CEO para o lado doador do FSII ou uma diminuição na energia capturada nos RCs do FSII (GHASSEMI-GOLEZANI e LOTFI, 2015; PONTES et al., 2020), o que corrobora com os valores aumentados de W_K . Os maiores valores de F_v/F_0 e K_P , além dos valores diminuídos de W_K , observados nas plantas cultivadas com Zn sem suplementação de Cd comprovaram os efeitos positivos deste elemento-traço durante o cultivo de *A. tenella in vitro*.

Sob a co-exposição de ambos elementos-traço em altas concentrações, as plantas também exibiram uma diminuição no rendimento quântico (ϕP_0 e ϕE_0), revelando assim um estado de estresse nas plantas. Meng et al. (2016) e Kalisz et al. (2016) relataram que um decréscimo nos valores do rendimento quântico pode ser o resultado de fotoinibição devido a danos fotoquímicos no FSII. Além disso, diminuição dos valores de ϕE_0 indica uma eficiência menor no transporte de elétrons, principalmente de Q_A para Q_B (KALAJI et al., 2016). Em contraste, um aumento em ϕP_0 e ϕE_0 pode refletir uma melhor transferência de elétrons entre Q_A e Q_B , com alta conexão entre as antenas do FSII (LOTFI et al., 2018; SINGH et al., 2018).

Neste estudo, as plantas de *A. tenella* cultivadas em meios com a co-exposição de ambos elementos-traço em altas concentrações exibiram distúrbios fisiológicos resultando na inativação dos RCs (como evidenciado pelos valores RC/CSm), o que levou a uma maior dissipação de energia (ϕD_0). A inativação de RCs é uma resposta negativa induzida pelo estresse aos elementos-traço (MENG et

al., 2016; ZHANG et al., 2017). Em tal situação, Paunov et al. (2018) afirmam que um número menor de RCs ativos indica que menos energia é usada no sistema de transporte de elétrons, nesse caso a energia não utilizada deve ser dissipada. Uma diminuição dos valores de RC/CSm é normalmente acompanhada por valores aumentados de F_0 e ϕD_0 . Um aumento nos valores de F_0 e ϕD_0 refletem em uma redução na dinâmica de transporte e uso de energia de excitação, o que pode refletir em uma maior dissipação de energia na forma de calor (MARTINS et al., 2015; MENG et al., 2016).

O parâmetro ψR_0 é sensível ao efeito de elementos-traço e está associado à diminuição significativa da atividade do FSI. Uma diminuição em ψR_0 sob exposição à altas concentrações dos elementos-traço pode indicar uma diminuição na eficiência ou probabilidade de transferência de elétrons aprisionados de FSII para FSI (RASTOGI et al., 2019, FASEELA et al., 2020; MARTINS et al., 2020b). Tal resposta se dá pelo aumento no V_i . Outros parâmetros também confirmaram que os efeitos negativos do excesso dos elementos-traço foram além do FSII nas plantas de *A. tenella*. Essa menor eficiência no desempenho do aparato fotossintético além do intersistema foi confirmado pelos valores reduzidos do ϕR_0 . O decréscimo nos valores desse parâmetro pode indicar fotoinibição com menor eficiência dos elétrons do FSII para alcançar os aceptores de elétrons finais do FSI (WANG et al., 2016; ZHUO et al. 2017; CHATTOPADHYAY et al., 2020).

O efeito mitigador do Zn, bem como seu caráter essencial, foi evidenciado pelos parâmetros PI_{total} e SFI_{ABS} . Os valores aumentados destes parâmetros nas plantas de *A. tenella* cultivadas com Zn, mesmo quando co-expostas à 75 μM Cd, demonstraram como esse micronutriente atua positivamente na dinâmica de transporte de elétrons a partir do FSII até o FSI. Todavia, vale resaltar que o Zn em altas concentrações pode potencializar o estresse induzido pelo Cd nas plantas. Os parâmetros PI_{total} e SFI_{ABS} são bons indicadores do desempenho fotossintético, pois especificam como os agentes estressores atuaram na eficiência e funcionalidade do aparato fotossintético das plantas (YUSUF et al., 2010; KALAJI et al., 2016). A diminuição em SFI_{ABS} verificada nas plantas sem Zn ou com a maior concentração de Cd demonstrou que houve uma instabilidade e dificuldade das plantas para conservar energia e promover um bom desempenho do FSII (STIRBET et al., 2018). Isto pode acarretar em uma interrupção da taxa de transporte de elétrons e da

atividade fotossintética geral de muitas plantas (GUPTA, 2020). Dessa forma, é previsto um decréscimo no desempenho geral do aparato fotossintético, como visto por meio dos valores de PI_{total} reduzidos. Além disso, valores mais baixos de PI_{total} indicaram que os danos foram além do intersistema e afetaram negativamente a performance global do aparato fotossintético.

Conclusão

O Cd induz uma resposta antagônica ao do Zn. Com a exposição apenas de Cd, as plantas apresentam distúrbios fisiológicos e comprometem o crescimento das plantas. O Zn estimulou o aumento da área transversal do caule e apresenta efeitos positivos no desempenho fisiológico das plantas como estabilidade na estrutura e funcionalidade do aparato fotossintético. A exposição ao Zn em concentrações $\leq 750 \mu\text{M}$ pode amenizar parcialmente os efeitos deletérios das concentrações de Cd avaliadas. Sendo assim, do ponto de vista ecotoxicológico, o excesso dos ambos elementos-traço (Cd e Zn) representa toxicidade à espécie estudada.

Referências

ABBAS, M. S. ; AKMAL, M. ; ULLAH, S. ; HASSAN, M. U. ; & FAROOQ, S. (2017). Effectiveness of Zinc and Gypsum Application Against Cadmium Toxicity and Accumulation in Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 48(14), 1659–1668.

ADHIKARI T.; KUNDU S.; RAO AS. (2016) Zinc delivery to plants through seed coating with nano-zinc oxide particles. **J Plant Nutr** 39:136–146.

AHMAD A.; HADI F.; ALI N. (2015) Effective phytoextraction of cadmium (Cd) with increasing concentration of total phenolics and free proline in *Cannabis sativa* (L) plant under various treatments of fertilizers, plant growth regulators and sodium salt. **Int J Phytorem** 17:56–65.

ALAM, N.; ANIS, M.; JAVED, S. B.; & ALATAR, A. A. (2020). Stimulatory effect of copper and zinc sulphate on plant regeneration, glutathione-S-transferase analysis and assessment of antioxidant activities in *Mucuna pruriens* L. (DC). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**.

AMARI T.; GHNAYA T.; ABDELLELY C.; 2017. Nickel, cádmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. **S Afr J Mar Sci.** 111: 99-110.

ANDRADE JÚNIOR, WV.; OLIVEIRA NETO CF.; SANTOS FILHO BG.; DO AMARANTE CB.; CRUZ ED.; OKUMURA RS.; BARBOSA AVC.; DE SOUSA DJP.; TEIXEIRA JSS.; BOTELHO AS. 2019. Effect of cadmium on young plants of *Virola surinamensis*. **AoB Plants**. 11(3):plz022.

AYANGBENRO, A., & BABALOLA, O. (2017). A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 14(1), 94.

BENÁKOVÁ, M.; AHMADI, H.; DUČAIOVÁ, Z.; TYLOVÁ, E.; CLEMENS, S.; TŮMA, J. Effects of Cd and Zn on physiological and anatomical properties of hydroponically grown *Brassica napus* plants. **Environmental Science and Pollution Research**, 2017, vol. 24, no 25, p. 20705-20716.

BONANNO G.; BORG JA.; MARTINO V. 2017. Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: A comparative assessment. **Sci Total environ.** 576: 796-806.

BRAGA, P.C.S.; MARTINS, J.P.R.; BONOMO, R.; BORGES, R.M.; SILVA, J.V.G. and FALQUETO, A.R. 2020. Differential response of photosystem II and I photochemistry in leaves of two *Crambe abyssinica* Hochst lineages submitted to water déficit. **Photosynthetica**. 58 (5): 1122-1129.

CAINE, R.S.; YIN, X.; SLOAN, J.; HARRISON, E.L.; MOHAMMED, U.; FULTON, T.; BISWAL, A.K.; DIONORA, J.; CHATER, C.C.; COE, R.A.; BANDYOPADHYAY, A.; MURCHIE, E.H.; SWARUP, R.; QUICK, W.P.; GRAY, J.E., 2019. Rice with reduced stomatal density conserves water and has improved drought tolerance under future climate conditions. **New Phytol.** 221, 371–384.

CAROLIN, C. F.; KUMAR, P. S.; SARAVANAN, A.; JOSHIBA, G. J.; NAUSHAD, M. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment: A review. **Journal of environmental chemical engineering**, 2017, vol. 5, no 3, p. 2782-2799.249.

CARVALHO MTV.; PONGRAC P.; MUMM R.; ARKEL J.; AELST A.; JEROMEL L.; VAVPETIČ P.; PELICON P.; AARTS MGM (2015) *Gomphrena claussenii*, a novel

metal-hypertolerant bioindicator species, sequesters cadmium, but not zinc, in vacuolar oxalate crystals. **New Phytol** 208(3):763–775.

CEPPI, M. G.; OUKARROUM, A.; ÇIÇEK, N.; STRASSER, R. J.; & SCHANSKER, G. (2012). The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: a study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress. **Physiologia Plantarum**, 144(3), 277–288.

CHATTOPADHYAY, K.; VIJAYAN, J.; RAY, A.; CHAKRABORTY, K. & SARKAR R.K. Additive main effect and digenic epistatic quantitative trait loci for chlorophyll fluorescence traits influencing salt tolerance at seedling stage in rice. **Photosynthetica** 8 (SI): 410-422, 2020.

DU, J.; ZENG, J.; MING, X.; HE, Q.; TAO, Q.; JIANG, M.; ... YU, X. (2020). The presence of zinc reduced cadmium uptake and translocation in *Cosmos bipinnatus* seedlings under cadmium/zinc combined stress. **Plant Physiology and Biochemistry**.

FASEELA P.; SINISHA A.K.; BRESTIČ M.; PUTHUR J.T.: Chlorophyll a fluorescence parameters as indicators of a particular abiotic stress in rice. – **Photosynthetica** 58: 293-300, 2020

FELIPPE GM, ALENCASTRO FMMR (1966). Contribuição ao estudo da nervação foliar das compostas dos cerrados: I, Tribus: Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutiseae, e Senecioneae. **An Acad Bras Ciênc**,38:125-157.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.1039-1042, Nov. 2011.

GHASSEMI-GOLEZANI K & LOTFI R (2015) The Impact of salicylic acid and silicon on chlorophyll a fluorescence in mung bean under salt stress. **Russ J Plant Physiol** 62:611–616.

GOLTSEV, V. N.; KALAJI, H. M.; PAUNOV, M.; BAĞA, W.; HORACZEK, T.; MOJSKI, J.; KOCIEL, H.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Variable Chlorophyll Fluorescence and its use for Assessing Physiological Condition of Plant Photosynthetic Apparatus. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, p. 881–907. 2016.

GUPTA, R. (2020). The oxygen-evolving complex: a super catalyst for life on earth, in response to abiotic stresses. **Plant Signaling & Behavior**, 1824721.

HENDRIX, S.; KEUNEN, E.; MERTENS, A. I. G.; BEEMSTER, G. T. S.; VANGRONSVELD, J., & CUYPERS, A. (2018). Cell cycle regulation in different leaves of *Arabidopsis thaliana* plants grown under control and cadmium-exposed conditions. **Environmental and Experimental Botany**, 155, 441–452.

JANEČKOVÁ, H.; HUSIČKOVÁ, A.; LAZÁR, D.; FERRETTI, U.; POSPÍŠIL, P.; ŠPUNDOVÁ, M. Exogenous application of cytokinin during dark senescence eliminates the acceleration of photosystem II impairment caused by chlorophyll b deficiency in barley. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.136, p.43-51, 2019

JEONG, H.; CHOI, J. Y.; LEE, J.; LIM, J.; & RA, K. (2020). Heavy metal pollution by road-deposited sediments and its contribution to total suspended solids in rainfall runoff from intensive industrial areas. **Environmental Pollution**, 115028.

JOHANSEN DA (1940). **Plant microtechnique**, 2nd ed. New York, p 523.

KALAJI HM.; JAJOO A.; OUKARROUM A.; BRESTIC M.; ZIVCAK M.; SAMBORSKA IA.; CETNER MD.; ŁUKASIK I.; GOLTSEV V.; LADLE RJ (2016) Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiol Plantarum** 4:1–11.

KALISZ A.; JEZDINSKÝ A.; POKLUDA R.; SEKARA A.; GRABOWSKA A.; GIL J (2016) Impacts of chilling on photosynthesis and chlorophyll pigment content in juvenile basil cultivars. **Hortic Environ Biotechnol.**57:330–339.

KARRI, V.; KUMAR, V.; RAMOS, D.; OLIVEIRA, E., & SCHUHMACHER, M. (2017). Comparative In Vitro Toxicity Evaluation of Heavy Metals (Lead, Cadmium, Arsenic, and Methylmercury) on HT-22 Hippocampal Cell Line. **Biological Trace Element Research**, 184(1), 226–239.

KRAUS JE, ARDUIN M (1997). Manual básico de métodos em morfologia vegetal. **EDRU**, Seropédica, p198.

KUMAR, D.; SINGH, H., RAJ, S., & SONI, V. (2020). Chlorophyll a fluorescence kinetics of mung bean (*Vigna radiata* L.) grown under artificial continuous light. **Biochemistry and Biophysics Reports**, 24, 100813.

LACERDA, J. S.; MARTINEZ, H. E. P.; PEDROSA, A. W.; CLEMENTE, J. M.; SANTOS, R. H. S.; OLIVEIRA, G. L., & JIFON, J. L. (2018). Importance of Zinc for Arabica Coffee and Its Effects on the Chemical Composition of Raw Grain and Beverage Quality. **Crop Science**, 58(3), 1360.

LANGE B.; VAN DER ENT A.; BAKER AJ.; ECHEVARRIA G.; MAHY G.; MALAISSE F.; MEERTS P.; POURRET O.; VERBRUGGEN N.; FAUCON MP. 2017. Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. **New Phytol.** 213(2):537-551.

LOGIEWA, A.; MIAZGOWICZ, A.; KRENNHUBER, K.; LANZERSTORFER, C. 2020. Variation in the concentration of metals in road dust size fractions between 2 µm and 2 mm: Results from three metallurgical centres in Poland. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 78 (1), 46–59.

LOTFI, R.; KALAJI, H.M.; VALIZADEH, G.R; KHALILVAND BEHROZYAR, E.; HEMATI, A.; GHARAVI-KOCHEBAGH, P.; GHASSEMI, A. Effects of humic acid on photosynthetic efficiency of rapeseed plants growing under different watering conditions. **Photosynthetica**, v.56, p. 962-970, 2018.

LUX, A.; SOTTNIKOVA, A.; OPATRNA, J.; & GREGER, M. (2004). Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, 120(4), 537–545.

MARTINS, J.P.R.; SCHIMILDT, E.R.; ALEXANDRE, R.S.; FALQUETO, A.R.; OTONI, W.C., 2015. Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica*

(Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 51, 471–481.

MARTINS JPR, MARTINS AD, PIRES MF, JUNIOR RAB, REIS RO, DIAS GDM, PASQUAL M (2016) Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 126:43–57.

MARTINS R.F.A., SOUZA A.F.C., PITOL C., FALQUETO A.R.: Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). – *Aust. J. Crop Sci.* 11: 821-827, 2017.

MARTINS JPR.; RODRIGUES LCA.; SANTOS ER.; BATISTA BG.; GONTIJO ABPL.; FALQUETO AR (2018) Anatomy and photosystem II activity of in vitro grown *Aechmea blanchetiana* as affected by 1-naphthaleneacetic acid. *Biol Plant.* 62:211-221.

MARTINS, J.P.R.; SANTOS, E.R.; RODRIGUES, L.C.A.; GONTIJO A.B.P.L.; FALQUETO, A.R. Effects of 6-benzylaminopurine on photosystem II functionality and leaf anatomy of in vitro cultivated *Aechmea blanchetiana*. *Biologia Plantarum*, v.62, n.4, p.793–800. 2018b.

MARTINS JPR.; RODRIGUES LCA.; SILVA TS.; SANTOS ER.; FALQUETO AR.; GONTIJO ABPL (2019) Sources and concentrations of silicon modulate the physiological and anatomical responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) during in vitro culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 137:397–410.

MARTINS, J. P. R.; RODRIGUES, L. C. A.; SILVA, T. DOS S.; ROSSINI F.P.; GONTIJO, A. B. P. L. & FALQUETO, A. R. (2020): Morphophysiological responses of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) to excess copper during invitro culture, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*.

MARTINS, J. P. R.; RODRIGUES, L. C. DE A.; SILVA, T. DOS S.; SANTOS, E. R., GONTIJO, A. B. P. L. & FALQUETO, A. R. (2020a). Modulation of the anatomical and physiological responses of in vitro grown *Alcantarea imperialis* induced by NAA and residual effects of BAP. *Ornamental horticulture*. V. 26, No. 2, 2020a, p. 283-297.

MARTINS, J.P.R.; SOUZA, A.F.C.; RODRIGUES, L.C.A.; BRAGA, P.C.S.; GONTIJO, A.B.P.L. AND FALQUETO, A.R. Zinc and selenium as modulating factors of the anatomy and physiology of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) during in vitro culture. *Photosynthetica* 58 (5): 1068-1077, 2020b.

MARTINS, J. P. R.; VASCONCELOS, L. L. DE.; BRAGA, P. DA C. DE S.; ROSSINI, F. P.; CONDE L. T.; RODRIGUES, L. C. DE A.; FALQUETO R. A.; GONTIJO, A. B. P. L. (2020c). Morphophysiological responses, bioaccumulation and tolerance of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) to excess copper under in vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.

MAZAHERI-TIRANI, M. and DAYANI, S. (2019). In vitro effect of zinc oxide nanoparticles on *Nicotiana tabacum* callus compared to ZnO micro particles and zinc sulfate (ZnSO₄). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.

MEN, C.; LIU, R.; XU, F.; WANG, Q.; GUO, L.; & SHEN, Z. Pollution characteristics, risk assessment, and source apportionment of heavy metals in road dust in Beijing, China. **Science of the total environment**, 2018, vol. 612, p. 138-147.

MENG, L.-L. et al. Effects of drought stress on fluorescence characteristics of photosystem II in leaves of *Plectranthus scutellarioides*. **Photosynthetica**, v. 54, n. 3, p. 414-421, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, **Physiologia plantarum**, v.15, n., p.473-497, 1962.

PARMOON G.; EBADI A.; JAHANBAKHSH S.; HASHEMI M.; MOOSAVI SA (2019) Assessing photosynthetic performance of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill) influenced by plant growth regulators and drought stress imposed at vegetative and reproductive stages. **Ital J Agron** 14:1319.

PAUNOV M.; KOLEVA L.; VASSILEV A.; VANGRONSVELD J.; GOLTSEV V (2018) Effects of different metals on photosynthesis: cadmium and zinc affect chlorophyll fluorescence in durum wheat. **Int J Mol Sci** 19:787.

PEREIRA, M. P.; RODRIGUES, L. C. DE A.; CORRÊA, F. F.; DE CASTRO, E. M.; RIBEIRO, V. E., & PEREIRA, F. J. (2015). Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. **Trees**, 30(3), 807–814.

PEREIRA MP.; RODRIGUES LCA.; CORRÊA FF.; CASTRO EM.; RIBEIRO VE.; PEREIRA FJ (2016) Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. **Trees** 30:807–814.

PEREZ -ROMERO J. A. ; RENODO -GOMEZ S. ; MATEOS -NARANJO E . (2016) Growth and photosynthetic limitation analysis of the Cd -accumulator *Salicornia ramossissima* under excessive cadmium concentrations and optimum salinity conditions. **Plant Physiology and Biochemistry** , 109 , 103 -113.

PIRES-LIRA M.F., CASTRO E.M., LIRA J.M.S. et al.: Potential of *Panicum aquaticum* Poir. (Poaceae) for the phytoremediation of aquatic environments contaminated by lead. – **Ecotox. Environ. Safe.** 193: 110336, 2020.

POLLASTRINI, M.; NOGALES, A. G.; BENAVIDES, R.; BONAL, D.; FINER, L.; FOTELLI, M.; GESSLER, A.; GROSSIORD, C.; RADOGLU, K.; STRASSER, R. J.; BUSSOTTI, F. Tree diversity affects chlorophyll a fluorescence and other leaf traits of tree species in a boreal forest. **Tree Physiology**, v. 00, p. 1–10. 2017.

PONTES, M. S.; GRACIANO, D. E.; ANTUNES, D. R.; SANTOS, J. S.; ARRUDA, G. J.; BOTERO, E. R.; ... SANTIAGO, E. F. (2020). In vitro and in vivo impact assessment of eco-designed CuO nanoparticles on non-target aquatic photoautotrophic organisms. **Journal of Hazardous Materials**, 122484.

RASTOGI A.; ZIVCAK M.; TRIPATHI D.K. et al.: Phytotoxic effect of silver nanoparticles in *Triticum aestivum*: Improper regulation of photosystem I activity as the reason for oxidative damage in the chloroplast. – **Photosynthetica** 57: 209-216, 2019.

RODRIGUES, L. C. A., MARTINS, J. P. R., DE ALMEIDA JÚNIOR, O., GUILHERME, L. R. G., PASQUAL, M., & DE CASTRO, E. M. (2017). Tolerance and

potential for bioaccumulation of *Alternanthera tenella* Colla to cadmium under in vitro conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 130(3), 507–519.

ROSA WS.; MARTINS JPR.; SANTOS ER.; RODRIGUES LCA.; GONTIJO ABPL.; FALQUETO AR (2018) Photosynthetic apparatus performance in function of the cytokinins used during the in vitro multiplication of *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae). **Plant Cell Tiss Organ Cult** 133:339–350.

SAMIEI, L.; DAVOUDI PAHNEHKOLAYI, M.; KARIMIAN, Z., & NABATI, J. (2020). Morpho-Physiological Responses of Halophyte *Climacoptera crassa* to Salinity and Heavy Metal Stresses in In Vitro Condition. **South African Journal of Botany**, 131, 468–474

SANTOS ER.; MARTINS JPR.; RODRIGUES LCA.; GONTIJO ABPL.; FALQUETO AR (2020) Morphophysiological responses of *Billbergia zebrina* Lindl. (Bromeliaceae) in function of types and concentrations of carbohydrates during conventional in vitro culture. **Ornam Hort** 26:18–34.

SHAHID, A.; AHMAD, N.; ANIS, M.; ALATAR, A. A.; & FAISAL, M. (2015). Morphogenic responses of *Rauvolfia tetraphylla* L. cultures to Cu, Zn and Cd ions. **Rendiconti Lincei**, 27(2), 369–374.

SINGH S., SINGH A., SRIVASTAVA P.K., PRASAD S.M.: Cadmium toxicity and its amelioration by kinetin in tomato seedlings vis-à-vis ascorbate-glutathione cycle. – J. **Photoch. Photobio.** B 178: 76-84, 2018.

SOMAVILLA, L. M.; SIMÃO, D. G.; TIECHER, T. L.; HAMMERSCHIMITT, R. K.; DE OLIVEIRA, J. M. S.; MAYER, N. A.; ... BRUNETTO, G. (2018). Structural changes in roots of peach rootstock cultivars grown in soil with high zinc content. **Scientia Horticulturae**, 237, 1–10.

SOUZA, A.F.C.; MARTINS, J.P.R.; GONTIJO, A.B.P.L.; FALQUETO, A.R. (2019) Selenium improves the transport dynamics and energy conservation of the photosynthetic apparatus of in vitro grown *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Photosynthetica**, 57, 931-941.

STIRBET A.; LAZÁR D.; KROMDIJK J.; GOVINDJEE (2018) Chlorophyll a fluorescence induction: Can just a one- second measurement be used to quantify abiotic stress responses? **Photosynthetica** 56:86-104.

STOLÁRIKOVÁ-VACULÍKOVÁ, M.; ROMEO, S.; MINNOCCI, A.; LUXOVÁ, M.; VACULÍK, M.; LUX, A.; & SEBASTIANI, L. (2015). Anatomical, biochemical and morphological responses of poplar *Populus deltoides* clone Lux to Zn excess. **Environmental and Experimental Botany**, 109, 235–243.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, In: G. Papageogiou, Govindjee (eds.), *Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, **Springer**, Dordrecht, 2004. v. 19, p. 321-362.

STURIKOVA H.; KRYSTOFOVA O.; HUSKA D.; ADAM V. (2018) Zinc, zinc nanoparticles and plants. **J Hazard Mater** 349:101–110.

TURKYILMAZ, A.; CETIN, M.; SEVIK, H.; ISINKARALAR, K.; & SALEH, E. A. A. Variation of heavy metal accumulation in certain landscaping plants due to traffic density. **Environment, Development and Sustainability**, 2018, p. 1-14.

VERMA, S. K.; SAHIN, G.; DAS, A. K., & GUREL, E. (2016). In vitro plant regeneration of *Ocimum basilicum* L. is accelerated by zinc sulfate. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 52(1), 20.

WAFEE C, KHAN AS, SIDDIQI MR (2018) Phytoremediation potential of *Catharanthus roseus* L. and effects of lead (Pb) toxicity on its morpho-anatomical features. **Pak J Bot** 50:1323–1326.

WANG YW.; XU C.; LV CF.; WU M.; CAI XJ.; LIU ZT.; SONG MX.; CHEN GX.; LV CG (2016) Chlorophyll a fluorescence analysis of high-yield rice (*Oryza sativa* L.) LYPJ during leaf senescence. **Photosynthetica** 54:422–429.

WANG, Y.; XU, C.; WU, M., & CHEN, G. (2016). Characterization of photosynthetic performance during reproductive stage in high-yield hybrid rice LYPJ exposed to drought stress probed by chlorophyll a fluorescence transient. **Plant Growth Regulation**, 81(3), 489–499.

WANG, Q.; ZHANG, Q.; WU, Y.; WANG, X.C. 2017. Physicochemical conditions and properties of particles in urban runoff and rivers: implications for runoff pollution. **Chemosphere** 173, 318– 325.

WILKINS DA. 1957. A technique for the measurement of lead tolerance in plants. **Nature** 180:37–38.

WISZNIEWSKA A. ; HANUS -FAJERSKA E. ; MUSZYNSKA E.; SMOLEN S. (2017) Comparative Assessment of Response to Cadmium in Heavy Metal -Tolerant Shrubs Cultured In Vitro. **Water Air and Soil Pollutution** , 228 , 304 .

WU, C. ; DUN, Y. ; ZHANG, Z. ; LI, M. ; & WU, G. (2020). Foliar application of selenium and zinc to alleviate wheat (*Triticum aestivum* L.) cadmium toxicity and uptake from cadmium-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 190, 110091.

XU, P.; CHEN, Y.; HE, S.; CHEN, W.; WU, L.; XU, D.; ... LOU, X. (2019). A follow-up study on the characterization and health risk assessment of heavy metals in ambient air particles emitted from a municipal waste incinerator in Zhejiang, China. **Chemosphere**, 125777.

YIN Z.; LU J.; MENG S.; LIU Y.; MOSTAFA I.; QI M, LI T (2019) Exogenous melatonin improves salt tolerance in tomato by regulating photosynthetic electron flux and the ascorbate–glutathione cycle. **J Plant Interact** 14:453–463.

YUSUF MM.; KUMAR D.; RAJWANSHI R.; STRASSER RJ.; TSIMILLI-MICHAEL M.; GOVINDJEE SARIN NB (2010) Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll fluorescence measurements. **Biochim Biophys Acta** 1797:1428–1438.

ZHANG ZS.; YANG C.; GAO HY.; WANG WW.; SUN XJ.; MENG XL.; MENG QW. 2012. Effects of cucumber leaf PSII activity and electron transfer on its PSI activity in

recovery process after chilling-induced photoinhibition. **Chin J Appl Ecol.** 23:1049–1054.

ZHANG L.; SU F.; ZHANG C.; GONG F.; LIU J (2017) Changes of photosynthetic behaviors and photoprotection during cell transformation and astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* grown outdoors in tubular photobioreactors. **Int J Mol Sci** 18:33.

ZHANG HH.; XU N.; LI X.; JIN WW.; TIAN Q.; SUN GY.; GU SY (2017b) Over expression of 2-Cys Prx increased salt tolerance of photo- system II (PSII) in tobacco. **PeerJ Preprints** 4:e2500v1.

ZHANG, H.; XU, N.; WU, X.; WANG, J.; MA, S.; LI, X., & SUN, G. (2018). Effects of four types of sodium salt stress on plant growth and photosynthetic apparatus in sorghum leaves. **Journal of Plant Interactions**, 13(1), 506–513.

ZHUO Y.; QIU S.; AMOMBO E. et al.: Nitric oxide alleviates cadmium toxicity in tall fescue photosystem II on the electron donor side. – **Environ. Exp. Bot.** 137: 110-118, 2017.