**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Suprimento de enxofre e o estresse causado pelo excesso de zinco no capim
tanzânia**

Renata Mota Lupp

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2017**

Renata Mota Lupp
Engenheira Agrônoma

**Suprimento de enxofre e o estresse causado pelo excesso de zinco no capim
tanzânia**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Lupp, Renata Mota

Suprimento de enxofre e o estresse causado pelo excesso de zinco no capim tanzânia / Renata Mota Lupp. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

99 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Enzimas antioxidantes 2. Estresse oxidativo 3. Fitorremediação 4. Gramínea forrageira 5. Nutrição mineral 6. Prolina 7. Toxidez por metal I.
Título

DEDICATÓRIA

Ao meu fiel e amado Deus,
Aos meus amados pais, Luiz e Angélica,
À minha querida madrinha, tia Ilca,
Ao meu namorado e amigo Guilherme Carrara,
Pelo amor, carinho e incentivo e por terem acreditado em mim.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que não desistiu de mim, quando eu havia desistido e entre dificuldades pessoais e no trabalho, procurou me formar para a vida. Por todas as vezes, que reclamei e Ele sabiamente, colocou mais pedras em meu caminho. Minha gratidão ao Senhor, porque em momentos difíceis, Ele me retirou deles e me encaminhou para situações, nas quais me deparei com o que todos me disseram ser impossível;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas e ao Departamento de Ciência do Solo pela oportunidade, disciplinas e estrutura que contribuíram muito para minha formação;

Ao Professor Francisco Antonio Monteiro, pela oportunidade de aprendizado, pela lapidação do meu trabalho. Agradeço-o pelo apoio, atenção e tempo dedicados em todos os momentos em que precisei, como situações difíceis com problemas pessoais e dificuldades perante o trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto;

À Coordenação do Programa, de forma especial ao professor Álvaro Pires da Silva (*in memorian*), pela oportunidade de aprendizado;

À Faride Simão e aos demais profissionais da DVATCOM, unidade que foi meu incentivo materno e refúgio em momentos singulares da minha vida, nesta família que é a ESALQ-USP;

À Roberta Corrêa Nogueirol que participou ativamente de meu trabalho, colaborando desde a ideia inicial, corrigindo o texto do projeto da dissertação, lapidando o meu trabalho constantemente e se dispondo a colaborar com seu conhecimento;

À Janine Mesquita, amiga, colega e grande profissional, que esteve ao meu lado, compartilhando e aprendendo juntamente comigo, no ambiente laboratorial, determinações e desbravando livros, protocolos, análises e equipamentos, os quais eu desconhecia. O que foi essencial para a obtenção dos resultados deste trabalho;

Ao meu namorado Guilherme Carrara e sua família, à minha querida madrinha Maria da Conceição Mota, aos meus verdadeiros amigos e aos familiares que me apoiaram e possibilitaram que eu tivesse condições e saúde para dar andamento a este trabalho;

Aos profissionais, colegas de trabalho e amigos que me incentivaram a seguir, por acreditarem que eu poderia ir além dos limites que eu coloquei em meu ser e porque contribuíram para que esse trabalho fosse construído. Principalmente aos colegas e amigos Bruna Arruda, Ellen Cristina, Juliana Zucolotto, Ana Carolina Correr, Ana Paula, Willfrand, Marcos Rodrigues, Martha Arruda;

Às funcionárias do Lar dos Idosos São Judas Tadeu, do município de Matozinhos-MG, que atualmente cuidam, da melhor maneira, do meu pai Luiz Gonzaga. Sem essas enfermeiras, cuidadoras de idosos, cozinheiras, coordenadora, funcionários e voluntários não seria possível finalizar este trabalho e dar continuidade à minha vida.

EPÍGRAFE

“É esta a menor de todas as sementes, mas, quando cresce,
torna-se um arbusto maior que todas as hortaliças,
de sorte que os pássaros vêm aninhar-se em seus ramos”
Mateus 13:32 (O grão de mostarda)

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 O capim tanzânia	13
2.2 Importância do enxofre para as plantas	13
2.3 Metabolismo do enxofre em plantas.....	15
2.4 Estresse oxidativo e enzimas do sistema antioxidante das plantas.....	16
2.5 Metabolismo e estresse oxidativo causado pelo excesso de zinco	17
2.6 Contaminação e importância do estresse por zinco.....	19
2.7 Nutrição mineral e sua importância no potencial fitorremediador	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Local e época.....	23
3.2 Delineamento experimental e solução nutritiva	23
3.3 Instalação e condução do experimento	24
3.4 Coleta do material vegetal	26
3.5 Avaliações produtivas e nutricionais	27
3.5.1 Valor SPAD e números totais de folhas e perfilhos	27
3.5.2 Área foliar.....	28
3.5.3 Produção de massa seca.....	28
3.5.4 Concentrações de elementos minerais	28
3.6 Avaliações metabólicas	29
3.6.1 Quantificação de proteínas	29
3.6.2 Indicadores de estresse oxidativo (MDA e H ₂ O ₂)	29
3.6.3 Enzimas do sistema antioxidante.....	30
3.6.3.1 Catalase (EC 1.11.1.6).....	30
3.6.3.2 Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11).....	30
3.6.3.3 Glutathione redutase (EC 1.6.4.2)	31
3.6.3.4 Guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7).....	31
3.6.3.5 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)	31
3.6.3.6 Determinação de prolina.....	32
3.7 Análise estatística dos resultados	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Primeiro corte do capim tanzânia	33
4.1.1 Parâmetros produtivos e morfológicos	33
4.1.2 Diagnóstico visual de sintomas de deficiência e toxidez.....	37

4.1.3 Concentração e acúmulo de nutrientes.....	39
4.1.3.1 Enxofre.....	39
4.1.3.2 Macronutrientes catiônicos (potássio, magnésio e cálcio).....	42
4.1.3.3 Micronutrientes catiônicos (zinco, manganês, ferro e cobre)	44
4.1.4 Indicadores de estresse oxidativo.....	48
4.1.4 Enzimas relacionadas ao sistema antioxidante	51
4.1.4.1 Atividades das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e glutathione redutase	51
4.1.4.2 Atividade da enzima superóxido dismutase.....	57
4.1.5 Prolina	60
4.2 Segundo corte do capim tanzânia.....	61
4.2.1 Parâmetros produtivos e morfológicos	61
4.2.2 Diagnóstico visual de sintomas de deficiência e toxidez	65
4.2.3 Concentração e acúmulo de nutrientes.....	66
4.2.3.1 Enxofre.....	66
4.2.3.2 Nitrogênio	69
4.2.3.3 Macronutrientes catiônicos (potássio, magnésio e cálcio).....	70
4.2.3.4 Micronutrientes catiônicos (zinco, manganês, ferro e cobre)	74
4.2.4 Indicadores de estresse oxidativo.....	80
4.2.5 Enzimas relacionadas ao sistema antioxidante	83
4.2.5.1 Atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e glutathione redutase	83
4.2.5.2 Atividade da enzima superóxido dismutase.....	84
4.2.5 Prolina	87
5 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93

RESUMO

Suprimento de enxofre e o estresse causado pelo excesso de zinco no capim tanzânia

O capim tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) é promissor para uso em fitorremediação, devido ao seu sistema radicular extenso, boa adaptação a variados ambientes e alto rendimento de biomassa quando bem nutrido. O enxofre faz parte de compostos essenciais ao sistema antioxidante das plantas. A toxicidade causada por alta disponibilidade de metais, como o zinco, no meio de cultivo é um problema ambiental crescente. Objetivou-se avaliar o efeito do enxofre em amenizar o estresse causado pelo excesso de zinco no capim tanzânia. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em Piracicaba - SP, durante o verão, em delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial fracionado, com as combinações de doses de enxofre (mmol L^{-1}) e zinco ($\mu\text{mol L}^{-1}$): 0,1/0,7; 0,1/500; 0,1/3000; 1,0/250; 1,0/1000; 1,9/0,7; 1,9/500; 1,9/3000; 2,8/250; 2,8/1000; 3,7/0,7; 3,7/500 e 3,7/3000. Foram avaliadas as seguintes variáveis: componentes de produção (perfilhos, folhas, área foliar, massa de parte aérea e de raízes), concentrações dos nutrientes (N, S, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn), valor SPAD, atividades de enzimas do sistema antioxidante (GR, GPOX, APX, CAT e SOD) e concentração de prolina. A toxicidade de zinco no primeiro crescimento do capim limitou a produção de massa seca e o número total de folhas, enquanto no segundo crescimento também ocorreu limitação na área foliar e no número total de perfilhos. A concentração de enxofre na planta aumentou em função do fornecimento de enxofre e do excesso de zinco no meio de cultivo. O excesso de zinco na planta provocou desequilíbrio na nutrição da planta com os micronutrientes cobre, ferro e manganês. Os indicadores do estresse oxidativo foram sensíveis para detectar a toxicidade do zinco no capim. As reduções na concentração de prolina e nas atividades de enzimas do sistema antioxidante demonstraram o efeito do enxofre em aliviar o estresse por toxicidade de zinco no capim tanzânia.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes; Estresse oxidativo; Fitorremediação; Gramínea forrageira; Nutrição mineral de plantas; Prolina; Toxidez por metal; *Panicum maximum*

ABSTRACT

Sulfur supply and stress caused by zinc excess in tanzania guinea grass

Tanzania guinea grass (*Panicum maximum* cv. Tanzania) is promising for use in phytoremediation due to its extensive root system, good adaptation to diverse environments, and high biomass production when well nourished. Sulfur is part of essential compounds to the plant's antioxidant system. Toxicity caused by high availability of metals, such as zinc, in the growth medium is a growing environmental problem. The objective was to evaluate the effect of sulfur in mitigating the stress caused by zinc excess in tanzania guinea grass. The experiment was carried out in a greenhouse at Piracicaba, SP, during the summer, in a randomized block design with rates of sulfur (mmol L^{-1}) and zinc ($\mu\text{mol L}^{-1}$) of 1/0.7; 0.1/500; 0.1/3000; 1.0/250; 1.0/1000; 1.9/0.7; 1.9/500; 1.9/3000; 2.8/250; 2.8/1000; 3.7/0.7; 3.7/500 and 3.7/3000. The response variables evaluated were plant production components (number of tillers, number of leaves, leaf area, and shoots and roots dry matter), nutrient concentrations (N, S, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn and Zn), SPAD value, activities of the antioxidant enzymes (GR, GPOX, APX, CAT and SOD) and proline concentration. Zinc toxicity in the first growth of the grass limited the dry mass production and the total number of leaves, while in the second growth also there was limitation in the leaf area and the total number of tillers. The concentration of sulfur in the plant increased as a function of sulfur supply and excess zinc in the growth medium. Excess zinc in the plant caused imbalance in plant nutrition for the micronutrients copper, iron and manganese. The indicators of oxidative stress were sensitive to detect grass toxicity by zinc. Reductions in proline concentration and enzyme activities of the antioxidant system demonstrated the effect of sulfur in alleviating the stress of zinc toxicity in tanzania guinea grass.

Keywords: Antioxidant enzymes; Forage grass; Heavy metal toxicity; Mineral nutrition; Oxidative stress; Phytoremediation; Proline; *Panicum maximum*

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 22% do território brasileiro é ocupado por pastagens, o que equivale a cerca de 196 milhões de hectares. O país também possui o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, totalizando próximo de 200 milhões de cabeças. O Brasil é responsável por um quinto da carne bovina comercializada internacionalmente, o que mostra a relevância deste setor para as exportações (FAO, 2014).

As pastagens são um dos maiores e mais importantes ecossistemas do Brasil (SILVA et al., 2008). Por sua vez, o capim tanzânia (*Panicum maximum* cv. Tanzânia) tem se mostrado importante para a produção de forragem e como espécie promissora para a fitorremediação, devido ao seu sistema radicular extenso, boa adaptação a ambientes diversos e tem apresentado tolerância ao excesso de alguns metais (GILABEL et al., 2014; RABÊLO et al., 2017). Esse capim tem alto rendimento de biomassa por unidade de área, quando as plantas estão bem nutridas (JANK et al., 2010).

Existem áreas de pastagens que sofrem com a deposição inadequada de resíduos contendo elementos potencialmente tóxicos. Isso vem ocorrendo devido à intensificação das atividades industriais, ao crescimento da atividade agrícola e ao aumento do consumo de produtos manufaturados. Tem ocorrido aumento dos teores de elementos tóxicos nos solos, a exemplo da poluição com metais pesados, que se tem tornado um problema crescente e que pode resultar em sérios impactos ao ambiente (SENGUPTA, 1993; CARNEIRO, 2002).

O capim tanzânia pode ser importante para a fitorremediação de áreas contaminadas por metais pesados. Dentre as plantas promissoras para esta finalidade, destaca-se esse capim por apresentar boa capacidade de adaptação a condições edafoclimáticas diversas (JANK et al., 2010), rápido crescimento e acúmulo de biomassa, rápida absorção de nutrientes e tolerância às altas concentrações de metais pesados (GILABEL et al., 2014; RABÊLO et al., 2017).

Considerando que a produção de forragem depende do atendimento das necessidades nutricionais das plantas (LAVRES JUNIOR et al., 2008), a adequada nutrição mineral das plantas pode ser uma estratégia interessante para a amenização dos efeitos fitotóxicos provocados por metais. Como o enxofre (S) integra compostos de suma relevância para o sistema antioxidante das plantas, o fornecimento desse nutriente às plantas cultivadas em áreas contaminadas é uma alternativa para aliviar a fitotoxidez provocada por metais (DIXIT et al., 2015), entre os quais está o Zn.

Por outro lado, são poucos os trabalhos que abordam a adequada nutrição de plantas com o objetivo de amenizar os danos causados por elementos tóxicos em plantas, principalmente em espécies forrageiras cultivadas em clima tropical. Nesse contexto, o presente trabalho testou a hipótese que o S pode amenizar o estresse oxidativo causado pelo excesso de Zn no capim tanzânia, pela elevação dos mecanismos de tolerância, uma vez que o S é constituinte de compostos essenciais ao sistema oxidante das plantas. Assim, objetivou-se: (i) avaliar a influência da aplicação do S na nutrição e no metabolismo da planta e suas implicações na produção e na tolerância ao excesso de Zn no meio de cultivo do capim tanzânia; (ii) quantificar as espécies metabólicas relacionadas ao estresse por espécies reativas de oxigênio (EROs) no capim tanzânia em função das concentrações de S e Zn no tecido vegetal; (iii) avaliar as variações nos componentes de produção (perfilhos, folhas, área foliar, massa seca da parte aérea e das raízes) e na concentração de outros nutrientes do capim tanzânia, em função do fornecimento de doses de S combinadas com doses de Zn; (iv) avaliar as variações no valor SPAD; e (v) avaliar as atividades de enzimas e concentrações de substâncias orgânicas relacionadas ao estresse oxidativo nesse capim, em função do cultivo das plantas em meio com doses de S combinadas com doses de Zn.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O capim tanzânia

As gramíneas forrageiras oriundas da África têm sido amplamente utilizadas nas pastagens brasileiras. As principais espécies introduzidas no país, como por exemplo as *Panicum maximum* Jacq., chegaram em camas de palha em navios negreiros (BODDEY et al., 2003). Essa espécie é originária da África tropical, onde é encontrada em suas formas nativas nas margens florestais até a África do Sul, ocupando áreas recém-desmatadas e formando pastagens em condições de pouco sombreamento (BOGDAN, 1977). Também é uma das espécies de plantas forrageiras mais importantes para a produção de bovinos nas regiões de climas tropical e subtropical.

O capim tanzânia tem sido escolhido como planta remediadora por apresentar características desejáveis, como o rápido crescimento e acúmulo de biomassa, a rápida absorção de nutrientes e tolerância a altas concentrações de alguns metais pesados (GILABEL et al., 2014).

2.2 Importância do enxofre para as plantas

O S é absorvido pelas raízes das plantas na forma de sulfato e posteriormente é distribuído por toda a planta. Os transportadores de sulfato pela membrana plasmática são classificados como cotransportadores prótons/sulfato e mediam a captação ativa de sulfato impulsionado pelo gradiente de prótons transmembrana, dependente do pH (SAITO, 2004).

Esse nutriente constitui aminoácidos, proteínas, coenzimas (como coenzima A) e outros compostos bioquímicos nas plantas (EPSTEIN e BLOOM, 2006). Além disso, esse macronutriente é encontrado em oligopeptídeos, vitaminas (tiamina e biotina) e em uma variedade de produtos secundários (SAITO, 2004). Uma das importantes funções desempenhadas pelos aminoácidos com S é a manutenção da estrutura de proteínas, pelo grupo tiol da cisteína (Cys) por meio da formação de pontes dissulfeto, entre dois resíduos de cisteína, via oxidação (SAITO, 2004). A demanda nutricional de S para um crescimento adequado pelas plantas é de 1 a 5 g kg⁻¹ da massa seca das plantas e a concentração desse nutriente nas proteínas varia conforme a espécie vegetal e a célula da planta (MARSCHNER, 2012).

Esse macronutriente é um dos mais importantes nas plantas não só por desempenhar papel relevante no crescimento e no desenvolvimento vegetal, mas estar relacionado à

tolerância ao estresse das plantas, uma vez que possui importante papel na formação de compostos como os já apontados, mas também na glutathione e outros compostos com função crucial na tolerância a excesso de metais (GILL e TUTEJA, 2011). A glutathione (GSH) é um tripeptídeo essencial, metabolito fundamental para a manutenção da homeostase celular, que é também conhecido por desempenhar papel na sinalização e percepção de estresses, nas reações de defesa e no desenvolvimento da planta (HERNÁNDEZ et al., 2015). Por participar de compostos, como a glutathione, que integram o sistema antioxidante, elevam a tolerância das plantas e promovem a redução dos danos oxidativos, o S tem recebido ênfase em pesquisas com plantas com potencial na fitorremediação (RABÊLO, 2014).

O S é de fundamental importância para plantas forrageiras, como relatado por Lavres Junior et al. (2008), ao avaliarem os atributos nutricionais e produtivos de plantas de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, sob doses de S (0, 2, 4, 16, 32, 48, 64 e 80 mg L⁻¹) em solução nutritiva. Os resultados mostraram que as doses de S influenciaram, em dois períodos de crescimento, na concentração de S nas plantas, no número total de perfilhos, na produção de massa seca da parte aérea e nas raízes e no valor SPAD. Com o aumento do suprimento de S na solução constataram incremento na produção de massa seca das raízes de 21%. Conforme a elevação do fornecimento de S na solução, relataram incremento na produção de perfilhos de 85 e 35%, respectivamente para o primeiro e segundo corte.

Em pesquisa envolvendo o capim tanzânia foram avaliados os efeitos do S no estresse oxidativo provocado pelo excesso de cobre na solução nutritiva (GILABEL et al., 2014). Foram fornecidas soluções nutritivas com as concentrações de S de 0,1; 2 e 4 mmol L⁻¹ e concentrações de cobre (0,3; 100; 500 e 1000 µmol L⁻¹). Os autores constataram que o S amenizou os efeitos fitotóxicos provocados por excesso de cobre nesse capim. As concentrações de na solução de 2,0 e 4,0 mmol L⁻¹ elevaram os números de folhas e colmos em ambos os períodos de crescimento da gramínea, o que possibilitou o crescimento das plantas expostas ao estresse pelas elevadas concentrações do metal na solução. O aumento das concentrações de cobre na solução causou estresse no capim, o que proporcionou maior produção do aminoácido prolina, para proteger as células das plantas de danos oxidativos.

Em situações de estresse oxidativo em vegetais, a produção de prolina é de suma relevância, devido a sua função antioxidante. A síntese desse aminoácido ocorre por meio de via redutiva, que utiliza NADPH para a redução de glutamato para pirrolina 5 carboxilato (P5C) e finalmente, para prolina. Ele é considerado um dos principais aminoácidos protetores contra o estresse oxidativo em plantas e a de síntese de maior quantidade nos cloroplastos, em situações de estresse oxidativo, pode manter reduzida a síntese de NADPH: NADP⁺,

contribuindo para sustentar o fluxo de elétrons nos fotossistemas, o que reduz a fotoinibição e danos ao aparato fotossintético (FAGAN et al., 2016).

As publicações disponíveis reforçam a relevância do S para a tolerância das plantas submetidas a estresse por metais. As plantas tendem a maximizar o uso de S disponível devido as demandas do nutriente para o crescimento e desenvolvimento vegetal e para a resistência ao estresse (HAWKESFORD, 2012). Além disso, quando um elemento químico está no ambiente em muito baixa ou muito alta disponibilidade, esse elemento pode proporcionar modificações nas concentrações de outros elementos químicos. Um exemplo é a similaridade entre a absorção e a assimilação de S e N, uma vez que a maior fração desses nutrientes é reduzida e incorporada em aminoácidos e subsequentemente em proteínas (STULEN e DEKOK, 2012). O fornecimento inadequado de S pode proporcionar modificações na utilização de outros nutrientes, resultando em deficiências e diminuições na biossíntese de proteínas, teor de clorofila e, eventualmente, alterações no rendimento das culturas (IQBAL et al., 2013).

2.3 Metabolismo do enxofre em plantas

O sulfato é muito estável no interior da planta e necessita ser ativado antes que reações subsequentes possam prosseguir no rumo da sua assimilação. A reação entre SO_4^{2-} e ATP para formar 5'-adenililsulfato (APS) e pirofosfato, inicia a ativação do sulfato. Para impulsionar essa reação os produtos, APS e pirofosfato, são convertidos em outros compostos, pois energeticamente a reação de ativação é desfavorável. O pirofosfato é hidrolisado a fosfato inorgânico e APS reduzido ou sulfatado. A redução do APS é dominante, ocorre nos plastídios e é iniciada pela transferência de dois elétrons da glutathiona reduzida, pela APS redutase, para produzir sulfito. A redutase do sulfito transfere seis elétrons da ferredoxina para produzir sulfeto. Este, por sua vez, reage com a O-acetilserina para formar cisteína e acetato (EPSTEIN e BLOOM, 2006).

A cisteína é o primeiro composto orgânico que é constituído de S reduzido em células vegetais e posteriormente é incorporado a proteínas, coenzimas e glutathiona reduzida e atua como doador do grupo tiol para o aminoácido metionina (GILL e TUTEJA, 2011). O aminoácido cisteína também participa da formação de vários outros metabólitos, como fitoquelatinas e glucosinolato (SAITO, 2004).

A glutathiona, que possui fundamental importância para as plantas, em condições normais é responsável por 90 % da fração tiol. A síntese da glutathiona ocorre em dois passos,

sendo que no primeiro a glutacisteína é produzida a partir de glutamato e cisteína. No segundo passo, a glicina é acoplada a glutamilsteína, mediada pela glutathione sintase. A glutathione é um antioxidante em plantas, provavelmente muito mais importante que o sistema redox cisteína-cistina. Em cloroplastos, os compostos antioxidantes glutathione e ascorbato desempenham papel essencial na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (MARSCHNER, 2012).

Em situações de estresse oxidativo por metais pesados, algumas enzimas, aminoácidos e tióis não proteicos, que são produtos do metabolismo do S, possuem funções relevantes para a tolerância de plantas a esses metais, como por exemplo, a enzima glutathione redutase, que combate espécies reativas de oxigênio (SAITO, 2004; MARSCHNER, 2012). Nocito et al. (2002) trabalharam com solução nutritiva com período de exposição de 48 horas, no qual foi testada a dose de cádmio (Cd) de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ no cultivo de milho (*Zea mays*), o que causou efeito fitotóxico e estresse oxidativo nas plantas. Ao final da exposição ao metal as concentrações de tióis não protéicos totais, de cisteína e de glutathione reduzida foram muito mais elevadas nas plantas submetidas ao Cd. Os autores relataram que as raízes de milho responderam à exposição ao Cd aumentando a quantidade absorvida de sulfato, sendo esse resultado devido a um possível processo adaptativo das plantas para assegurar o fornecimento de compostos de S em situações de estresse oxidativo. Trabalhos com esse enfoque relacionando o fornecimento de S, como estratégia nutricional, para amenizar a toxicidade de Zn em gramíneas tropicais não são conhecidos.

2.4 Estresse oxidativo e enzimas do sistema antioxidante das plantas

O estresse ambiental resulta em alterações na homeostase celular vegetal e elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que proporciona o estresse oxidativo (BOARETTO et al., 2014). A geração excessiva de EROs foi considerada por muito tempo um processo negativo, principalmente com moléculas cujas concentrações deveriam ser mantidas o mais baixo possível. Contudo, as EROs são componentes essenciais de processos de sinalização que estimulem a expressão do gene e a estrutura celular em resposta às alterações ambientais (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). As plantas protegem suas células contra o dano oxidativo, por meio das vias de defesa que possibilitam a eliminação das EROs (GRATÃO et al., 2005). Portanto, sinais redox são muito importantes em respostas de defesa e fenômenos de tolerância das plantas. A conversão do oxigênio molecular para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gera produtos intermediários potencialmente tóxicos, devido à alta

reatividade (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). O H_2O_2 é reconhecido como uma substância que participa do sinal na ativação de respostas de defesa nas plantas (FOYER e NOCTOR, 2000).

A degradação eficiente de H_2O_2 nos peroxissomos requer um sistema antioxidante de defesa constituído por compostos de baixo peso molecular, tais como ácido ascórbico e enzimas de proteção, como catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). A enzima CAT não está presente nos cloroplastos, por esse motivo a degradação do peróxido de hidrogênio nos cloroplastos das plantas é realizada pela APX ligada ao tilacóide. As moléculas de O_2^- e H_2O_2 que não foram degradadas no tilacóide passam pela degradação no estroma por meio da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) ou da APX. A ocorrência da atividade da SOD, em uma grande variedade de compartimentos metabólicos demonstra a importância das enzimas do ciclo da glutathiona/ascorbato, no exterior do cloroplasto (VITÓRIA et al., 2001).

O ciclo de ascorbato-glutathiona é ativado comumente por plantas sob estresse, tanto para a remoção de H_2O_2 quanto para assegurar a disponibilidade de glutathiona reduzida (GSH) para a síntese de proteínas que promovem ligação a metais (VITÓRIA et al., 2001). Isoenzimas de APX são encontradas no citosol e cloroplastos (estroma e tilacóides) e sequestram o H_2O_2 em detrimento do ascorbato, protegendo as células das plantas contra os efeitos destrutivos do H_2O_2 (KARYOTOU E DONALDSON, 2005). O primeiro produto da reação catalisada pela APX é o radical monodehidroascorbato (MDA) que pode ser convertido a ascorbato por meio da atividade da enzima monodehidroascorbato redutase ou pode se converter espontaneamente a dehidroascorbato e este, pela dehidroascorbato redutase, pode regenerar o ascorbato (FOYER et al., 1994). Outra enzima de suma relevância nesse processo é a glutathiona redutase, que está associada com a alteração da razão de GSH/GSSG (formas reduzida e oxidada da glutathiona) que é mais decisiva para determinar a resistência das plantas ao estresse do que o conteúdo de GSH (HENRIQUES et al., 2012).

2.5 Metabolismo e estresse oxidativo causado pelo excesso de zinco

O Zn é micronutriente para plantas e está envolvido na ativação enzimática (como cofator) e na estabilização das estruturas de proteínas celulares. Esse micronutriente é o segundo metal de transição mais abundante em organismos vivos, somente tendo o ferro à frente. Ele compõe cerca de 300 enzimas de vegetais (LI et al., 2012), sendo o único a constituir enzimas de todas as seis classes, incluindo oxidoredutases, transferases, hidrolases,

liases, isomerases e ligases (MARSCHNER, 2012) e enzimas como a superóxido dismutase, a glutamato desidrogenase e a anidrase carbônica (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). Esse nutriente é relevante pela participação na ativação enzimática da trifosfato-desidrogenase, importante na glicólise e em processos como a respiração e a fotossíntese (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). Muitas enzimas dependentes de Zn são envolvidas na carboxilação, além desse metal ser requerido para manter a integridade de biomembranas (MARSCHNER, 2012). É absorvido principalmente como o cátion divalente Zn^{2+} , contudo, em pH elevado é absorvido também como cátion monovalente (Zn^{+1}) (MARSCHNER, 2012).

O excesso de Zn em organismos pode conduzir à toxicidade do elemento, desequilíbrios de nutrientes, inibição do crescimento, clorose foliar e fotossíntese diminuída (LI et al., 2013). A toxicidade de zinco (Zn) usualmente manifesta-se como clorose nas folhas jovens de plantas, mas também podem surgir pigmentos avermelhados no pecíolo e nas nervuras das folhas, o que pode ser deficiência induzida de Mg ou Fe, devido a semelhança entre os raios iônicos dos íons desses elementos (MARSCHNER, 2012). A deficiência de manganês também pode ocorrer, uma vez que a disponibilidade elevada de Zn pode reduzir acentuadamente a absorção de manganês pelas plantas. O excesso de Zn pode também inibir a atividade do fotossistema II, substituindo o manganês nas membranas tilacóides (MARSCHNER, 2012). A toxicidade de Zn inibe a fotossíntese por mecanismos como a redução da atividade da ribulose bifosfato carboxilase causada pela competição entre Zn e Mg (MARSCHNER, 2012).

A toxicidade de Zn pode ser verificada em solos ácidos, originados de rochas ricas nesse elemento e contaminados por fontes industriais ou por resíduos orgânicos (DECHEN e NACHTIGALL, 2006). Esse elemento também ocorre em concentrações mais elevadas em resíduos de comunidades modernas e industrializadas (MARSCHNER, 2012) e sua toxicidade se manifesta, principalmente, em solos contaminados por mineração e fundição e tratados com lodo de esgoto (BROADLEY et al., 2007).

Trabalhando com quatro tratamentos de Zn (0; 0,5; 1 e 3 mmol L⁻¹), aplicadas durante seis dias em plântulas de trigo (*Triticum sativum*), Li et al. (2013) verificaram que as plântulas que receberam Zn tiveram aumento significativo da atividade da glutatona redutase nas folhas. Entretanto, nas raízes a atividade dessa enzima foi inibida marcadamente, apresentando redução da atividade de 90% em comparação com o controle. Também ocorreu a redução do teor de clorofila de 10% para a *clorofila a* e 13% para a clorofila total na dose de Zn de 3 mmol L⁻¹. Para a *clorofila b* foram observadas reduções de 17%, 21% e 26% com o

emprego de Zn de 0,5; 1 e 3 mmol L⁻¹, respectivamente. Esses resultados mostram que a toxicidade de Zn pode prejudicar a fotossíntese das plantas.

Relatos da toxicidade de Zn em plantas forrageiras são muito pouco encontrados na literatura. Nesse sentido, Hernandez et al. (2009) abordaram os efeitos de seis doses de Zn (0, 15, 30, 60, 120 e 240 mg dm⁻³) no desenvolvimento, nutrição e produção de massa seca do capim tanzânia cultivado em latossolo vermelho distrófico. Uma conclusão relatada foi que esse capim apresentou alta tolerância à toxicidade de Zn, com possível nível crítico tóxico no tecido vegetal de 273 mg kg⁻¹.

Zhang et al. (2017) estudaram plantas de chá (*Camellia sinensis* cv. Ruixue) com um ano de idade, em caixas de hidroponia por quatro meses com solução nutritiva e testaram cinco condições de fornecimento de Zn, a saber: deficiência, moderação (1,5; 7,5 e 15 mmol L⁻¹) e excesso (150 mmol L⁻¹). Obtiveram que a deficiência ou excesso de Zn afetaram a absorção de P, S, Ca, Cu, Fe e alumínio pelas plantas, enquanto os conteúdos de fósforo, S e alumínio diminuíram nas raízes sob deficiência e excesso de Zn e os de Zn, Cu e Fe diminuíram nas folhas sob excesso de Zn. Acrescentaram que o estresse por excesso de Zn afetou a homeostase iônica das plantas e interferiu absorção iônica e na regulação do metabolismo de carboidratos, metabólitos nitrogenados e flavonóides.

2.6 Contaminação e importância do estresse por zinco

O acúmulo de metais pesados em solos agrícolas tem se tornado problema ambiental crítico nas décadas recentes (SILVEIRA et al., 2008). A contaminação de solos por Zn pode ter origem em resíduos provenientes de fontes industriais e da aplicação de resíduos orgânicos (DECHEN e NACHTIGALL, 2006), o que resulta em problema crescente nas comunidades modernas, uma vez que esse elemento é encontrado na maioria de resíduos (MARSCHNER, 2012). Uma das atividades que promovem a poluição do solo com agentes contaminantes, como metais pesados, é a indústria metalúrgica, principalmente a de metais não ferrosos e a mineração, pelas quais é feita a extração de vários metais e a produção de muitos rejeitos. Uma vez elevados os teores de Zn nos solos, os mesmos afetam de forma severa a vegetação (BAKER et al., 1994). A toxicidade por Zn é relevante também em solos recebendo lodo de esgoto, e em solos urbanos e peri-urbanos enriquecidos por aportes antropogênicos de Zn, especialmente em solos de pH baixo (BROADLEY et al., 2007). Os metais podem ser introduzidos nos solos via deposição atmosférica, aplicação de fertilizantes, esterco animal, pesticidas e biossólidos. Dependendo da origem e do sistema de tratamento do esgoto, os

biossólidos podem apresentar concentrações elevadas de metais pesados (SILVEIRA et al., 2008). Portanto, o uso agrícola de lodo de esgoto tem aumentado, sendo geradas grandes quantidades de resíduos e subprodutos em processos industriais na sociedade e o uso indevido de grandes quantidades de agroquímicos como os fertilizantes tem aumentado o teor de Zn nos solos, o que torna necessário o desenvolvimento de técnicas para a fitorremediação desse elemento (BROADLEY et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008).

Elementos como Zn, entre outros, afetam severamente as plantas, quando são depositados nos solos em elevadas quantidades. No trabalho de Pinto et al. (2009), foi observada redução linear da altura das plantas, da produção de massa seca da parte aérea e das raízes das plantas de eucalipto (*Eucalyptus* sp), com a elevação da concentração de Zn para $450 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que demonstra o efeito da toxicidade por Zn na morfologia e produção das plantas.

Pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de avaliar os efeitos da toxicidade por Zn em diversas culturas (CARNEIRO et al., 2002; LI et al., 2013; LI et al., 2012; REMANS et al., 2012), o que demonstra a necessidade de estudos abordando as formas de combater essa toxicidade (BROADLEY et al., 2007). Neste sentido, Wu et al. (2015) trabalharam com plantas de berinjela (*Solanum melongena*) submetidas a doses de Zn de 10 mmol L^{-1} e observaram o aumento de espécies reativas de oxigênio e a ocorrência de danos nas membranas, como peroxidação lipídica e vazamento de eletrólitos.

Estudos envolvendo a toxicidade por Zn em gramíneas forrageiras são escassos, principalmente aqueles buscando elucidar os mecanismos dos nutrientes fornecidos adequadamente, para a amenização do estresse causado pelo excesso de Zn.

2.7 Nutrição mineral e sua importância no potencial fitorremediador

Alguns estudos abordaram os efeitos da nutrição mineral na toxicidade de metais para plantas. São disponíveis relatos dos efeitos do silício na amenização da toxicidade provocada pelo Cd no milho (*Zea mays*) (VACULÍK et al., 2015), dos efeitos do Si na toxicidade resultante do excesso de Zn em plantas de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus camaldulensis*) (PINTO et al., 2009; ACCIOLY et al., 2009; respectivamente), dos benefícios da adubação fosfatada no alívio da toxicidade por Zn e Cd, em plantas de trema (*Trema micranta*) (SOARES et al., 2006; SOARES et al., 2007) e dos efeitos do S e do selênio para aliviar a toxicidade provocada pelo Cd em plantas de trigo (KHAN et al., 2015). Esses estudos ressaltam a importância da abordagem da nutrição, por meio do uso de agentes

amenizadores para aliviar os efeitos tóxicos de vários metais pesados em culturas. Os resultados servem para enfatizar a demanda por mais estudos que esclareçam os mecanismos de atuação dos nutrientes no sistema antioxidante e nos parâmetros morfológicos das plantas, que contribuem para elevar a tolerância dessas plantas aos metais presentes em concentrações excessivas no meio de cultivo.

Em experimentos (ACCIOLY et al., 2009; PINTO et al., 2009) com plantas de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla*) foi demonstrado que o silício resultou em redução na toxicidade por Zn. No trabalho de Pinto et al. (2009) foi verificado que o silício reduziu a concentração de Zn na parte aérea e o transporte de Zn das raízes para a parte aérea das plantas de eucalipto. No estudo de Accioly et al. (2009) com mudas de *Eucalyptus camaldulensis* foi constatado que o silício reduziu em mais de 75% o fator de transporte de Zn das raízes para a parte aérea das plantas nos solos com maior contaminação de Zn.

A influência da nutrição fosfatada na toxicidade de Zn e Cd foi testada em plantas de trema (*Trema micrantha*) (SOARES et al., 2006; SOARES et al., 2007; respectivamente), em experimentos com duração de 100 dias. Os autores concluíram que, possivelmente, o fósforo reduziu o transporte do metal das raízes para a parte aérea, em mecanismo que aliviou a fitotoxicidade causada pelos metais às plantas de trema.

Considerando a importância do S para as plantas e a relevância da toxicidade causada por metais pesados aos vegetais, encontram-se trabalhos publicados que abordam a nutrição como forma de amenizar o estresse provocado pelo excesso desses metais, como já abordado. Entretanto, não são conhecidos trabalhos que utilizam o S como estratégia da nutrição de plantas para aliviar o estresse causado pelo excesso de Zn, principalmente em gramíneas forrageiras tropicais como o capim tanzânia. É de suma importância considerar que o metabolismo do S e seus metabolitos desempenham papéis importantes na resposta ao estresse da planta (KHAN et al., 2013), como a glutatona, que faz parte do metabolismo do S é essencial para a manutenção da homeostase celular, além desempenhar papel importante na sinalização e percepção de estresses e nas reações de defesa das plantas (HERNÁNDEZ et al., 2015).

O estudo de Dixit et al. (2015) tratou de avaliar os efeitos do e S na toxicidade de arsênio, em experimento com plantas de arroz (*Oryza sativa*), durante 10 dias. Os autores concluíram que a redução da toxicidade do arsênio pelo S envolveu um efetivo sistema antioxidante nessas plantas. Em condições de estresse, a glutatona desintoxica o H_2O_2 por meio do ciclo do ascorbato-glutatona e tem a capacidade de imobilizar o arsênio nas raízes e,

assim, reduz a quantidade transportada para as folhas da planta. Isto demonstra a relevância de estudos que esclareçam os inúmeros mecanismos de atuação do S em situações de estresse oxidativo causado pela exposição de plantas a excessos de elementos no meio de cultivo das plantas.

O efeito amenizador do S foi estudado também por Gilabel et al. (2014), em condição de toxicidade de Cu para o capim tanzânia. Nessa pesquisa foram alcançados resultados positivos para a aplicação do S como amenizador da fitotoxicidade por esse metal.

Por participar de compostos do sistema antioxidante das plantas, o S tem recebido ênfase em pesquisas, buscando elevar a tolerância das plantas e promover a redução dos danos oxidativos às mesmas. Em estudo de Khan et al. (2015) com plantas de trigo, num período experimental de 15 dias, foi analisada a influência do S e do selênio na proteção da capacidade fotossintética do trigo sob estresse de Cd. As atividades de diversas enzimas do sistema antioxidante foram aumentadas nas plantas que receberam tratamentos com S e selênio. Também os conteúdos de cisteína e glutathione reduzida aumentaram com as aplicações de S e de selênio. Os autores concluíram que o fornecimento de S e de selênio às plantas sob estresse de cádmio reduziu o estresse oxidativo nas plantas de trigo.

Rabêlo et al. (2017) estudaram plantas de capim tanzânia cultivadas dois períodos de crescimento em solução nutritiva, com cinco doses de S (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L⁻¹) e cinco de Cd (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L⁻¹). Quando foi fornecida dose considerada elevada de Cd (2,0 mmol L⁻¹) associada à baixa dose de S (0,1 mmol L⁻¹) foi verificada a maior concentração de Cd no tecido foliar, mas o contrário foi obtido com o suprimento de Cd de 2,0 mmol L⁻¹ e de S de 3,7 mmol L⁻¹. Assim, os autores destacaram a importância do S em alterar a quantidade do metal pesado que foi transportado para a parte aérea do capim. Também concluíram que o fornecimento adequado de S reduziu a fitotoxicidade provocada pelo Cd nesse capim, principalmente durante o segundo período de crescimento. Essa pesquisa permitiu confirmar o capim tanzânia como espécie promissora para a fitoextração de metais (nesse caso Cd), uma vez que a planta apresentou elevada produção de massa e absorção do elemento contaminante.

A absorção de S e a produção de compostos que contenham esse macronutriente é essencial para o desempenho de funções críticas em muitos processos biológicos, incluindo o papel de compostos contendo S para a homeostase de plantas sob estresse de elementos químicos (NA e SALT, 2011). Desta forma, o fornecimento adequado de S pode ser uma estratégia de nutrição mineral de plantas para amenizar a toxicidade por metais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e época

O experimento foi conduzido em casa de vegetação (latitude 22° 43" S e longitude 47° 38" O), com o *Panicum maximum* cv. Tanzânia, sendo cultivado durante o período de verão, em Piracicaba – SP.

3.2 Delineamento experimental e solução nutritiva

Foram estudadas combinações de cinco doses de S (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L⁻¹) com cinco doses de Zn (0,7; 250; 500; 1000 e 3000 µmol L⁻¹), em esquema fatorial fracionado 5², como descrito por Littell e Mott (1975). Assim, as 13 combinações utilizadas para S e Zn foram: 0,1/0,7; 0,1/500; 0,1/3000; 1,0/250; 1,0/1000; 1,9/0,7; 1,9/500; 1,9/3000; 2,8/250; 2,8/1000; 3,7/0,7; 3,7/500 e 3,7/3000. Os vasos foram distribuídos conforme o delineamento estatístico de blocos ao acaso, com seis repetições (totalizando setenta e oito vasos), prevendo a utilização de três repetições para as avaliações de produção e nutrição das plantas e outras três repetições para as determinações bioquímicas e metabólicas.

As soluções nutritivas foram preparadas a partir da solução completa de Hoagland e Arnon (1950), para atender as combinações estabelecidas (Tabela 1), sendo que a dose de S (2 mmol L⁻¹) foi modificada para uma dose próxima (1,9 mmol L⁻¹) com o objetivo de que as doses estudadas apresentassem intervalos equivalentes. O fornecimento de nitrogênio e potássio da solução original foi modificado de 15 e 6 mmol L⁻¹ para 30 e 8 mmol L⁻¹, respectivamente. As doses de S na solução de Hoagland e Arnon (1950) foram selecionadas para simular as condições de baixa, intermediária e alta disponibilidade do nutriente em solução. As doses de S iguais a 0,1; 2 e 4 mmol L⁻¹ já foram estudadas anteriormente em trabalho com capim tanzânia sob estresse oxidativo por cobre (GILABEL et al., 2014). Doses iguais as estudadas neste trabalho foram avaliadas em experimento com a mesma gramínea sob efeito fitotóxico provocado por Cd (RABÊLO et al., 2017). Enquanto, as doses de Zn partiram do valor mínimo de 0,7 µmol L⁻¹, proposto por Hoagland e Arnon (1950), até doses que possivelmente provocariam a toxidez das plantas estudadas conforme literatura. Entre os estudos encontrados pode-se citar Li et al. (2013) que trabalharam com 0; 0,5; 1 e 3 mmol L⁻¹ de Zn em experimento com a gramínea forrageira trigo (*Triticum sativum*) e que obtiveram

resultados interessantes relacionados com a glutathione redutase e outros compostos bioquímicos das plantas.

3.3 Instalação e condução do experimento

A semeadura foi realizada no dia 17 de dezembro de 2014, com as sementes da gramínea sendo distribuídas em bandeja de polietileno contendo areia lavada em água corrente e desionizada. No dia 30 de dezembro de 2014, quinze mudas foram transplantadas (plântulas em torno de 4 cm de altura) para cada vaso plástico com volume de 3,6 litros, contendo quartzo moído (sílica) como substrato. Desbastes periódicos foram realizados até que fossem deixadas seis plantas por vaso, antes da adição das soluções contendo os tratamentos definitivos de Zn, uma vez que os tratamentos com os tratamentos com S.

Tabela 1 – Volumes das soluções estoques utilizados no preparo das soluções nutritivas para as combinações das doses de S e Zn

S (mmol L⁻¹)	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2,8	2,8	3,7	3,7	3,7
Zn (μmol L⁻¹)	0,7	500	3000	250	1000	0,7	500	3000	250	1000	0,7	500	3000
Solução estoque	Volume (mL L ⁻¹)												
KH ₂ PO ₄ (1 mol/L)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KNO ₃ (1 mol/L)	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
NH ₄ NO ₃ (1 mol/L)	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Ca(NO ₃) ₂ (1 mol/L)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
CaCl ₂ .2H ₂ O (1 mol/L)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1,7	1,7	0,8	0,8	0,8
MgSO ₄ .7H ₂ O (1 mol/L)	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2
CaSO ₄ .2H ₂ O (0,01 mmol/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	80	80	170	170	170
MgCl ₂ .6H ₂ O (1 mol/L)	1,9	1,9	1,9	1	1	0,1	0,1	0,1	0	0	0	0	0
Micronutrientes - Fe e Zn *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZnCl ₂ *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FeCl ₃ *	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

*A solução estoque de micronutrientes – Fe e Zn (μmol L⁻¹) foi composta por H₃BO₃=46,29; MnCl₂= 9,10; CuCl₂.2H₂O= 0,31 e Na₂MoO₄.H₂O=0,10. Foram preparadas três soluções estoque de Zn (0,7; 250 e 500 μmol L⁻¹), utilizando-se ZnCl₂, e no preparo das soluções nutritivas contendo Zn de 1000 e 3000 μmol L⁻¹ foi empregada a solução estoque de 500 μmol L⁻¹. A solução de FeCl₃ foi de 90 μmol L⁻¹.

Durante a primeira semana de cultivo, cada vaso recebeu 1,15 L da solução nutritiva completa proposta por Hoagland e Arnon (1950), mas tendo a concentração de S reduzida para 0,1 mmol L⁻¹ e sendo diluída a 20% da sua força iônica, uma vez que se buscava adaptar as plantas à pressão osmótica da solução nutritiva completa. Após este período foi utilizada solução nutritiva com 100% da força iônica e modificada para atender as doses de S. Por fim na terceira semana, a solução foi trocada por solução que além das doses de S adicionadas anteriormente continha também as doses definitivas de Zn, ou seja, todas as combinações de doses S × Zn estudadas.

Para que houvesse boa aeração do sistema radicular as soluções foram circuladas, no mínimo, seis vezes ao dia e drenadas à noite durante a primeira semana. Após essa semana, a solução foi circulada três vezes ao dia e drenada à noite. A circulação das soluções foi

realizada de forma manual, a estrutura pode ser vista na figura 1, no qual a solução foi retirada do vaso por meio de um dreno diretamente para um frasco plástico e posteriormente cada solução era devolvida para o respectivo vaso. Durante o período experimental, foram efetuadas trocas de soluções nutritivas a cada 14 dias e o volume de solução (1,15 L) foi completado a cada manhã com água desionizada.

Figura 1. Casa de vegetação, vasos com plantas e materiais utilizados para realizar a circulação das soluções nutritivas de forma manual. Essa foto foi tirada durante o primeiro período de crescimento das plantas deste experimento.

3.4 Coleta do material vegetal

As plantas de capim tanzânia foram avaliadas durante dois períodos de crescimento, sendo que os cortes foram determinados pela senescência das folhas velhas das plantas, uma vez que não foram diagnosticados sintomas severos de toxidez pelo metal. As raízes foram coletadas imediatamente após o segundo corte da parte aérea.

O primeiro corte foi realizado no dia 6 de fevereiro de 2015 (38 dias após o transplântio das mudas), no qual foi coletada a parte aérea das plantas dos três blocos para avaliações de produção de massa e nutrição mineral e dos três blocos para avaliações metabólicas. O segundo corte das plantas dos blocos para produção foi realizado no dia 7 de março de 2015 (29 dias após o primeiro corte), com a coleta da parte aérea e das raízes das

plantas. A segunda coleta do capim (parte aérea e raízes) para as avaliações bioquímicas foi realizada no dia 8 de março de 2015. O primeiro corte foi realizado a 5 cm de altura em relação ao substrato, para permitir a rebrotação das plantas, enquanto no segundo corte as plantas foram cortadas no nível da sílica (colo das plantas). Após a realização do segundo corte, houve separação das raízes da sílica, o que foi realizado com o auxílio de peneira de malha de 0,25 mm, lavando-se as raízes em água corrente e água desionizada.

Os componentes das plantas foram separados em duas lâminas de folhas recém-expandidas (LR), as quais possuíam lígula visível e estavam completamente expandidas, demais lâminas foliares (DL) que incluíam lâminas não expandidas, folhas maduras (inclusive aquelas em senescência) e os colmos + bainhas (C+B).

Na coleta das plantas para determinações bioquímicas, após o corte as partes das plantas foram separadas e colocadas em papel alumínio com a devida identificação. Esse material em papel alumínio foi rapidamente levado para o laboratório, para ser transferido para um freezer a -80°C. Posteriormente, esse material vegetal foi moído utilizando-se um moinho IKA, com nitrogênio líquido e foi acondicionado em tubo falcon de 50 mL e conservado em freezer a -80°C até o momento das análises. Os tecidos vegetais coletados para determinações de produção e nutricionais (tanto parte aérea quanto raízes) foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 65°C, por 72 horas e, a seguir, moídos em moinho do tipo Wiley.

3.5 Avaliações produtivas e nutricionais

As avaliações referentes à produção e à nutrição mineral foram realizadas nas plantas dos dois períodos de crescimento.

3.5.1 Valor SPAD e números totais de folhas e perfilhos

No decorrer dos dois períodos de crescimento das plantas foi determinado o índice relativo de clorofila (valor SPAD). Para essa determinação, foram efetuadas leituras, uma em cada período de crescimento das plantas em horário padronizado (onze horas da manhã), após oito dias da aplicação da solução com doses de S e de Zn. Essas leituras foram realizadas em dez lâminas foliares por vaso, no terço médio das lâminas das folhas recém-expandidas (folhas diagnósticas), registrando-se a média para cada vaso.

Os números de folhas e perfilhos foram contados ao final de cada período de crescimento, na ocasião do primeiro e do segundo corte das plantas.

3.5.2 Área foliar

A área foliar foi determinada imediatamente após cada corte das plantas, com o emprego do aparelho integrador de área foliar LICOR[®], modelo LI 3100. Para isto, foram utilizadas as lâminas foliares, que foram separadas em lâminas de folhas recém-expandidas e demais lâminas foliares.

3.5.3 Produção de massa seca

A avaliação da produção de massa seca das plantas, de cada unidade experimental, foi realizada após a secagem do material vegetal. Essa determinação foi realizada por meio da pesagem em balança de precisão dos tecidos da parte aérea das plantas separadamente e efetuada a soma delas para a obtenção da massa da parte aérea. As raízes também foram pesadas em balança de precisão.

3.5.4 Concentrações de elementos minerais

Nas amostras secas e moídas, tanto da parte aérea (primeiro e segundo cortes) quanto das raízes, foi realizada a determinação da concentração dos elementos minerais. Para a determinação de nitrogênio empregou-se a digestão sulfúrica, enquanto para a determinação dos demais elementos utilizou-se a digestão nítrico-perclórica, conforme metodologia descrita por Sarruge e Haag (1974). Para o nitrogênio foi efetuada a destilação no equipamento micro Kjeldahl e a titulação com solução diluída de ácido sulfúrico. Para as determinações dos demais elementos foram empregados os seguintes procedimentos: o S por meio de turbidimetria do cloreto de bário (TABATABAI, 1982), o potássio por fotometria de chama e os demais (Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn) por espectrometria de absorção atômica (SARRUGE e HAAG, 1974). A partir dos valores resultantes das determinações de concentrações dos nutrientes e com os resultados de produção de massa seca das plantas, foram determinados os acúmulos de S, nitrogênio, macronutrientes catiônicos e dos quatro micronutrientes catiônicos.

3.6 Avaliações metabólicas

As avaliações metabólicas compreenderam as determinações dos indicadores de estresse oxidativo das plantas (peróxido de hidrogênio e malondialdeído), concentração do aminoácido prolina e as atividades das enzimas constituintes do sistema antioxidante das plantas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPOX), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD).

Para viabilizar a determinação da atividade enzimática (CAT, APX, GPOX e GR) e a quantificação das proteínas, fez-se necessária a extração proteica. Esta extração foi realizada utilizando 1 g de amostra de tecido vegetal macerado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio e polivinilpolipirrolidona (PVPP), com o auxílio de um almofariz colocado em caixa de isopor com gelo. O tampão fosfato de potássio utilizado (100 mmol L^{-1} em pH 7,5) foi uma mistura de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) 1 mmol L^{-1} e ditioneitol (DTT) 3 mmol L^{-1} . O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm à temperatura de 4°C por 30 minutos, sendo armazenado o sobrenadante em freezer -80°C.

3.6.1 Quantificação de proteínas

A concentração total de proteína foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os valores foram determinados utilizando-se uma curva padrão de BSA por meio de regressão linear. Para esta determinação, foram adicionados 1000 μL de reagente de Bradford a cada 20 μL de extrato vegetal. O branco constou de 20 μL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5) e 1000 μL de reagente de Bradford.

3.6.2 Indicadores de estresse oxidativo (MDA e H_2O_2)

Para a determinação dos indicadores de estresse oxidativo (MDA e H_2O_2), foi realizada a extração com 200 mg de material vegetal (parte aérea ou raízes), em 2 mL de ácido tricloroacético (0,1%) e aproximadamente 20% de PVPP. O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Para a determinação de MDA, foi utilizada a solução de ácido tricloroacético (20%) e de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%. Ao extrato adicionou-se esta solução e o extrato foi disposto em banho seco a 95°C por 30 min. Posteriormente, os extratos foram colocados em gelo durante 10 min e logo após, em temperatura ambiente por

15 min para estabilização. Após esse período, o teor de MDA foi mensurado em espectrofotômetro com leituras a 535 e 600 nm (GRATÃO et al., 2012). A concentração de malondialdeído (MDA) foi estimada pela equação específica para esta reação (MIHARA et al., 1980).

A concentração de H_2O_2 foi determinada segundo Gay et al. (1999). A determinação de H_2O_2 , foi iniciada pela adição de tampão fosfato 100 mmol L^{-1} a pH 7,5 e iodeto de potássio 1 mol L^{-1} ao sobrenadante do extrato vegetal centrifugado. Esse material foi submetido a banho de gelo e escuro por 1 hora, sendo estabilizado por 15 minutos em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 390 nm.

3.6.3 Enzimas do sistema antioxidante

3.6.3.1 Catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada por meio da reação de uma mistura contendo 1 mL de tampão de fosfato de potássio (100 mmol L^{-1} , pH 7,5) em 2,5 mL de 30% de H_2O_2 , para o qual adicionou-se 25 μL do extrato de proteína. O branco foi produzido por 1 mL da mistura de tampão fosfato de potássio com peróxido de hidrogênio e por 25 μL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,5). Para a determinação foi efetuada a decomposição de H_2O_2 durante 1 min e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 240 nm sob temperatura de 25°C (MONTEIRO et al., 2011).

3.6.3.2 Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11)

A atividade da APX foi realizada por espectrofotometria a 290 nm, por 1 min. Para promover a reação utilizou-se uma solução contendo 0,8568g de K_2HPO_4 ; 0,4216 g de KH_2PO_4 ; 0,088 g de ácido ascórbico e 0,0372 g de EDTA, que foi colocada em banho-maria a 30°C e mantida no escuro durante toda a determinação. Para a análise foram adicionados 860 μL de solução tampão e 100 μL de solução de H_2O_2 a 40 μL de extrato vegetal. O H_2O_2 foi adicionado no momento da leitura a uma cubeta de quartzo (CAKMAK e HORST, 1991). A atividade da APX foi determinada pelo cálculo por meio do uso do coeficiente de extinção de ascorbato de $2,8 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.6.3.3 Glutathiona redutase (EC 1.6.4.2)

A atividade da GR foi avaliada conforme Gratão et al. (2008). A mistura de reação foi composta por 3 ml de tampão fosfato de potássio a pH 7,5 e 100 mmol L⁻¹ e 1,5 mL de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB), com as cubetas sendo submetidas ao banho maria a 30°C e logo após, a mistura de reação foi completada com a adição de 1 mmol L⁻¹ de glutathiona oxidada e NADPH 0,1 mmol L⁻¹. A atividade da GR foi estimada pela redução da glutathiona oxidada, por espectrofotometria a 412 nm.

3.6.3.4 Guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade da enzima GPOX foi realizada conforme a metodologia descrita por Matsuno e Uritani (1972). O meio de reação foi constituído de 0,780 mL de tampão de fosfato-citrato, 50 µl de solução de guaiacol a 0,5% e 20 µl de extrato de proteína, com aquecimento em banho-maria a 30°C durante 15 min. O branco foi constituído por 800 µl de tampão fosfato-citrato, 50 µl de guaiacol 0,5% e 50 µl de H₂O₂ 3%. Um banho de gelo e a adição de 50 µl metabissulfito de sódio a 2% foram usados para parar a reação e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 450 nm.

3.6.3.5 Superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi detectada em gel em sistema não-desnaturante de poliacrilamida (PAGE). A coloração para determinar a atividade da SOD foi realizada como descrito por Azevedo et al. (1998). Foi adicionada a cada canal a quantidade de proteína, que migrou em corrente ajustada a 15 mA/gel por aproximadamente 5 h. Após a separação do gel não-desnaturante, o mesmo foi lavado com água desionizada e incubado no escuro, em tampão de fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ a pH 7,8, contendo EDTA 1 mmol L⁻¹, 0,1 mmol L⁻¹ de nitroazul de tetrazólio, 0,05 mmol L⁻¹ de riboflavina, e 0,3 g L⁻¹ de N, N, N', N'-tetrametiletenodiamina (TEMED). A incubação ocorreu por 30 min, sob agitação constante e temperatura ambiente. Os géis foram lavados com água desionizada, deixados em repouso em solução de ácido acético a 7% e retornaram para água desionizada, quando foram iluminados com luz fluorescente até que as bandas de atividade SOD fossem visíveis no gel, de cor roxa. A SOD bovina foi utilizada como padrão para todos os géis.

3.6.3.6 Determinação de prolina

Para a determinação da concentração de prolina foi utilizado o material vegetal macerado em nitrogênio líquido, segundo metodologia de Bates et al. (1973). Após a pesagem de 0,3 g da amostra vegetal, 10 mL de ácido sulfosalicílico 3% foram adicionados ao material vegetal e a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 min a 15°C. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 1 mL de solução de ninidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. As amostras foram colocadas em banho maria a 100°C pelo período de uma hora. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em gelo por 10 min, receberam 1 mL de tolueno e foram agitadas vigorosamente por 15 seg e ficaram em repouso por 10 min, para que houvesse separação das fases. Como padrão foi utilizado 1 mL de ácido sulfosalicílico 3% no lugar da amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm.

3.7 Análise estatística dos resultados

Inicialmente os resultados foram submetidos à análise de variância, com emprego do teste F, no procedimento GLM, utilizando-se o software SAS versão 9.1 “SAS® - System for Windows®” (SAS Institute, 2003). Nos casos em que foi significativa a interação doses de S $\times$ doses de Zn, foi efetuada a análise de regressão polinomial (superfície de resposta), de acordo com o uso do procedimento RSREG. Quando a interação doses de S $\times$ doses de Zn não foi significativa foram desenvolvidas as análises de regressão (primeiro e segundo grau) em relação às doses de cada nutriente. Para a produção dos gráficos foi utilizado o programa SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2004). O nível de significância de 5% foi utilizado em todos os testes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeiro corte do capim tanzânia

4.1.1 Parâmetros produtivos e morfológicos

Para os parâmetros produtivos e morfológicos avaliados no capim tanzânia, na época do primeiro corte, não foi significativa a interação doses de S $\times$ doses de Zn. Pode-se verificar, na figura 2, que o número total de folhas (NTF) e de perfilhos (NTP), a produção de massa seca da parte aérea (PMS) e a área foliar (AF) das plantas variaram significativamente em função das doses de S e se ajustaram a modelo de segundo grau. As respostas às doses de S foram semelhantes para esses parâmetros. Quanto ao valor SPAD observa-se que foi elevado com o aumento das doses de S, uma vez que os resultados ajustaram-se a modelo linear.

Na figura 2 observa-se que os valores máximos de NTF e NTP do capim tanzânia foram obtidos com as doses de S de 2,65 mmol L⁻¹ e 2,47 mmol L⁻¹, respectivamente. Os maiores valores de PMS e AF, foram obtidos quando as doses de S foram 2,59 e 2,88 mmol L⁻¹, respectivamente. Essas doses de S são superiores a 1,9 mmol L⁻¹, que é a dose para esse macronutriente recomendada pela solução completa de Hoagland e Arnon (1950). Os menores valores para os parâmetros da figura 1 foram relacionados à menor dose de S. Isso possivelmente ocorreu pois a dose de S de 0,1 mmol L⁻¹ na solução nutritiva não foi suficiente para suprir a demanda das plantas durante os 14 dias de utilização da solução, antes que a mesma fosse trocada. O principal sintoma da deficiência de S é a redução do crescimento, devido às funções desempenhadas nas plantas, uma vez que o S faz parte de aminoácidos (como a cisteína e a metionina), vitaminas e enzimas (FAGAN et al., 2016).

Schmidt et al. (2013) demonstraram que a limitação no fornecimento de S diminui a taxa de crescimento do capim tanzânia. Os autores verificaram que a produção de massa seca desse capim atingiu o máximo com o fornecimento de S de 1,26 mmol L⁻¹ da solução nutritiva. Como demonstrado no presente trabalho, os maiores valores para a produção de massa seca desse capim foram observados com doses de S mais elevadas do que aquela relatada por Schmidt et al. (2013).

O aumento dos valores dos parâmetros morfológicos e produtivos do capim tanzânia com a elevação das doses de S, até uma determinada dose, é consequência das funções estruturais e metabólicas que o S desempenha na vida da planta. Assim, a carência de S

provoca uma série de distúrbios metabólicos na planta, com alterações na fotossíntese, na atividade respiratória e na síntese de proteínas (MALAVOLTA, 1980), que, por sua vez, afetam os parâmetros produtivos e morfológicos das plantas.

Figura 2. Número total de folhas (NTF) (A), número total de perfilhos (NTP) (B), produção de massa seca (PMS) (C), área foliar das plantas (AF) (D) e valor SPAD (E) do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de S na solução nutritiva.

Rabêlo et al. (2017) estudaram o efeito da interação $S \times Cd$ e o efeito destes elementos isoladamente nos parâmetros morfológicos e de produção do capim tanzânia, mas ao contrário do presente trabalho, não foi verificada significativa interferência do S nos parâmetros. Os autores relataram que a PMS e o NTF foram modificados significativamente apenas pelas doses de Cd, enquanto, para o NTP não foi significativa nem a interação entre os elementos estudados e nem o efeito isolado dos mesmos. Nas avaliações do capim tanzânia, no primeiro corte, o número total de folhas (NTF), a produção de massa seca da parte aérea (PMS) e o valor SPAD também foram alterados significativamente pelas doses de Zn. Os valores obtidos para esses parâmetros diminuíram linearmente com o aumento das doses de Zn na solução nutritiva, conforme pode ser visto na figura 3.

Figura 3. Número total de folhas (NTF) (A), produção de massa seca da parte aérea (PMS) (B) e valor SPAD (C) do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva.

4.1.2 Diagnóse visual de sintomas de deficiência e toxidez

Durante o experimento, as plantas submetidas à dose de S de 0,1 mmol L⁻¹ apresentaram sintomas comuns de deficiência de S, como clorose inicialmente nas folhas mais novas e posteriormente nas folhas mais velhas, coloração adicional como manchas rochas, folhas pequenas e a ocorrência de enrolamento das margens das folhas (MALAVOLTA 1980). Dois dias antes da realização do primeiro corte das plantas foram tiradas as fotos apresentadas na figura 4. Nesta é possível visualizar o efeito das doses mínima e máxima de S no capim tanzânia quando submetidas às baixas e altas doses de Zn, principalmente quanto a

coloração das plantas e tamanho das folhas que são inferiores sob baixa dose de S. A alteração na coloração das plantas ficou visível principalmente após a segunda semana, utilizando-se a mesma solução nutritiva com a dose menor de dose de S.

Os principais sintomas promovidos pelo excesso de Zn podem estar relacionados com a carência de Fe. Os sintomas mais comuns de deficiência de Fe são a clorose das folhas novas seguida de branqueamento; o padrão coincidente com a distribuição do Fe no tecido, podendo haver também a diminuição no crescimento e redução no teor de clorofila (MALAVOLTA 1980). É possível visualizar que as plantas obtiveram tamanho reduzido sob a dose de Zn de 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em comparação com as plantas sob doses menores de Zn (Figura 4).

Figura 4. Vasos com seis plantas de capim tanzânia submetidas às combinações de doses de S (mmol L^{-1}) e Zn ($\mu\text{mol L}^{-1}$) iguais a 0,1/0,7; 0,1/500 e 0,1/3000 (A). Vasos com seis plantas, cada um, de capim tanzânia sob combinações de doses de S (mmol L^{-1}) e Zn ($\mu\text{mol L}^{-1}$) iguais a 3,7/0,7 e 3,7/3000 (B). Fotos tiradas no dia 4 de fevereiro de 2015 com as plantas tendo 36 dias de desenvolvimento após o transplantio.

4.1.3 Concentração e acúmulo de nutrientes

4.1.3.1 Enxofre

Nas lâminas de folhas recém-expandidas coletadas no primeiro corte da gramínea, a concentração de S somente foi alterada significativamente pelas doses de S, tendo os

resultados se ajustado a modelo linear (Figura 5). Para o acúmulo de S na parte aérea das plantas, no primeiro corte, o efeito foi significativo para as doses de S e os resultados se ajustaram a modelo linear (Figura 6).

À medida que mais S foi colocado em disponibilidade para o sistema radicular do capim, maior quantidade de S foi absorvida, o que resultou em elevação na concentração desse nutriente no tecido foliar. Esse resultado é condizente com o obtido por Schmidt et al. (2013), no qual as concentrações de S total nas lâminas recém-expandidas do capim tanzânia, nos dois períodos de crescimento estudados aumentaram significativamente conforme as doses de S.

As lâminas diagnósticas das plantas sob dose de S de $1,90 \text{ mmol L}^{-1}$ concentraram 58% mais S total que as plantas sob dose de S de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Os resultados apresentados no atual trabalho apresentaram diferenças entre as concentrações menores do que o descrito por Schmidt et al. (2013), sendo que a concentração de S nas folhas recém-expandidas submetidas a dose de $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$ foi 29% maior que a concentração das lâminas diagnósticas com a dose de S de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A maior concentração de S nas lâminas recém-expandidas obtida no primeiro corte foi 38% maior que a concentração de S referente à menor dose de S.

Mesmo ocorrendo diferença significativa entre as concentrações de S das lâminas recém-expandidas conforme as doses de S, essa diferença não é tão contrastante em termos de valores, como no estudo de Schmidt et al. (2013). Segundo Alonso-Blázquez et al. (2015) as concentrações de S obtidas em plantas de milho (*Zea mays*) e trigo (*Triticum aestivum*) não foram altas apesar do aumento de sulfato no solo. Os autores argumentaram que as plantas estudadas receberam quantidades de S suficientes para satisfazer os requisitos para o desenvolvimento vegetal adequado. Considerando que a absorção, transporte e translocação de sulfato para as folhas são regulados pela demanda, alterações na concentração de clorofila e glutathione redutase podem não ocorrer. Assim, se as doses de S estudadas não forem suficientemente adequadas para sanar a necessidade das plantas existe maior possibilidade de detectar alterações em compostos que dependem do fornecimento de S.

No trabalho de Gilabel et al. (2014), no qual foram estudados S e Cu, assim como neste trabalho, não houve significância para a interação entre o possível agente amenizador do estresse oxidativo e o metal estudado para a concentração de S nas folhas diagnósticas, no primeiro corte. Contudo, diferentemente do que pode ser visto no presente trabalho, os autores diagnosticaram elevação das concentrações de S, tanto com o aumento de S quanto com o aumento de Cu, isoladamente. Neste trabalho, a elevação das doses de Zn não proporcionou

elevação significativa da concentração e do acúmulo de S nas partes avaliadas das plantas de capim tanzânia.

Figura 5. Concentração de S nas lâminas de folhas recém-expandidas (SLR) do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de S na solução nutritiva.

Figura 6. Acúmulo de S na parte aérea (SPA) do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de S na solução nutritiva.

4.1.3.2 Macronutrientes catiônicos (potássio, magnésio e cálcio)

As doses de S resultaram em variação significativa na concentração de K nas lâminas de folhas recém-expandidas das plantas, com ajuste dos resultados a modelo de segundo grau (Figura 7). O valor mínimo para a concentração de K foi encontrado quando a dose de S foi de 2,73 mmol L⁻¹.

Na figura 8 são apresentadas as concentrações de Ca e de Mg nas lâminas de folhas recém-expandidas, que variaram conforme as combinações das doses de S e de Zn. Nas condições em que o Zn foi fornecido em altas doses (1000 a 3000 µmol L⁻¹) e o S entre as doses de 1,0 a 3,7 mmol L⁻¹, a concentração de Mg nas folhas de lâminas recém-expandidas variou de 0 a 1 g kg⁻¹. Por outro lado, na menor dose de Zn, tanto para a dose mais elevada quanto para a menor dose de S, essa concentração de Mg variou de 4 a 5 g kg⁻¹. Para a concentração de Ca nas lâminas de folhas recém-expandidas houve semelhança ao verificado com o Mg nas doses de S entre 1,0 e 3,7 mmol L⁻¹, enquanto a concentração de Ca nessa parte da planta mostrou o maior valor com o emprego da menor dose de Zn.

Figura 7. Concentração de K nas lâminas de folhas recém-expandidas (KLR) do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de S na solução nutritiva.

$$\text{CaLR: } y = 2,865107 + 2,096755 * S - 0,362779 * S^2 - 0,000859 * \text{Zn} + 0,000000156 * \text{Zn}^2 - 0,000321 * S * \text{Zn}; R^2 = 0,78$$

$$\text{MgLR: } y = 3,657776 - 0,630244 * S + 0,207508 * S^2 - 0,000851 * \text{Zn} + 0,000000219 * \text{Zn}^2 - 0,000149 * S * \text{Zn}; R^2 = 0,65$$

Figura 8. Concentrações de Ca (A) e de Mg (B) nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das combinações das doses de S com as doses de Zn.

Autores relataram sinergismo do fornecimento de Zn com a absorção de Mg em gramíneas (ALONSO-BLÁZQUEZ et al. 2015; HE et al. 2004). Por vez, Alonso-Blázquez et al. (2015) ressaltou que o aumento da absorção do Mg em função dos teores de Zn foi significativo, contudo as diferenças entre as concentrações de Mg em plantas com os maiores valores de Zn e os controles eram baixos, sendo os valores inferiores a 2 mg kg^{-1} . Neste trabalho, ao contrário do que os autores citados descreveram, valores semelhantes para a concentração de Mg foram encontrados nas demais lâminas de plantas sob doses de Zn superiores a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ e S de $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$, ou seja, doses elevadas de Zn e também de S resultaram em valores inferiores de Mg, comparando com doses menores de ambos nutrientes, nas folhas diagnósticas. Os acúmulos dos macronutrientes catiônicos na parte aérea das plantas, no primeiro corte do capim, não se ajustaram a modelos de superfície de resposta e não foram significativamente modificados pelas doses de S ou de Zn isoladamente.

4.1.3.3 Micronutrientes catiônicos (zinco, manganês, ferro e cobre)

As concentrações dos micronutrientes catiônicos nas lâminas de folhas recém-expandidas variaram significativamente com as doses de S fornecidas na solução nutritiva (Figura 9). Em geral, essas concentrações foram diminuídas com o incremento das doses de S. Em relação às concentrações de Zn e de Fe essas diminuições ocorreram até as doses de S de 2,42 e 2,77 mmol L^{-1} , respectivamente, e tiveram ajustes a modelo de segundo grau (Figuras 9A e 9C). A concentração de Zn nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim foi elevada conforme a dose de Zn aumentou, apresentando o ajuste a modelo de segundo grau (Figura 9E). A concentração de Fe nessas lâminas foliares decresceu de acordo com o incremento das doses de Zn (Figura 9F).

A concentração de Zn foi reduzida em cerca de 39% na dose de S (mmol L^{-1}) aplicada foi de 2,42 ($285,45 \text{ mg kg}^{-1}$) em relação a concentração de Zn obtida quando a dose de S foi de 0,1 mmol L^{-1} ($466,96 \text{ mg kg}^{-1}$). Mesmo a menor concentração de Zn encontrada no capim tanzânia foi aproximadamente quatorze vezes maior que a concentração ($20,7 \text{ mg kg}^{-1}$) conhecida como a adequada, para que essa planta não sofra com deficiência desse micronutriente. Assim como o Zn, o Fe também teve sua concentração reduzida com a elevação da dose de S, com ajuste a modelo quadrático. Comparando-se a concentração de Fe nas plantas sob S de 0,1 mmol L^{-1} com a da dose de S de 2,77 mmol L^{-1} , a primeira foi aproximadamente 27% maior que a segunda. Com isso a concentração de Fe, com a dose mínima de S, que já era inferior à concentração mais comumente encontrada (124 mg kg^{-1})

desse nutriente para o capim tanzânia, tornou-se quatro vezes menor com a dose de S de 2,77 mmol L⁻¹.

Para as concentrações de Mn e de Cu (Figuras 9B e 9D) os resultados ajustaram-se a modelo de segundo grau. As concentrações mínimas de Mn e Cu nas lâminas de folhas recém- expandidas foram encontradas quando os valores das doses de S foram 2,67 e 2,59 mmol L⁻¹, respectivamente. Doses de S mais altas que essas resultaram em concentrações de Mn e Cu mais elevadas. As concentrações mínimas de Mn e Cu foram 65% e 69%, respectivamente, menores que as concentrações relativas desses nutrientes encontradas com a aplicação de S de 0,1 mmol L⁻¹.

Segundo os resultados de Zhang et al. (2017), os conteúdos de Zn, Cu e Fe diminuíram somente nas folhas sob o excesso de Zn, o que não ocorreu nas plantas sob deficiência de Zn. O valor máximo para a concentração de Zn (743,59 mg kg⁻¹), a partir da equação mostrada na figura 7E, foi 92% maior do que a concentração (57,06 mg kg⁻¹) referente à menor dose de Zn (0,7 µmol L⁻¹). Contudo, a menor dose estudada para o Zn já havia resultado em concentração superior à suficiente para atender a demanda desse micronutriente para essa gramínea. A concentração de Zn nas DL (Figura 9E) aumentou linearmente com a elevação das doses de Zn e ao contrário do conteúdo de Zn nas DL, que teve decréscimo após atingir seu ponto máximo, a concentração do metal não apresentou redução para as doses de Zn no capim tanzânia.

A grande diferença entre as concentrações de Zn nas LR com a máxima e mínima dose do metal estudado deve-se ao grande contraste entre o valor que a planta exige para não apresentar deficiência de Zn e o alto valor necessário para provocar estresse oxidativo no capim tanzânia, o que demonstra sua resistência ao agente tóxico em questão. O Zn juntamente com o Cu são constituintes da enzima SOD, importante enzima para amenizar a ação de radicais livres nas plantas (MALAVOLTA 1980). A concentração de Fe nas LR foram reduzidas, segundo modelo linear, com o aumento das doses de Zn (Figura 9F).

Figura 9. Concentrações de Zn (A), Mn (B), Fe (C) e Cu (D) nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) em função das doses de S e concentrações de Zn (E) e Fe (F) nas LR e nas demais lâminas foliares (DL) (E) em função das doses de Zn, na ocasião do primeiro corte. (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos, referem-se aos valores nas DL).

Os acúmulos de Mn e de Cu na parte aérea do capim tanzânia variaram significativamente com as doses de S na solução nutritiva, no primeiro corte das plantas (Figura 10). Os maiores acúmulos desses dois micronutrientes foram obtidos com o fornecimento das menores doses de S. O acúmulo mínimo de Cu na parte aérea das plantas estudadas foi encontrado com a aplicação de S de 2,31 mmol L⁻¹ (10B), dose esta superior à dose de Cu indicada na solução de Hoagland e Arnon (1950).

Figura 10. Acúmulos de Mn (A) e de Cu (B) na parte aérea do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das doses de S.

Para o acúmulo de Zn na parte aérea da gramínea, a interação doses de S $\times$ doses de Zn foi significativa e os resultados ajustaram-se a modelo de superfície de resposta (Figura 11). Pode-se observar na figura 11 que o acúmulo de Zn foi incrementado conforme o aumento das doses de Zn na solução nutritiva, particularmente quando as doses de S estiveram entre 0,1 e 1,9 mmol L⁻¹ houve maior variação dos valores de acúmulo. Entre as doses de S de 1,9 e 3,7 mmol L⁻¹, esse acúmulo de Zn variou numa faixa menor de concentração nas plantas conforme S na solução, aumentando até valores entre 20 e 30 mg/vaso.

Figura 11. Acúmulo de Zn na parte aérea do capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das combinações de doses de S com as doses de Zn.

4.1.4 Indicadores de estresse oxidativo

Tanto para a concentração de peróxido de hidrogênio quanto para o malondialdeído (MDA), foi possível verificar efeitos significativos das doses de S e de Zn, isoladamente, nas demais lâminas foliares coletadas no primeiro corte do capim tanzânia. Em função da aplicação das doses de S, a concentração de peróxido de hidrogênio, nas demais lâminas foliares, variou conforme modelo de segundo grau (Figura 12A). A concentração do malondialdeído foi alterada linearmente com esse macronutriente, contudo não foram verificadas alterações das concentrações de peróxido de hidrogênio e MDA nos colmos + bainhas e nem nas lâminas recém-expandidas do capim tanzânia (Figura 12B).

Na figura 12A, o ponto mínimo referente a concentração de peróxido de hidrogênio, nas demais lâminas foliares foi relacionado a dose de S de $2,39 \text{ mmol L}^{-1}$, dose referente ao acúmulo de peróxido de hidrogênio de $0,31 \text{ mmol/gMF}$. Os resultados das concentrações de peróxido de hidrogênio nas demais lâminas foliares do capim tanzânia foram alterados

conforme modelo de segundo grau com a aplicação das doses de Zn na solução nutritiva, enquanto a concentração de peróxido de hidrogênio das lâminas foliares recém-expandidas foi elevada linearmente, conforme as doses de Zn aumentaram (Figura 12C). Nas demais lâminas foliares, essa variável teve concentração mínima de 0,29 mmol/gMF com a dose de Zn de 1594,47 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figuras 12C).

A peroxidação lipídica pode ser considerada como o sintoma de maior destaque quando trata-se de estresse oxidativo, uma vez que as ROS, produzidas a partir do estresse vegetal por metal, afetam severamente os lipídeos das membranas plasmáticas das células, já que estas são particularmente sensíveis às ROS (GILL e TUTEJA, 2010). Para determinar o processo de peroxidação lipídica foi mensurada a concentração de MDA, que é um dos principais produtos finais da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que compõem a estrutura nas membranas celulares.

As concentrações de malondialdeído (MDA), tanto nas lâminas recém-expandidas quanto nas demais lâminas foliares foram alteradas em função das doses de Zn e ajustaram-se a modelo de segundo grau. A concentração de MDA nas lâminas recém-expandidas apresentou ponto mínimo com a dose de Zn de 666 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva. Para esta dose, a concentração mínima de MDA nas lâminas estudadas foi de 0,553 nmol/gMF. Contudo, nas demais lâminas foliares, encontra-se a concentração máxima de MDA de 0,861 nmol/gMF, com a aplicação de Zn de 2222 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva.

Pode-se observar o sincronismo entre o ajuste dos resultados das concentrações de peróxido de hidrogênio e de MDA nas demais lâminas foliares, em relação às doses de Zn. A parábola, que apresenta o ajuste dos resultados de peróxido de hidrogênio, é positiva e é iniciada e finalizada com valores próximos a 0,4 nmol/gMF. Enquanto a parábola que demonstra o ajuste dos resultados de MDA é negativa e inicia-se com valores próximos a 0,4 nmol/gMF de MDA. Essa representação gráfica dos resultados de concentração de ambos parâmetros demonstra perfeitamente a formação de MDA, como produto da peroxidação lipídica.

Figura 12. Concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA), nas demais lâminas foliares do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das doses de S (A e B) e nas lâminas de folhas recém-expandidas e nas demais lâminas foliares, em função das doses de Zn (C e D). (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos, referem-se aos valores dos valores nas DL).

Anteriormente, já foi descrito aumento da peroxidação lipídica em folhas de plantas que foram expostas ao excesso de Zn (CUI e ZHAO, 2011). É importante ressaltar que são possíveis decréscimos na peroxidação lipídica em plantas sob doses de Zn, uma vez que este

micronutriente possui importante função na manutenção da integridade das membranas celulares (CAKMAK, 2000).

4.1.4 Enzimas relacionadas ao sistema antioxidante

4.1.4.1 Atividades das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e glutathiona redutase

No primeiro corte, não foram encontradas variações significativas nas atividades das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim tanzânia. A atividade da CAT (Figura 13A) e da APX (Figura 13B) nas demais lâminas coletadas no primeiro corte das plantas foi alterada significativamente pelas doses de Zn, tendo os resultados se ajustado a modelo linear. A atividade da CAT nos colmos + bainhas mostrou variação significativa com as doses de Zn (Figura 13C) e de S (Figura 13E), com ajuste linear em ambos os casos. A atividade da APX nos colmos + bainhas variou com as doses de Zn (Figura 13D) e de S (Figura 13F) e os resultados ajustaram-se a modelo de segundo grau.

Os maiores valores para a atividade da CAT e APX nas demais lâminas foliares e para a atividade da CAT nos colmos+bainhas foram obtidos com as menores doses de Zn, nos quais as doses fornecidas podem não ter sido suficientes para as demandas da planta. Isso resultou, possivelmente, em estresse oxidativo no capim tanzânia, com subsequente atuação das enzimas nos colmos +bainhas e demais lâminas. O mesmo não ocorreu nas lâminas recém- expandidas, pela priorização do fornecimento de nutrientes para as partes mais jovens das plantas. Em relação à menor dose de S, os resultados demonstraram aumento das atividade das enzimas CAT e APX nos colmos+bainhas, comparando-se as demais doses aplicadas de S na solução nutritiva. Assim como ocorreu com o Zn, a menor dose de S, não teria atendido as necessidades das plantas em relação a esse macronutriente e a deficiência de S possivelmente resultou em estresse oxidativo nos colmos+ bainhas do capim tanzânia.

A enzima APX possui mais afinidade ao Zn do que a enzima CAT, em condições nos quais essas enzimas são submetidas a altos níveis desse metal (ALONSO-BLÁZQUEZ et al., 2015), como nas elevadas doses do presente estudo. Em consequência dessa maior afinidade que esse micronutriente possui pela enzima APX, a enzima respondeu com elevação, em relação a dose de Zn, após atingir a sua menor atividade na dose de Zn de 2772 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 13D).

Figura 13. Atividades das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) nas demais lâminas foliares (DL) e nos colmos + bainhas (C+B) do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das doses de Zn (A, B, C e D) e de S (E e F) na solução nutritiva. Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes aos C+B.

Conforme foi discutido anteriormente, a concentração de Fe no tecido vegetal foi reduzida com o aumento das doses de Zn (Figura 9F), o que provavelmente explica a redução na atividade das enzimas CAT e APX, tendo em vista que o Fe faz parte da estrutura dessas enzimas (TEWARI et al., 2005). Da mesma forma, foi observado que as enzimas CAT e APX nos colmos + bainhas tiveram atividades diminuídas com o incremento tanto das doses de S quanto das doses de Zn. A redução da atividade da APX com as doses de Zn pode estar relacionada com a importância do Zn para manter a integridade das membranas celulares. Outro fator importante que deve-se considerar é que a atividade da enzima APX está ligada às concentrações de peróxido de hidrogênio, que por sua vez podem ser alteradas conforme a exposição ao Zn e possui relação com a atuação da SOD em diversos compartimentos celulares (ALONSO-BLÁZQUEZ et al., 2015). Neste trabalho os resultados principalmente, com a elevação das doses de Zn apresentaram, semelhança com os obtidos por Alonso-Blázquez et al. (2015), em estudo com plantas de milho. Ambas plantas apresentaram menor sensibilidade em relação à atividade da APX, o que pode estar relacionado diretamente com a atividade da SOD.

A atividade da enzima glutathione redutase (GR) (Figura 14) foi significativamente alterada nas lâminas de folhas recém-expandidas, conforme ajuste quadrático, e nas demais lâminas foliares, ajustando-se a modelo linear, em função das doses de S (Figura 14A e 14B) e também em função das doses de Zn nas demais lâminas foliares (Figura 14C). Em relação às doses de S, a atividade da enzima GR, nas lâminas recém-expandidas e demais lâminas foliares, apresentou maior atividade com a menor dose de S. Nas lâminas recém-expandidas a atividade da enzima GR reduziu até atingir o menor valor para sua atividade com a aplicação de S de $2,47 \text{ mmol L}^{-1}$, depois elevou-se com o aumento das doses de S. Para que isto ocorresse, possivelmente a atividade da GR pode ter sido priorizada nas lâminas mais novas, nas condições de baixa e alta concentração de S, sendo que a GR foi a única enzima avaliada por meio de reação química que apresentou alteração nas lâminas recém-expandidas. Os resultados referentes à atividade da GR nas demais lâminas foliares, em função de doses de Zn, ajustaram-se ao modelo linear.

Para a atividade da enzima GR nos colmos + bainhas foi significativa a interação doses de S $\times$ doses de Zn. Os valores da atividade da enzima GR reduziram com o aumento das doses de S e das doses de Zn. A atividade foi menor a partir das doses de S de $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo a variação na atividade dessa enzima reduzida, principalmente, em função das doses de S. É relevante ressaltar que essa redução ocorreu em uma faixa maior de valores quando as doses do agente amenizador de estresse oxidativo foram menores do que 2 mmol L^{-1} .

¹, dose esta recomendada segundo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) (Figura 15). Em doses iguais ou superiores às recomendadas de S o estresse oxidativo foi reduzido.

Figura 14. Atividade da enzima glutathione redutase (GR) nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) (A), nas demais lâminas foliares (DL) (B) e nos colmos + bainhas (C+B) (C) do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das doses de S (A e B) e de Zn (C) na solução nutritiva. Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR (A) e referentes às DL (B e C).

Conforme Bashmakova et al. (2016), plantas de *Mimulus guttatus* tratadas com sulfato de Zn apresentaram redução da atividade da GR, com aumento nas concentrações de S e Zn, nas folhas. Contudo, em resposta à elevação do fornecimento do adubo, nas folhas das plantas a concentração de GSSG (forma oxidada da glutathiona) foi elevada. Isto demonstra que o intenso aumento da atividade da enzima GR nem sempre está diretamente relacionado com a elevação da forma reduzida da glutathiona, mas consequentemente, pode também haver o transporte ou translocação da forma oxidada da glutathiona de outras partes das plantas, para manter o equilíbrio das reações de oxirredução, das espécies químicas redutoras e oxidadas, em outras partes das plantas. Esses autores concluíram que as respostas dependentes das doses de sulfato de Zn para a atividade de GR demonstraram aumento nas folhas. Contudo, no presente trabalho, nas amostras do primeiro corte do experimento, a elevação da atividade de GR somente ocorreu nas lâminas foliares recém-expandidas com doses de S próximas à maior dose avaliada, e a maior atividade foi encontrada com o fornecimento da menor dose de S.

Figura 15. Concentração de glutathiona redutase (GR) nos colmos e bainhas (C+B) no capim tanzânia, na ocasião do primeiro corte, em função das combinações das doses de S com as doses de Zn na solução nutritiva.

Segundo DiBaccio et al. (2005), o teor total, ou seja, a soma das duas formas de glutathione diminuiu com o aumento da concentração de Zn. Contudo a expressão gênica da glutathione redutase aumentou nas folhas jovens estudadas, quando estas foram expostas ao excesso de Zn. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo para as lâminas recém-expandidas do capim tanzânia. Os autores também concluíram que a síntese, consumo e reações redox da glutathione desempenham papel central na resposta das plantas às altas concentrações de Zn.

Esses resultados não estão em consonância com a resposta usual das plantas ao excesso de metais, quando a toxidez promove aumento na atividade das enzimas envolvidas no ciclo ascorbato-glutathione (como APX e GR) na tentativa de conter o estresse por meio da síntese das proteínas complexantes de metais (CAPALDI et al., 2015; GRATÃO et al., 2012).

A interação doses de S $\times$ doses de Zn foi significativa para a atividade da enzima GPOX nas demais lâminas do capim (Figura 16). À semelhança do que ocorreu com a GR nos colmos + bainhas, a atividade da GPOX variou com os fornecimentos de doses de S e de Zn. A enzima GPOX assim como a CAT, APX e GR são detoxificadores relacionados com o aumento da concentração de H_2O_2 no tecido vegetal, sendo utilizados pelas plantas como meio de conter o estresse (GILL e TUTEJA, 2010). Apesar da redução na atividade do complexo enzimático, as plantas apresentaram redução na concentração de peróxido de hidrogênio com a aplicação de doses de S e aumento com as doses de Zn. Admite-se a possibilidade de que houve algum fator que tenha interferido e impedido as enzimas de detoxificarem o peróxido de hidrogênio.

Figura 16. Atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPOX) nas demais lâminas foliares (DL) do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

4.1.4.2 Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD mostrou alterações nas intensidades das bandas, sendo mais intensas, principalmente, quando os tecidos vegetais amostrados foram os colmos + bainhas (Figuras 17, 18 e 19). Nas figuras pode-se visualizar duas bandas para a maior parte das combinações de S e Zn, sendo umas mais nítidas que as outras. As bandas que foram expressas em maior intensidade foram 9, 1, 6 e 3 (2,8/250 C+B, 1,9/500 LR, 1,9/3000 C+B, 1,9/500 C+B), que podem ser vistos no gel de SOD na figura 17. As bandas menos visíveis são referentes aos canais 5, 4 e 8 (1,9/3000 DL, 1,9/3000 LR e 2,8/250 DL) do gel de SOD.

Figura 17. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmos + bainhas (C+B) do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 1,9/500 LR, 2 - 1,9/500 DL, 3 - 1,9/500 C+B, 4 - 1,9/3000 LR, 5 - 1,9/3000 DL, 6 - 1,9/3000 C+B, 7 - 2,8/250 LR, 8 - 2,8/250 DL, 9 - 2,8/250 C+B. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

No segundo gel (Figura 18) as bandas com mais intensidade 3, 6 e 9 (3,7/0,7 C+B, 3,7/500 C+B e 2,8/1000 C+B) e no canal 8 não foram visíveis bandas referentes a atividade da SOD. No gel da figura 18, as bandas em forte intensidade foram a 3, 5, 8, 1 e 6 (0,1/0,7 C+B, 0,1/500 DL, 0,1/3000 DL, 0,1/0,7 LR e 0,1/500 C+B) (Figura 19) e na coluna 7 (0,1/3000 LR) não foi expressa a atividade da SOD.

No último gel do primeiro corte, as combinações 0,1/500 LR, 0,1/3000 C+B apresentaram duas bandas com intensidade fraca. Em geral, a função da SOD é catalisar a dismutação de radicais superóxido, resultando em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, sendo o primeiro convertido em água e oxigênio por enzimas como a CAT e a APX. A enzima SOD está presente na maioria dos compartimentos celulares e constitui a primeira forma de defesa contra ROS (ALONSO-BLÁZQUEZ et al., 2015).

Figura 18. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 2,8/1000 LR, 2 - 2,8/1000 DL, 3 - 2,8/1000 C+B, 4 - 3,7/0,7 LR, 5 - 3,7/0,7 DL, 6 - 3,7/0,7 C+B, 7 - 3,7/500 LR, 8 - 3,7/500 DL, 9 - 3,7/500 C+B. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

Figura 19. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 0,1/0,7 LR, 2 - 0,1/0,7 DL, 3 - 0,1/0,7 C+B, 4 - 0,1/500 LR, 5 - 0,1/500 DL, 6 - 0,1/500 C+B, 7 - 0,1/3000 LR, 8 - 0,1/3000 DL, 9 - 0,1/3000 C+B. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

4.1.5 Prolina

A interação doses de S $\times$ doses de Zn foi significativa para a concentração de prolina nas lâminas de folhas recém-expandidas (Figura 20) e nas demais lâminas (Figura 21) do capim tanzânia. À medida em que foram incrementadas as doses testadas, a concentração de prolina aumentou sensivelmente nas duas partes amostradas no capim. Aumentos na concentração de prolina no tecido vegetal, em condições de estresse do capim tanzânia, foram relatados anteriormente (GILABEL et al., 2014; SCHMIDT et al., 2013).

Figura 20. Concentração de prolina nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

Figura 21. Concentração de prolina nas demais lâminas foliares do capim tanzânia, no primeiro corte, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

4.2 Segundo corte do capim tanzânia

4.2.1 Parâmetros produtivos e morfológicos

Os resultados relativos à produção e à morfologia das plantas do capim tanzânia, no segundo corte das plantas, são apresentados nas figuras 22 e 23. Os resultados para o número total de folhas (Figura 22A) e o de perfilhos (Figura 22B) ajustaram-se a modelo de segundo grau, sendo que para o número total de folhas o valor máximo foi alcançado na dose de S de 2,68 mmol L⁻¹, enquanto para o número total de perfilhos tal máximo foi verificado na dose de S de 2,26 mmol L⁻¹.

Tanto a produção de massa seca da parte aérea quanto das raízes sofreu variação significativa com as doses de S, tendo os resultados da parte aérea se ajustado a modelo de segundo grau e os das raízes a modelo de primeiro grau (Figura 22C). A máxima produção de massa seca da parte aérea foi obtida na dose de S de 2,67 mmol L⁻¹, sendo aproximadamente nove vezes maior do que a produção correspondente à dose de S de 0,1 mmol L⁻¹ (Figura 22C). Assim, para a obtenção da máxima produção nesse corte do capim, a dose de S necessária é mais alta do que a proposta na solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). De forma semelhante, a máxima produção de massa seca do sistema radicular do capim tanzânia

foi 1,5 vezes mais alta com a aplicação da dose de S de $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ do que quando a dose de S foi de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 22C).

A área foliar do capim variou significativamente com as doses de S, com os resultados ajustando-se a modelo de segundo grau (Figura 22D). Para atingir o máximo valor de área foliar do capim houve necessidade de aplicar a dose de S de $2,44 \text{ mmol L}^{-1}$, situação em que a área foliar foi 13 vezes mais alta do que com o emprego da dose de S de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Nas plantas do segundo crescimento do capim, na condição de disponibilidade baixa de S, ocorreram sintomas típicos da deficiência desse nutriente, com a produção de folhas menores, apresentando necrose, o que resultou em menor área foliar.

O valor SPAD avaliado nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim variou significativamente com as doses de S e os resultados tiveram ajuste a modelo de segundo grau (Figura 22E). O máximo valor SPAD foi de 37 unidades, esse resultado foi obtido com dose de S de $2,97 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo bem mais elevada do que as 23 unidades encontradas quando a dose de S foi de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Esse menor valor SPAD demonstra a deficiência de S, verificada quando o S foi aplicado em sua menor dose.

Os números totais de folhas (NTF) e de perfilhos (NTP), a produção de massa seca da parte aérea e de raízes (MS) e a área foliar (AF) do capim tanzânia, no segundo corte variaram significativamente com as doses de Zn. Em todos esses casos, os valores decresceram linearmente com o incremento das doses de Zn (Figura 23) e, portanto, indicam que as plantas foram estressadas pelo excesso de Zn aplicado, normalmente com menores valores, para essas variáveis estudadas, na condição de $3.000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. No momento do segundo corte do capim, verificou-se que as plantas submetidas à dose de Zn de $3000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, em relação à dose usual de Zn na solução completa de Hoagland e Arnon (1950), mostraram produção menor 36%, 47%, 54%, 74% e 68%, respectivamente, nos valores de NTF, NTP, AF, MS das raízes e área foliar.

É importante ressaltar que a redução nos parâmetros morfológicos, com aumento da disponibilidade do metal na solução nutritiva, não indica que o capim tanzânia não seja tolerante ao Zn. Existem plantas, relatadas na literatura, que não apresentam alteração na massa seca das plantas, mesmo quando expostas às altas doses de Zn (GOMES et al., 2013). Contudo mesmo plantas tolerantes ao excesso do metal e que crescem em locais contaminados, geralmente, apresentam redução no crescimento quando compara às plantas cultivadas em locais não contaminados (PULFORD e WATSON, 2003).

Figura 22. Número total de folhas (NTF) (A), número total de perfilhos (NTP) (B), produção de massa seca (MS) da parte aérea (PA) e das raízes (C), área foliar (AF) (D) e valor SPAD (E) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de S na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as cinco médias para cada parâmetro, sendo que os pontos preenchidos são referentes às LR e os triângulos referem-se aos valores nas raízes).

Figura 23. Número total de folhas (NTF) (A), número total de perfilhos (NTP) (B), produção de massa seca (MS) da parte aérea (PA) e das raízes (C) e área foliar (AF) (D), do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos referem-se aos valores nas raízes).

Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram reportados por Gomes et al. (2013), no qual os autores concluíram que as plantas apresentam tolerância ao Zn, ocorreram doses fitotóxicas entre as avaliadas, mas que não foram letais para as plantas. No presente trabalho foram observados valores menores para os parâmetros morfológicos, mas não ocorreu morte das plantas estudadas.

4.2.2 Diagnose visual de sintomas de deficiência e toxidez

Durante o segundo período de crescimento também foi possível visualizar sintomas de deficiência de S nas plantas, sendo possível visualizar o interferência da menor dose de S nas plantas o que foi demonstrado pelo menor tamanho das plantas e clorose foliar (Figura 24A). Enquanto as plantas sob toxidez de Zn apresentaram notável diferença na produção vegetal entre as plantas na dose de S de 0,1 mmol L⁻¹ e o capim sob 1,9 e 3,7 mmol L⁻¹, estas apresentaram maior produção de massa e folhas com tamanhos maiores (Figura 24B). As fotos que são apresentadas na figura 24 foram obtidas 16 dias após o primeiro corte.

Figura 24. Vasos com seis plantas de capim tanzânia submetidas às combinações de doses de S (mmol L⁻¹) e Zn (μmol L⁻¹) de 0,1/0,7; 0,1/500 e 0,1/3000 (A) e de 0,1/3000; 1,9/3000 e 3,7/3000 (B).

4.2.3 Concentração e acúmulo de nutrientes

4.2.3.1 Enxofre

A concentração de S nas lâminas das folhas recém-expandidas e nas raízes do capim tanzânia variou significativamente com as doses de S na solução nutritiva. Para as lâminas das foliares recém-expandidas esses resultados ajustaram-se a modelo linear, enquanto os valores referentes às raízes ajustaram-se a modelo de segundo grau (Figura 25). As concentrações de S nas lâminas foliares recém-expandidas das plantas aumentaram linearmente com a elevação da disponibilidade de S na solução nutritiva. O maior valor para a concentração de S nas lâminas recém-expandidas foi de $1,7 \text{ mg kg}^{-1}$, resultou do emprego da dose de S de $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$. No sistema radicular do capim tanzânia a concentração máxima de S ($1,74 \text{ g kg}^{-1}$) foi encontrada com a dose de S de $3,33 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 25). Pode-se observar que os valores das concentrações de S e das doses de S necessárias para se alcançar a máxima concentração de S foram semelhantes para parte aérea e sistema radicular das plantas. Também, os menores valores das concentrações de S, na parte aérea e raízes, estiveram próximos a $0,50 \text{ g kg}^{-1}$ e foram observados com a aplicação de S de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 25. Concentração de S nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) e nas raízes (RAÍZ) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de S na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos, referentes às raízes).

A concentração de S nas lâminas de folhas recém-expandidas variou linear e significativamente com as doses de Zn na solução nutritiva (Figura 26). O aumento dessa concentração em função das doses de Zn é interpretada como consequência da menor produção das plantas do capim, o que conduziu à concentração do nutriente no tecido foliar.

Figura 26. Concentração de S nas lâminas de folhas recém-expandidas (SLR) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva.

O acúmulo de S na parte aérea do capim tanzânia coletada no segundo corte foi significativamente alterado pelas doses de S (Figura 27A) e de Zn (Figura 27B). Em ambos os casos foi o modelo linear que mais se ajustou aos resultados, que tiveram valores de cerca de 2,5 vezes mais altos à medida em que se deslocou da dose mais baixa para a mais alta do elemento fornecido na solução nutritiva.

Em termos do acúmulo de S nas raízes do capim tanzânia observou-se que foi significativa a interação doses de S $\times$ doses de Zn. No caso de aplicação de dose de S até aproximadamente $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, o aumento nesse acúmulo dependeu basicamente da dose de S. No entanto, as respostas às doses mais altas de S do que $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi muito dependente

da dose de Zn e os mais altos acúmulos de S nas raízes ocorreram em altas doses de S acompanhadas de baixas doses de Zn (Figura 28).

Figura 27. Acúmulo de S na parte aérea (SPA) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de S (A) e de Zn (B) na solução nutritiva.

Figura 28. Acúmulo de S nas raízes (SR) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

4.2.3.2 Nitrogênio

No sistema radicular coletado ao final do segundo período de crescimento capim observou-se alteração significativa na concentração de N, em resposta às combinações de doses de S com doses de Zn. As mais elevadas concentrações de N ocorreram nas condições mais extremas de fornecimento de S, com pequena influência das doses de Zn. Em presença das doses intermediárias de S (particularmente entre 1,0 e 2,8 mmol L⁻¹) a concentração de N nas raízes do capim dependeu de ambas as doses testadas (Figura 29).

Para o acúmulo de N nas raízes do capim tanzânia, as doses de S resultaram em variação significativa, com ajuste dos resultados a modelo linear (Figura 30). Os valores para esse acúmulo praticamente foram duplicados, quando se compara a mais baixa com a mais alta dose de S.

Figura 29. Concentração de N nas raízes (R) do capim tanzânia, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva, na ocasião do segundo corte.

Figura 30. Acúmulo de nitrogênio nas raízes (NR) do capim tanzânia em função das doses de S na solução nutritiva, na ocasião do segundo corte.

4.2.3.3 Macronutrientes catiônicos (potássio, magnésio e cálcio)

As doses de S resultaram em variação significativa nas concentrações de K nas lâminas de folhas recém-expandidas e de Mg nas raízes do capim coletado à época do segundo corte das plantas. Para o K nesses tecidos foliares os resultados se ajustaram a modelo linear, enquanto para o Mg nas raízes o ajuste ocorreu para modelo de segundo grau (Figura 31). A concentração de Mg atingiu seu máximo valor (2,19 g kg⁻¹), com a dose de S (mmol L⁻¹) de 2,00.

Figura 31. Concentrações de K nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) (A) e de Mg nas raízes (B) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de S na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os triângulos referentes às raízes).

As concentrações de K e de Mg nas raízes da gramínea variaram significativamente com as doses de Zn, o mesmo ocorrendo para a concentração de Ca nas lâminas de folhas recém-expandidas coletadas no segundo corte do capim. Esses resultados para K e Ca se ajustaram a modelo linear (decrecendo a concentração do nutriente no tecido vegetal com o aumento das doses de Zn) e para o Mg houve ajuste a modelo de segundo grau (Figura 32). A concentração de Mg nas raízes alcançou o máximo valor ($2,6 \text{ g kg}^{-1}$) com a dose de Zn de $1500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 31B).

Figura 32. Concentrações de K (A) e de Mg (B) nas raízes (R) e de Ca (C) nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos, referentes às raízes).

Nas raízes do capim tanzânia, os acúmulos de K, Mg e Ca variaram significativamente com as doses de S. Para o K essa variação foi linear, enquanto para Mg e Ca os resultados se ajustaram a modelo do segundo grau (Figura 33). Os maiores valores para os acúmulos de Mg (16,84 g kg⁻¹) e Ca (21,04 g kg⁻¹) nas raízes do capim tanzânia foram obtidos com as doses de S de 2,19 e 2,41 mmol L⁻¹, respectivamente. Na figura 32, pode-se observar que o acúmulo de K nas raízes aumentou significativamente com a elevação das doses de S, enquanto o acúmulo de K nas raízes decresceu significativamente com a aplicação das doses de Zn na solução nutritiva (Figura 34). Esse valor na dose de Zn de 3000 µmol L⁻¹ foi 43% daquele acúmulo obtido com a aplicação da dose de Zn de 0,7 µmol L⁻¹, ou seja na dose recomendada na solução de Hoagland e Arnon (1950).

Figura 33. Acúmulos de K (A), Mg (B) e Ca (C) nas raízes do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de S na solução nutritiva. (*Os triângulos na figura representam as médias para cada parâmetro, referentes às raízes).

Figura 34. Acúmulo de K nas raízes (R) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva. (*Os triângulos na figura representam as médias para a parâmetro, referentes às raízes).

Os acúmulos de Mg e de Ca nas raízes do capim tiveram variação significativa com as doses de Zn na solução nutritiva. Esses resultados tiveram ajustes linear para o Ca e ajuste quadrático para o Mg (Figura 35). O acúmulo máximo de Mg nas raízes das plantas, em função das doses de Zn, foi de 14,8 mg/vaso de Mg e esse valor foi obtido na dose de Zn de 1033,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva (Figura 35A). O valor para o acúmulo foi reduzido em 78% com a aplicação de Zn de 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em relação ao valor obtido no ponto máximo da curva, descrito anteriormente.

Figura 35. Acúmulos de Mg (A) e de Ca (B) nas raízes (R) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva. (*Os triângulos na figura representam as médias para cada parâmetro, referentes às raízes).

4.2.2.4 Micronutrientes catiônicos (zinco, manganês, ferro e cobre)

As doses de S na solução nutritiva alteraram significativamente a concentração de Cunas lâminas de folhas recém-expandidas e nas raízes do capim tanzânia, com ajustes a modelos de segundo grau (Figura 36). O fornecimento de S na dose de 2,5 mmol L⁻¹ reduziu em 80% e 75% a concentração de Cu nas lâminas de folhas recém-expandidas e raízes, respectivamente, em relação à aplicação de S de 0,1 mmol L⁻¹.

Figura 36. Concentrações de Cu nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) e nas raízes do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de S na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as médias para a parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos, referentes às raízes).

As doses de Zn na solução nutritiva proporcionaram variações significativas nas concentrações de Zn (Figura 37A) e de Mn (Figura 37B) nas lâminas de folhas recém-expandidas e nas raízes do capim tanzânia. A concentração de Zn, em ambos os tecidos vegetais, aumentou com o incremento no fornecimento de Zn na solução nutritiva, resultando nos valores máximos na dose de Zn de 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A concentração de Zn nas lâminas recém-expandidas aumentou em 80 vezes, quando se compara o valor obtido, para o parâmetro, na menor dose de Zn (0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com a maior dose de Zn (3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Considerando que a concentração adequada de Zn no tecido das lâminas de folhas recém-expandidas do capim tanzânia é de aproximadamente 21 mg kg^{-1} (GALLO et al., 1974), nota-se excesso de 40 a 80 vezes de Zn no tecido foliar, à medida que se eleva a dose de Zn de 1000 para 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Essa alta concentração de Zn nas lâminas foliares comprova a ocorrência de excesso desse elemento na planta.

Figura 37. Concentração de Zn (A), Mn (B), Fe (C) e Cu (D) nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) e nas raízes do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva. (*Os pontos e triângulos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os triângulos, não preenchidos, referentes às raízes).

O aumento do fornecimento de Zn na solução nutritiva resultou em menor concentração de Mn nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim tanzânia. Entretanto, nas raízes, conforme se aumentou a dose de Zn na solução nutritiva houve incremento na concentração de Mn (Figura 37B), sem atingir concentração desse micronutriente que pudesse resultar em intoxicação no capim.

As doses de Zn alteraram significativamente as concentrações de Fe (Figura 37C), nas lâminas de folhas recém-expandidas e de Cu (Figura 37D) no tecido radicular do capim tanzânia. Para a concentração de Fe nas lâminas recém expandidas houve ajuste a modelo linear com decréscimo de 34%, quando se comparam os valores obtidos na dose de Zn de $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ com a dose de $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$. As mais baixas concentrações de Fe nas lâminas foliares certamente não indicam a ocorrência de deficiência de Fe no capim estudado. A concentração de Cu nas raízes do capim tanzânia foi incrementada linearmente com o aumento no fornecimento de Zn na solução nutritiva (Figura 37D). A concentração de Cu verificada nas raízes das plantas crescidas na dose de $3000 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi 54% mais elevada do que a obtida com a aplicação de Zn de $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Para o acúmulo de Zn na parte aérea do capim tanzânia foi significativa a influência das doses de Zn, que proporcionaram incremento linear com o aumento dessas doses (Figura 38A). O acúmulo desse elemento nas raízes seguiu modelo de segundo grau, com o maior acúmulo de Zn tendo ocorrido na dose de Zn de $1856 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 38B).

Para o acúmulo de Cu na parte aérea do capim houve interferência significativa das doses de S verificando-se sensível decréscimo nos valores quando altas doses de S foram fornecidas na solução nutritiva (Figura 39A). Para o acúmulo de Fe nas raízes da gramínea, observou-se incremento linear e significativo com o aumento das doses de S (Figura 39B), enquanto decréscimo linear foi obtido com a elevação das doses de Zn, (Figura 39C). A dose de S de $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ proporcionou incremento de 52% no acúmulo de Fe nas raízes em relação à menor dose de S aplicada ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$). Por outro lado, detecta-se decréscimo de 67% quando se compara o acúmulo de Fe nas raízes obtido com a menor dose em relação ao valor para o parâmetro obtido sob a maior dose de Zn.

Figura 38. Acúmulo de Zn na parte aérea (PA) (A) e nas raízes (R) (B) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva. (*Os pontos e triângulos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes à parte aérea e os triângulos, não preenchidos, referentes às raízes).

Figura 39. Acúmulo de Cu na parte aérea (PA) e de Fe nas raízes (R) em função das doses de S e de Fe nas raízes (R) em função das doses de Zn do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte. (*Os pontos e triângulos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os triângulos não preenchidos referentes às raízes).

Estudando plantas de chá (*Chamellia sinensis* cv. Ruixue), com um ano de idade, em caixas hidropônicas, durante quatro meses experimento, em condições para proporcionar deficiência de Zn (sem Zn), três doses moderadas (1,5; 7,5 e 15 mmol L⁻¹) e dose excessiva do metal para aquela cultura (150 mmol L⁻¹), Zhang et al. (2017) verificaram que a deficiência do micronutriente e seu excesso afetaram acentuadamente a quantidade absorvida de Cu e Fe (entre outros nutrientes) pelas plantas.

4.2.4 Indicadores de estresse oxidativo

A concentração de malondialdeído nas lâminas de folhas recém-expandidas e nas raízes coletadas no segundo corte do capim tanzânia apresentaram variação significativa tanto em relação às doses de Zn (Figura 40A) quanto em relação às doses de S (Figura 40B) empregadas na solução nutritiva. Nas lâminas foliares, a concentração de malondialdeído aumentou linearmente e praticamente foi duplicado quando se compara a menor com a maior dose de Zn. Nas raízes observou-se que a concentração de malondialdeído aumentou com o fornecimento da dose de Zn de 0,7 até 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 40A), mas foi reduzida com a elevação da dose de Zn de 1000 a 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Com relação às doses de S a concentração de malondialdeído indica que o estresse exibido pela planta na condição de deficiência desse nutriente (dose de 0,1 mmol L^{-1}) foi semelhante ao da maior dose de S (3,7 mmol L^{-1}). A concentração de malondialdeído nas raízes aumentou com fornecimento das doses de S até a dose 1,9 mmol L^{-1} e foi possível observar similaridade na concentração desse indicador de estresse quando se comparou a dose de S de 0,1 com a de 3,7 mmol L^{-1} .

Para as concentrações de peróxido de hidrogênio nas demais lâminas e de malondialdeído nos colmos + bainhas do capim, na segunda colheita, foi significativa a interação doses de S $\times$ doses de Zn. As maiores concentrações de peróxido de hidrogênio nas demais lâminas ocorreram nas condições de maior estresse do capim, verificado na deficiência de S (dose de 0,1 mmol L^{-1}) e na toxicidade de Zn (dose de 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Para uma mesma dose de Zn, houve redução na concentração de peróxido de hidrogênio nas demais lâminas foliares à medida que se aumentou a dose de S (mmol L^{-1}) na solução nutritiva (de 0,1 a 3,7), o que demonstra atuação favorável do S em aliviar a intoxicação pelo Zn (Figura 41A). Para a concentração de malondialdeído nos colmos + bainhas, foi nítido a influência da combinação das doses de S com as de Zn (Figura 41B), uma vez que na dose de S na região de 1,9 mmol L^{-1} amenizou o efeito tóxico do Zn, fazendo com que houvesse menor peroxidação lipídica expressa pela menor concentração de malondialdeído. Também, a condição de deficiência de S (0,1 mmol L^{-1}) fez com que as plantas apresentassem os maiores valores para o malondialdeído nos colmos + bainhas.

Figura 40. Concentração de malondialdeído (MDA) nas lâminas de folhas recém-expandidas (LR) e nas raízes (DL) do capim tanzânia, na ocasião do segundo corte, em função das doses do S (A) e do Zn (B) na solução nutritiva. (*Os pontos na figura representam as médias para cada parâmetro, sendo os círculos cheios referentes às LR e os círculos vazios, não preenchidos, referentes às raízes).

Figura 41. Concentrações de peróxido de hidrogênio nas demais lâminas foliares (H₂O₂ DL) (A) e de malondialdeído nos colmos + bainhas (MDA C+B) (B) do capim tanzânia, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

4.2.5 Enzimas relacionadas ao sistema antioxidante

4.2.5.1 Atividade das enzimas catalase, ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e glutathiona redutase

No material vegetal do segundo corte do capim tanzânia não foram observadas variações significativas nas atividades das enzimas catalase e ascorbato peroxidase, mas foram constatadas significâncias para a atividade da guaiacol peroxidase nos colmos + bainhas (tanto em função das doses de S quanto das doses de Zn e para a atividade da glutathiona redutase nos colmos + bainhas em função das doses de Zn (Figura 42).

Figura 42. Atividade da enzima guaiacol peroxidase nos colmos + bainhas (GPOX C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das doses de S (A) e de Zn (B) e atividade da enzima glutathiona redutase nos colmos + bainhas (GR C+B) (C) em função das doses de Zn na solução nutritiva.

O fornecimento das doses de S fez reduzir a atividade da guaiacol peroxidase nos colmos + bainhas, enquanto a toxicidade por Zn (em altas doses desse elemento) fez com que fosse aumentada a atividade dessa enzima, provavelmente buscando combater o estresse oxidativo proporcionado por esse excesso do metal. Para a atividade da glutathione redutase nos colmos + bainhas observou-se que, na condição de mais alta disponibilidade de Zn houve diminuição na atividade dessa enzima, com os menores valores ocorrendo nas doses de Zn de 1000 e 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.2.5.2 Atividade da enzima superóxido dismutase

As maiores atividades da enzima SOD, no material vegetal do segundo corte, foram demonstradas pela maior intensidade das bandas expressas nas lâminas de folhas recém-expandidas, colmos + bainhas e raízes (Figuras 43 e 44) na dose de S de 0,1 mmol L^{-1} combinada com as doses de Zn de 3000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esses resultados mostram que a SOD foi expressa em condição de toxidez por Zn, sob a menor dose de S (0,1 mmol L^{-1}), uma possível explicação foi a utilização da SOD, no sistema antioxidativo das plantas, como alternativa para amenizar a toxidez por Zn e devido a este micronutriente fazer parte da estrutura da enzima SOD.

Observou-se, em geral, no segundo corte das plantas que nas raízes houve menor atividade dessa enzima, a qual foi indicada pela baixa intensidade das bandas. Na dose de S de 1,0 mmol L^{-1} foi constatada a menor intensidade das bandas em todas as partes da planta (Figuras 44 e 45). Em relação à dose de S de 1,9 mmol L^{-1} observou-se que a combinação com a dose de Zn de 0,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$, nos colmos + bainhas foi verificada a maior intensidade nas bandas formadas (Figura 45). O mesmo pode ser observado em relação à nitidez das bandas relacionadas à combinação de 3,7/0,7 para os colmos + bainhas. Destaca-se que maior intensidade das bandas pode ser observada para as lâminas de folhas recém-expandidas, demais lâminas foliares e colmos + bainhas quando se empregou a combinação da dose de S de 2,8 mmol L^{-1} com a dose de Zn de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 46). Também foi obtida banda de SOD com menor intensidade na dose de S de 3,7 mmol L^{-1} (Figura 47), nas lâminas recém-expandidas, demais lâminas foliares e raízes das plantas, ou seja, o suprimento de S em alta dose amenizou o efeito tóxico provocado pelo excesso de Zn no capim tanzânia, uma vez que a enzima com maior atuação em relação ao estresse do metal estudado teve sua atividade expressa sob alta dose de S.

Figura 43. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 0,1/0,7 LR, 2 - 0,1/0,7 DL, 3 - 0,1/0,7 C+B, 4 - 0,1/0,7 R, 5 - 0,1/500 LR, 6 - 0,1/500 DL, 7 - 0,1/500 C+B, 8 - 0,1/500 R, 9 - 0,1/3000 LR. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

Figura 44. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 0,1/3000 DL, 2 - 0,1/3000 C+B, 3 - 0,1/3000 R, 4 - 1,0/250 LR, 5 - 1,0/250 DL, 6 - 1,0/250 C+B, 7 - 1,0/250 R, 8 - 1,0/1000 LR, 9 - 1,0/1000 DL. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

Figura 45. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 1,0/1000 C+B, 2 - 1,0/1000 R, 3 - 1,9/0,7 LR, 4 - 1,9/0,7 DL, 5 - 1,9/0,7 C+B, 6 - 1,9/0,7 R, 7 - 1,9/500 LR, 8 - 1,9/500 DL, 9 - 1,9/500 C+B. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

Figura 46. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 1,9/500 R, 2 - 1,9/3000 LR, 3 - 1,9/3000 DL, 4 - 1,9/3000 C+B, 5 - 1,9/3000 R, 6 - 2,8/500 LR, 7 - 2,8/500 DL, 8 - 2,8/500 C+B, 9 - 2,8/500 R. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

Figura 47. Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante nas lâminas recém-expandidas (LR), demais lâminas (DL) e colmo + bainha (C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações das doses de S e Zn. P: padrão de SOD bovino. Cada número corresponde a uma combinação de dose de S com dose de Zn como detalhada a seguir e com indicação de cada parte da planta: 1 - 2,8/1000 LR, 2 - 2,8/1000 DL, 3 - 2,8/1000 C+B, 4 - 2,8/1000 R, 5 - 3,7/0,7 LR, 6 - 3,7/0,7 DL, 7 - 3,7/0,7 C+B, 8 - 3,7/0,7 R, 9 - 3,7/500 LR. As setas indicam as bandas identificadas em PAGE.

4.2.5 Prolina

A interação doses de S $\times$ doses de Zn foi significativa para a concentração de prolina nas lâminas de folhas recém-expandidas coletadas no segundo corte do capim tanzânia (Figura 48). As mais altas concentrações de prolina foram obtidas nas condições mais estressantes do capim, ou seja no fornecimento de baixas doses de S combinadas com altas doses de Zn na solução nutritiva. O fornecimento das altas doses de S contribuiu para reduzir o efeito tóxico da elevada disponibilidade de Zn (redução de 50% na concentração de prolina, quando se compara a combinação da dose de S de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e dose de Zn de $3000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com a dose de S de $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ naquela máxima dose de Zn).

A concentração de prolina nas demais lâminas foliares do capim foi significativa e linearmente incrementada em função da aplicação de doses de Zn na solução nutritiva (Figura 49). A concentração desse aminoácido foi praticamente três vezes mais elevada nas demais lâminas foliares coletadas em plantas submetidas à dose de Zn de $3000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, quando comparada às das plantas recebendo dose de Zn usual da solução de Hoagland e Arnon (1950).

Figura 48. Concentração de prolina nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

Figura 49. Concentração de prolina nas demais lâminas foliares (Prolina DL) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das doses de Zn na solução nutritiva.

A interação doses de S $\times$ doses de Zn foi significativa para a concentração de prolina nos colmos + bainhas coletados no segundo corte do capim tanzânia (Figura 50). O fornecimento das doses de S assegurou redução na concentração desse aminoácido e, consequentemente do efeito tóxico provocado pelo excesso de Zn na solução nutritiva.

$$y = 2,073470 - 0,901953 \cdot S + 0,206897 \cdot S^2 + 0,000416 \cdot Zn + 0,000000316 \cdot Zn^2 - 0,000316 \cdot S \cdot Zn, R^2 = 0,62$$

Figura 50. Concentração de prolina nos colmos + bainhas (Prolina C+B) do capim tanzânia, no segundo corte, em função das combinações de doses de S com doses de Zn na solução nutritiva.

5 CONCLUSÕES

O excesso de Zn proporciona menor número de folhas, perfilhos, produção de massa seca e área foliar, e também promove estresse oxidativo no capim tanzânia. A toxicidade resultante da alta disponibilidade de Zn na solução nutritiva provoca elevação das concentrações dos indicadores de estresse oxidativo (malondialdeído e peróxido de hidrogênio) e de prolina na planta. O alívio da toxicidade resultante do excesso de Zn foi promovido pelo S e especialmente detectado na concentração do aminoácido prolina. A concentração de prolina demonstra ser importante indicadora de estresse oxidativo para toxicidade de Zn e alívio desta condição. O fornecimento de S para capim tanzânia proporciona maior persistência das plantas, por meio da elevação do número de folhas e perfilhos, maior acúmulo de biomassa e aumento da absorção de Zn. O capim tanzânia apresenta tolerância ao excesso de Zn e o adequado suprimento de S eleva o acúmulo de Zn nessas plantas e sua tolerância ao estresse oxidativo causado por esse metal.

REFERÊNCIAS

- Accioly AMA, Soares CRFS, Siqueira JO. 2009. Silicato de cálcio como amenizante da toxidez de metais pesados em mudas de eucalipto. *Pesquisa agropecuária brasileira* 44(2):180-188.
- Alonso-Blázquez N, García-Gómez C, Fernandez, MD. 2015. Influence of Zn-contaminated soils in the antioxidative defence system of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) at different exposure times: potential use as biomarkers. *Ecotoxicology* 24(2):279-291.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia plantarum* 104(2):280-292.
- Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, conservation and recycling* 11(1-4):41-49.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil* 39(1):205-207.
- Bashmakova EB, Pashkovskiy PP, Radyukina NL, Kuznetsov VIV. 2016. Interactive effects of zinc and nickel on the glutathione system state in *Mimulus guttatus* plants. *Russian journal of plant physiology* 63(5):626-635.
- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MGA, Mazzafera P, Azevedo RA. 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant physiology biochemistry* 74(1):165-175.
- Boddey RM, Macedo R, Tarré RM, Ferreira E, de Oliveira OC, Rezende CP, Catarutti RB, Pereira JM, Alves BJR, Urquiaga S. 2003. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: The key to understanding the process of pasture decline. *Agriculture, ecosystems and environment* 103(2):389-403.
- Bogdan AV. 1977. Tropical pasture and fodder plants. London: Longman. 475 p.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007. Zinc in plants. *New phytologist* 173(4):677-702.

- Cakmak I. 2000. Tansley review no. 111 Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New phytologist* 146(2):185–205.
- Cakmak I, Horst WJ. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia plantarum* 83(3):463-468.
- Capaldi FR, Gratao PL, Reis AR, Lima LW, Azevedo RA. 2015. Sulfur metabolism and stress defense responses in plants. *Tropical plant biology* 8(3-4):60-73.
- Carneiro MAC, Siqueira JO, Moreira FMS. 2002. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. *Pesquisa agropecuária brasileira* 37(11):1629-1638.
- Cui Y, Zhao N. 2011. Oxidative stress and change in plant metabolism of maize (*Zea mays* L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc. *Plant soil environment* 57(1):34–39.
- Dechen AR, Nachtigall GR. 2006. Micronutrientes. In: Fernandes MS, editor. *Nutrição mineral de plantas*. Viçosa: Sociedade brasileira de ciência do solo. p 327-254.
- DiBaccio D, Kopriva S, Sebastiani L, Rennenberg H. 2005. Does glutathione metabolism have a role in the defense of poplar against zinc excess? *New phytologist* 167(1): 73-80.
- Dixit G, Singh AP, Kumar A, Singh PK, Kumar S, Dwivedi S, Trivedi PK, Pandey V, Norton GJ, Dhankher OP. 2015. Sulfur mediated reduction of arsenic toxicity involves efficient thiol metabolism and the antioxidant defense system in rice. *Journal of hazardous materials* 298(1):241-251.
- Epstein E, Bloom AJ. 2006. *Nutrição mineral de plantas*. Londrina: Planta. 402 p.
- Fagan, E.B., Ono EO, Rodrigues JD, Soares LH, Neto DD. 2016. *Fisiologia Vegetal: metabolismo e nutrição mineral*. São Paulo: Editora andrei. 306 p.
- FAO. 2017. Levantamento das áreas de produção agrícola mundial. <http://www.fao.org/faostat>: Food and agriculture organization.
- Foyer CH, Noctor G. 2000. Tansley review no. 112 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New phytologist* 146(3): 359-388.
- Foyer CH, Noctor G, Lelandais M, Lescure JC, Valadier MH, Boutin JP, Horton P. 1994d. Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on photosynthesis, carbon partitioning and protein phosphorylation in maize. *Planta* 192(2):211-220.
- Gay C, Collins J, Gebicki JM. 1999. Hydroperoxide assay with the ferric–xylenol orange complex. *Analytical biochemistry* 273(2):149-155.

- Gallo, JR, Hiroce, R, Bataglia, OC, Furlani, PR, Furlani, AMC, Mattos, HB, Fonseca, MP. 1974. Composição química inorgânica de forrageiras do estado de São Paulo. Boletim de indústria animal 31(1):115-137.
- Gilabel AP, Nogueirol RC, Garbo AI, Monteiro FA. 2014. The role of sulfur in increasing guinea grass tolerance of copper phytotoxicity. Water, air and soil pollution 225(1):1806-1816.
- Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry 48(12):909–930.
- Gill SS, Tuteja N. 2011. Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur. Plant signaling & behavior 6(2):215-222.
- Gratão PL, Monteiro CC, Antunes AM, Peres LEP, Azevedo RA. 2008. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. Annals of applied biology 153(3):321-333.
- Gratão PL, Monteiro CC, Carvalho RF, Tezotto T, Piotto FA, Peres LEP, Azevedo RA. 2012. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. Plant physiology and biochemistry 56:79-96.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional plant biology 32(6):481-494.
- Gomes MP, Duarte DM, Carneiro MMLC, Barreto LC, Carvalho M, Soares AM, Guilherme LRG, Garcia QS. 2013. Zinc tolerance modulation in *Myracrodruon urundeuva* plants. Plant physiology and biochemistry 67(1):1-6.
- Hawkesford MJ. 2012. Sulfate uptake and assimilation—whole plant regulation. In: De Kok LJ, Rennenberg H, Hawkesford MJ, editors. Sulfur metabolism in plants. London: Springer. p 11-24.
- He PP, Lv XZ, Wang GY. 2004. Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. Environment international 30(2):167–172.
- Hernandes A, Prado RM, Pereira FS, Moda LR, Dos Santos Ichinose JG, Guimarães RCM. 2009. Desenvolvimento e nutrição do capim-tanzânia em função da aplicação de zinco. Scientia agraria 10(5):383-389.
- Hernández LE, Sobrino-Plata J, Montero-Palmero MB, Carrasco-Gil S, Flores-Cáceres ML, Ortega-Villasante C, Escobar C. 2015. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. Journal of experimental botany 66(10):2901-2911.

- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California: Agricultural experiment station. 32 p.
- Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Asgher M, Fatma M, Khan NA. 2013. Cross-talk between sulfur assimilation and ethylene signaling in plants. *Plant and signaling behavior* 8(1):104-112.
- Jank L, Martuscello JA, Euclides VBP, Valle C+B, Resende RMS, Fonseca DM. 2010. *Panicum maximum*. Plantas forrageiras. Viçosa, MG: Ed. UFV. p 166-196.
- Karyotou K, Donaldson RP. 2005. Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 434(2):248-257.
- Khan MIR, Asgher M, Iqbal N, Khan NA. 2013. Potentiality of sulphur-containing compounds in salt stress tolerance. In: Ahmad P, Azooz MM, Prasad MNV, editors. *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*. London: Springer. p 443-472.
- Khan MIR, Nazir F, Asgher M, Per TS, Khan NA. 2015. Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. *Journal of plant physiology* 173(1):9-18.
- Lavres Junior J, Monteiro FA, Schiavuzzo PF. 2008. Concentração de enxofre, valor SPAD e produção do capim-Marandu em resposta ao enxofre. *Revista brasileira de ciências agrárias* 3(3):225-231.
- Li X, Yang Y, Jia L, Chen H, Wei X. 2013. Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicology and environmental safety* 89(1):150-157.
- Li X, Yang Y, Zhang J, Jia L, Li Q, Zhang T, Qiao K, Ma S. 2012. Zinc induced phytotoxicity mechanism involved in root growth of *Triticum aestivum* L. *Ecotoxicology and environmental safety* 86(1):198-203.
- Littell RC, Mott GO. 1975. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. *Soil crop science society Florida proceedings* 34(1):94-97.
- Malavolta, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Editora agrônômica ceres, 1980. 251p.
- Marschner P. 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants. London: Academic press. 649 p.
- Matsuno H, Uritani I. 1972. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. *Plant and cell physiology* 13(6):1091-1101.

- Mihara M, Uchiyama M, Fukuzawa K. 1980. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochemical medicine* 23(3):302-311.
- Monteiro CC, Carvalho RF, Gratão PL, Carvalho G, Tezotto T, Medici LO, Peres LEP, Azevedo RA. 2011. Biochemical responses of the ethylene-insensitive never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environmental and experimental botany* 71(2):306-320.
- Na G, Salt DE. 2011. The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. *Environmental and experimental botany* 72(1):18-25.
- Nocito FF, Pirovano L, Cocucci M, Sacchi GA. 2002. Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant physiology* 129(4):1872-1879.
- Pinto SIdC, Ramos SJ, Araujo JL, Faquin V, Novais C+B, da Silva K, Neto AEF. 2009. Silício como amenizador da fitotoxicidade de zinco em plantas jovens de *Eucalyptus urophylla* cultivadas em solução nutritiva. *Revista árvore* 33(6):1005-1014.
- Pulford ID, Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment international* 29(4):529-40.
- Rabêlo FHS. 2014. Enxofre na atenuação dos efeitos tóxicos do cádmio no capim-tanzânia (Dissertação de Mestrado). Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz: Universidade de São Paulo. 104 p.
- Rabêlo FHS, Azevedo RA, Monteiro FA. 2017. Proper supply of S increases GSH synthesis in the establishment and reduces tiller mortality during the regrowth of tanzania guinea grass used for Cd phytoextraction. *Journal of soils and sediments* 1(1):1-10.
- Remans T, Opdenakker K, Guisez Y, Carleer R, Schat H, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and experimental botany* 84(1):61-71.
- Saito K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant physiology* 136(1):2443-2450.
- Sarruge JR, Haag HP. 1974. Análises químicas em plantas. ESALQ, editor. Piracicaba. 56 p.
- SAS-Institute. 2004. JMP statistics and graphics guide, version 5, release 5.1. 2. North Carolina: Cary. 644 p.
- Schmidt F, Monteiro FA. 2013. Sulphur supply affects morphology, growth and nutritional status of tanzania guinea grass and mineirao stylo. *Grass and forage science* 70(3):439-450.

- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant physiology* 127(3):887-898.
- Sigmaplot. 2004. Sigmaplot for windows, version 10.0. California: Systat software.
- Silva SC, Nascimento Jr D, Euclides VBP. 2008. Pastagens: conceitos básicos, produção e manejo. Viçosa: Suprema gráfica Ltda: Universidade federal de Viçosa. 115 p.
- Silveira ML, Alleoni LRF, Chang A. 2008. Condicionadores químicos de solo e retenção e distribuição de cádmio, zinco e cobre em latossolos tratados com biossólido. *Revista brasileira de ciência do solo* 32(1):1087-1098.
- Sengupta M. Environmental impacts of mining: monitoring, restoration, and control. Boca raton, FL: Lewis publishers, 1993. 494p.
- Soares CRFS, Siqueira JO, Carvalho JGd, Guilherme LRG. 2007. Nutrição fosfática e micorriza arbuscular na redução da toxicidade de cádmio em trema [*Trema micrantha* (L.) Blum.]. *Revista árvore* 31(1):783-792.
- Soares CRFS, Siqueira JO, de Carvalho JG, Guilherme LRG. 2006. Micorriza arbuscular e nutrição fosfática na toxidez de zinco para a trema [*Trema micrantha* (L.) Blum]. *Revista brasileira de ciência do solo* 30(4):665-675.
- Stulen I, De Kok LJ. 2012. Foreword: exploring interactions between sulfate and nitrate uptake at a whole plant level. In: De Kok LJ, Rennenberg H, Hawkesford MJ, editors. *Sulfur metabolism in plants*. London: Springer. p 1-8.
- Tabatabai MA. 1982. Sulfur. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR, editors. *Methods of soil analysis. Part 2 - Chemical and microbiological properties*. Madison: American society of agronomy. p 501-538.
- Tewari RK., Kumar P., Sharma PN. 2005. Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants 169(1): 1037-1045.
- Vaculík M, Pavlovič A, Lux A. 2015. Silicon alleviates cadmium toxicity by enhanced photosynthetic rate and modified bundle sheath's cell chloroplasts ultrastructure in maize. *Ecotoxicology and environmental safety* 120(1):66-73.
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA. 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57(5):701-710.
- Wu X, He J, Ding H, Zhu Z, Chen J, Xu S, Zha D. 2015. Modulation of zinc-induced oxidative damage in *Solanum melongena* by 6-benzylaminopurine involves ascorbate–glutathione cycle metabolism. *Environmental and experimental botany* 116(1):1-11.

Zhang Y, Wang Y, Ding Z, Wang H, Song L, Jia S, Ma D. 2017. Zinc stress affects ionome and metabolome in tea plants. *Plant physiology and biochemistry* 111(1):318-328.