

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
campus LAGOA DO SINO

LUCAS GIOVANI PASTORE BERNARDI

**CROMO E ZINCO INFLUENCIAM O RESTABELECIMENTO DE PLANTAS DE PEPINO
ENXERTADAS?**

Buri/SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÔNOMICA

LUCAS GIOVANI PASTORE BERNARDI

**METAIS PESADOS (CROMO E ZINCO) INFLUENCIAM O RESTABELECIMENTO DE
PLANTAS ENXERTADAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Engenharia Agrônômica para
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Agrônômica.

Orientação: Prof. Dr. Daniel Baron

Financiamento: Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
Processo nº 2018/13973-0.

Buri, SP
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO


LUCAS GIOVANI PASTORE BERNARDI

**METAIS PESADOS (CROMO E ZINCO) INFLUENCIAM O RESTABELECIMENTO DE
PLANTAS ENXERTADAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Agrônômica para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Agrônômica. Buri, 22 de novembro de 2019.

Aprovado em: 22/11/2019.

BANCA EXAMINADORA



Dr. **Daniel Baron** (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)



Dra. **Amanda Cristina Esteves Amaro Baron**
Instituto Itapetiningano de Ensino Superior (IIES)



Dr. **Jefferson Rangel da Silva**
Instituto Agrônômico de Campinas (IAC)

“Você é como o intenso desejo que lhe impulsiona:
Assim como é seu desejo, assim será sua vontade.
Assim como é sua vontade, assim serão seus atos.
Assim como são seus atos, assim será seu destino.
Assim como é seu destino, assim será você”

Deepak Chopra

“A preguiça é inimiga da vitória, o fraco não tem
espaço e o covarde morre sem tentar”

Mano Brown – Racionais Mc's

DEDICO,

*À minha base: **Silvia Maria Pastore Bernardi e Marco
Antônio Torres Bernardi** que, com total
dedicação e sacrifícios, fizeram com que eu me
tornasse o ser humano que hoje sou. A todos
que de maneira direta ou indireta estiveram
presentes na minha graduação, sempre
lembrarei com amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, coloco todas minhas intenções de gratidão deste trabalho a **Deus**, por ter me proporcionado saúde e vitalidade e pelos esclarecimentos proporcionados entre as preces, realizadas no mais íntimo do meu ser, em momentos de dificuldades.

À **Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)** e todos seus funcionários e colaboradores, assim como o doador e idealizador da universidade **Raduan Nassar**, por proporcionar o desenvolvimento de inúmeras pessoas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Aos meus estimados orientadores, prof. **Daniel Baron** e prof. **Iuri Emmanuel de Paula Ferreira**, pela amizade, por acreditarem em mim e me mostrarem o caminho da ciência.

Aos pesquisadores **Dirceu Mattos Jr**, **Franz Walter Rieger Hippler**, **Veronica Lorena Dovis**, **Guilherme Amaral Ferreira**, **Jefferson Rangel da Silva**, pela amizade e ensinamentos para a aplicação do conhecimento neste trabalho.

À professora **Laíze Aparecida Ferreira Vilela**, pela oportunidade de trabalho e confiança em meu crescimento pessoal e profissional.

Às pesquisadoras **Angeles Calatayud**, **Lídia Lopez-Serrano**, **Mari Rus Martinez Cuenca** pela amizade e ensinamentos.

À todos funcionários técnicos-laboratoriais do *campus* Lagoa do Sino, em especial os técnicos **André Pereira**, **Leonardo Niero**, **Sinara Dal Farra** e **Ueslei Lopes** por todo suporte e prestatividade que foram fundamentais na execução dos trabalhos que realizei na graduação.

À minha amada mãe **Silvia Maria Pastore Bernardi**, por dedicar sua vida à nossa família, por todo amor que me deu e dá até hoje e por ser um exemplo de profissional da Educação. Este trabalho jamais poderia ser concluído sem o seu auxílio.

Ao meu pai **Marco Antônio Torres Bernardi**, pelos ensinamentos de caráter, boa conduta e de ressaltar que a maior herança é o conhecimento que deixamos aos nossos semelhantes.

À minha irmã **Tamires Pastore Bernardi**, por ter me alfabetizado e me estimulado de maneiras inusitadas ao conhecimento.

Ao meu avô **Aurélio Bernardi** (*in memoriam*) pela amizade e breves ensinamentos que contribuíram de forma grandiosa com a minha existência.

Às minhas avós **Claudete Iolanda Pastore** e **Eulalia Torres Bernardi** e minha tia **Neuza Maria Torres Bernardi**, por todo carinho, amor e confiança.

Ao irmão que a vida me deu **Matheus Kohn da Silva**, por todos os longos anos de amizade e conversas que me ajudaram de maneira ímpar a superar os momentos difíceis.

À minha “segunda família” e gloriosa **República Oscar Cavara**, por terem me acolhido e me ensinado valores únicos de convivência que levarei para a vida. Deixo registrado minha gratidão mais sincera aos meus veteranos **Gustavo Figueira** (“*Pica de ouro*”), **Samuel Ventura** (“*Tchubaka*”), **Denis Patrick da Silva Dell Anhol** (“*Campeão*”), **Caio José Rodrigues**, **Vinicius Pereira Orlandi** (“*Gru*”), **Pedro Paulo Kropf Abib Ladeira** (*ppk*), aos meus aliados **Matheus Elzio Monaco** (“*Tanga*”), **Cristian Oshiro** (“*Japa*”), **Lucas Soares Coutinho** (Chicão) e aos meus queridos calouros **Gabriel Fernandes Antunes** (“*Marxa-Ré*”), **Igor Torres Galindo** (“*Resto*”), **João Vinicius Rodrigues Dias de Lara** (“*Tatu*”), **João Pedro Queiroga Maluf** (“*Hp*”), **João Estima** (“*Django*”).

Às minhas amigas **Carina Pereira Cotta** e **Kamila Anielle dos Santos Martins** pela cumplicidade, apoio e ajuda durante meus longos anos de graduação.

A todos companheiros do grupo de Pesquisa e Extensão em Fisiologia Vegetal (Pexfísio), pelo apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos amigos **Iuri Eduardo Pereira Bauer** e **Rodrigo Antônio Nuncio Junior** pelo auxílio na escrita e desenvolvimento deste trabalho, assim como pelos momentos de descontração proporcionados.

RESUMO

BERNARDI, Lucas Giovani Pastore. Metais pesados (Cromo e Zinco) influenciam o restabelecimento da enxertia? 2019. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de São Carlos, Buri, 2019.

Os metais pesados zinco (Zn) e cromo (Cr) são encontrados em áreas naturais ou de cultivo como contaminantes e podem acarretar prejuízos diretos na propagação vegetativa. A espécie vegetal *Cucumis sativus* L. (pepino) é cultivada a partir da técnica da enxertia; tal manejo agrônômico, proporciona à cultura características como tolerância a estresses abióticos. Além disso, essa espécie se mostra como vegetal amplamente investigado em reportagens científicas sobre efeitos fisiológicos causados por fatores abióticos, o que habilita a mesma como 'planta-modelo' em estudos investigativos. Testamos a hipótese de que os metais pesados influenciam o restabelecimento da enxertia em plantas de pepino cultivados em solução nutritiva. A partir dessa prerrogativa, nosso objetivo foi avaliar o restabelecimento vegetal pós-enxertia a partir da disponibilidade radicular de Cr e Zn, via solução nutritiva. Os tratamentos adotados foram fornecidos a partir de diferentes disponibilidades de metais pesados Zn e Cr de forma isolada e combinados entre si, e tratamento controle sem a aplicação desses elementos. Realizamos inicialmente o teste-piloto, para ajustes metodológicos e entendimento das respostas do vegetal e, posteriormente, o experimento definitivo com robusta coleta de dados, como medidas de crescimento vegetal, trocas gasosas e análises enzimáticas que serão apresentadas em modelo de artigo científico neste trabalho. Para o teste-piloto, realizamos a análise de variância (ANOVA) a fim de verificar as relações causais entre os fatores estudados e as respostas. As pressuposições da ANOVA foram checadas a partir dos testes de Shapiro-Wilk (normalidade) e Levene (homogeneidade de variâncias). A *posteriori*, as médias dos tratamentos foram comparadas, par a par, a partir do teste de Tukey. Em todos os testes de significância utilizamos $\alpha = 0,05$. As plantas de pepino enxertadas apresentaram restabelecimento vegetal pós-enxertia mesmo após a aplicação de metais pesados. As plantas diferenciaram-se quanto ao crescimento vegetativo de acordo com as concentrações de metais aplicados e o tratamento controle, todavia este padrão não foi observado em relação às clorofilas e carotenóides, o que pode ser um indicador de pleno reestabelecimento vegetal pós-enxertia. Deste modo, aceitamos a hipótese científica ao indicarmos que, o metal pesado essencial, zinco, e o não essencial, cromo, influenciam o reestabelecimento da enxertia. De maneira geral concluímos que os metais pesados influenciaram o crescimento do vegetal pós-enxertia, entretanto a técnica da enxertia pode promover um melhor sistema de defesa aos metais evidenciado na não alteração de pigmentos fotossintetizantes. Entretanto, a aplicação de Cr e de elevadas doses de Zn prejudicaram o vegetal quanto ao crescimento e aumentou a atividade enzimática das plantas submetidas a esses tratamentos.

Palavras-chave: Enxertia. metais pesados. pepino. propagação vegetativa.

ABSTRACT

Can heavy metals (chromium and zinc) influence the reestablishing of post-grafting plants?

The essential and nonessential heavy metals zinc (Zn) and chromium (Cr), respectively, are found in natural or cultivated areas as contaminants and can cause direct damage to vegetative propagation. A plant species *Cucumis sativus* L. (cucumber) is cultivated using the grafting technique and, provides the crop with characteristics such as heavy metal stress tolerance. In addition, this species shows that it is widely investigated in scientific reports on physiological effects caused by clinical factors, or that it qualifies as a 'plant-model' in investigative studies. We examined the hypothesis that heavy metals influence the grafting reestablishment in cucumber plants grown in the nutrient solution. From this hypothesis, our objective was to evaluate the reestablishing of the post-grafting plant from the essential and non-essential root availability of heavy metals via nutrient solution. We collected, weekly, data of linear plant growth dimensions and quantified chlorophyll and carotenoids. The controls adopted were used from different availability of Zn and Cr heavy metals in isolation and in combination, and control treatment of heavy metals. We conducted an initial test for methodological adjustments and understanding of plant responses and, subsequently, the main experiments with robust data collection, such as plant growth measurements, gas exchange and enzymatic analyzes that are used in the current scientific paper model. To the initial tests, we performed an analysis of variance (ANOVA) to verify the relationships among the factors studied and the responses. As the ANOVA assumptions were cut from the Shapiro-Wilk (normality) and Levene (homogeneity of variance) tests. Then, the data means were compared, for example, from the Tukey test. All tests were conducted considering the significance level of $\alpha=0.05$. Our study can conclude that the grafted cucumber plants showed no post-grafting plant reestablishment even after the application of heavy metals. The plants differed in vegetative growth according to the applied metal concentrations and the control treatment, however this pattern was not observed in relation to chlorophylls and carotenoids, which may be an indicator of full post-grafting plant reestablishment. Thus, we accept the scientific hypothesis by conclude that the essential heavy metal, zinc, and the nonessential, chromium, influence the reestablishment of the graft. In general, we conclude that heavy metals influenced post-grafting plant growth, however the grafting technique can promote a better antioxidant defense system evidenced by the non-alteration of photosynthetic pigments. However, the application of Cr and high doses of Zn affected the plant growth and increased the enzymatic activity of the plants submitted to these treatments.

Keywords: grafting. heavy metals. cucumber. plant propagation

Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	11
3. TESTE-PILOTO	12
3.1 Condução Experimental do teste-piloto	12
3.2 Análise estatística	14
3.3 Resultados e considerações gerais sobre o teste-piloto	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
Metais pesados (cromo e zinco) influenciam o restabelecimento de vegetais pós-enxertia?... 19	
Resumo	19
2. Materiais e métodos	21
2.1 <i>Material vegetal</i>	21
2.2 <i>Implantação Experimental</i>	21
2.3 <i>Trocas gasosas</i>	22
2.5 <i>Análise de pigmentos fotossintetizantes</i>	23
2.6 <i>Enzimas antioxidantes</i>	23
2.7 <i>Delineamento experimental</i>	24
3. Resultados.....	26
3.1 <i>Trocas Gasosas</i>	26
3.2 <i>Crescimento vegetal</i>	28
3.2 <i>Carotenóides e clorofila</i>	30
3.3 <i>Enzimas antioxidantes</i>	30
4. Discussão	31
5. Conclusão	34
6. Agradecimentos	34
7. Referências Bibliográficas.....	34

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O pepino (*Cucumis sativus* L.), pertencente à família botânica Cucurbitaceae, é uma hortaliça originária da Ásia com boa adaptabilidade a climas tropicais como, por exemplo, o Brasil (GOTO, 2014). Essa cultura está entre as 10 mais importantes hortaliças, com elevado valor comercial e, dentre as cucurbitáceas, destaca-se como uma das que mais se emprega o cultivo protegido, a fim de expressar todo o potencial fisiológico de produtividade (MOHAMMADI; OMID 2010; CONAB, 2017). Para aprimorar a produção do pepino utiliza-se a técnica da enxertia, o que proporciona uma melhor performance de crescimento vegetal quando submetida à estresses abióticos (LIU et al., 2016; AL-HARBI et al., 2018).

Estresses abióticos, tais como temperaturas, irradiância de fótons, suprimento de água e solutos inorgânicos são fatores limitantes da produção vegetal (COLLINS; TARDIEU; TUBEROSA., 2008). Os estresses podem ocorrer de maneira simultânea. Por exemplo, o estresse hídrico e por elevadas temperaturas pode ocasionar estresses secundários, como a diminuição de algumas atividades essenciais para a sobrevivência do vegetal como a dificuldade de absorção de elementos vegetais (BOWNE et al., 2018). Dentre os inúmeros tipos de estresse abióticos, o acúmulo de metais pesados e contaminantes no solo também são reconhecidos como fatores limitante de produção (GRATÃO; ALVES; LIMA, 2019) e a utilização da técnica da enxertia é relatada como eficiente para a superação desse tipo de estresse (MAURYA et al., 2019), porém, tais mecanismos de defesa e de reconstituição do tecido vascular durante o processo da enxertia são poucos elucidados.

A propagação por enxertia é um método que consiste na união de duas plantas vivas para o desenvolvimento de uma única composição vegetal, em que o vegetal responsável por absorver água e sais minerais é conhecido como porta-enxerto (parte 'radicular') e o vegetal responsável por realizar o processos fotossintéticos é conhecido como copa (parte 'aérea') (BARON et al., 2019). Trata-se de uma prática antiga, relatada comercialmente em hortaliças desde o século XVII no continente asiático (COHEN et al., 2007).

Na Coréia do Sul, por volta de 1950, foram produzidas plantas comerciais enxertadas a fim de incrementar a produção e permitir que espécies não adaptadas à condições edafoclimáticas possam ser produzidas em condições estressantes (HUANG et al., 2010; KUMAR et al., 2015; EDELSTEIN et al., 2016). Além disso, esta prática agrônômica pode ser utilizada como estratégia para minimizar a absorção de metais pesados e acúmulo destes em sua parte aérea (SAVVAS et al., 2010; EDELSTEIN et al., 2017).

Tal tolerância a metais pesados se dá pela limitação de algumas espécies porta-enxerto de absorver e translocar esses elementos para a parte aérea (COLLA et al., 2013; KUMAR et al., 2015a). Estudos com plantas de melão (*Cucumis melo* L. cv. 'arava') enxertadas em

plantas de abóbora comercial (*Cucurbita máxima* Duchesne x *Cucurbita moschata* Duchesne rootstock 'TZ-148 indicaram concentrações de metais pesados como manganês (Mn), cromo (Cr), titânio (Ti), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e níquel (Ni) menores em suas partes aéreas quando comparadas às plantas de melão não enxertadas, com maior acumulação desses elementos na parte vegetativa e menor acumulação nos frutos (EDELSTEIN; BEM-HUR, 2012). Em estudo detalhado sobre a tolerância a metais pesados em plantas enxertadas, Kumar et al., (2015b) indicou que plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) enxertadas mitigam o estresse mantendo melhores atividades metabólicas e fisiológicas, como melhores parâmetros nutricionais, maiores concentrações de pigmentos fotossintetizantes, maior atividade fotoquímica do fotossistema II, maior atividade de enzimas antioxidantes (catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), concentração de prolina e metabólicos ligados ao estresse oxidativo.

O estresse ocasionado por metais pesados pode afetar o restabelecimento da enxertia, visto que, estes elementos em excesso, causam severos estresses oxidativos resultantes do desbalanço do sistema antioxidativo em função da elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em diferentes compartimentos celulares (GRATÃO; ALVES; LIMA, 2019). As EROs causam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, que prejudicam as estruturas das membranas celulares (BINO et al., 2005), o que pode prejudicar a planta no momento de restabelecimento da enxertia. De acordo com a literatura, elementos minerais atuam diretamente no metabolismo regenerativo das conexões vasculares em plantas enxertadas (LIU; LI; LV et al., 2016) e este restabelecimento é fundamental para espécies vegetais enxertadas, contudo os efeitos fisiológicos nos diferentes mecanismos bioquímicos no restabelecimento vegetal pós-enxertia são poucos elucidados.

Em relação ao desenvolvimento da composição vegetal enxertada, como já mencionado previamente, é necessário que enzimas antioxidantes sejam sintetizadas, a fim de se prevenir danos celulares. Essas enzimas apresentam papel fundamental pois realizam a função de desintoxicar a planta de elementos tóxicos, como radicais livres, peróxidos de hidrogênio e este mecanismo de defesa ocorre como resultado natural do metabolismo aeróbico de mitocôndria e plastídeos devido à elevada oxidação do meio (CUYPERS et al., 2010).

De maneira geral, os vegetais possuem mecanismos de defesa, a partir da ação de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase e peroxidase que minimizam a absorção de metais contaminantes ou desintoxicação dos mesmos quando absorvidos (GRATÃO et al., 2019). A eficiência desses mecanismos nos vegetais enxertados é influenciada de maneira significativa pelo genótipo da espécie empregada como porta-enxerto (SARWAR; et al., 2010; SAVVAS et al., 2013), a fim de minimizar problemas com absorção de metais para a parte aérea e frutos através das conexões vasculares já

restabelecidas ou, ainda, durante o processo de restabelecimento após o uso da técnica da enxertia (SAVVAS et al., 2010; EDELSTEIN; BEN-HUR, 2018).

A SOD realiza a dismutação de O_2^- em O_2 e H_2O_2 , a fim de evitar uma maior produção de radicais hidroxila (CUYPERS et al., 2010). Tal enzima pode ser encontrada nos cloroplastos, na matriz mitocondrial e no citoplasma das células, conhecidas por três isoformas diferentes, a mais abundante nas plantas é o cobre (Cu) e o zinco (Zn) SOD, encontrado no estroma dos cloroplastos e no citosol (KUMAR; SUGATHA; HEBBAR, 2014). A enzima responsável por converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 é a CAT, com ação constatada em cloroplastos, tecidos vasculares e mesófilos foliares (MHAMDI et al., 2010; ROYCHOUDHURY; BASU; SENGUPTA, 2012).

Além disso, a enzima APX também realiza a conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . No entanto, as enzimas relacionadas ao processo de peroxidação, como a APX e a glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.7), têm sua importância ressaltada devido à influência no crescimento celular, lignificação, oxidação de compostos fenólicos, defesa contra patógenos além de ser um importante mecanismo de defesa antioxidante (GRATÃO; ALVES; LIMA, 2019). Tais enzimas podem ter sua síntese influenciada pela absorção de alguns metais pesados através do sistema radicular (RAI; VAJPAYEE; SINGH et al., 2004). Ainda em relação ao restabelecimento da enxertia, estudos recentes reportam que o porta-enxerto causa efeitos diretos nas trocas gasosas de plantas (BARON et al., 2017).

Diversos estudos abordam a interação do porta-enxerto nas alterações bioquímicas e fisiológicas da parte aérea da planta, uma vez que esta é dependente da raiz para a absorção e translocação de nutrientes, água e hormônios (DOS SANTOS et al., 2017; AL-HARBI et al., 2018). Lopez-Serrano et al. (2019) relatam em seu estudo a influência benéfica da enxertia nas trocas gasosas em plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.), obtendo-se valores maiores na assimilação de CO_2 e condutância estomática em plantas enxertadas, como também reportado por Penella et al. (2017), o que resulta em maior crescimento e produção de matéria seca, o restabelecimento vegetal pós-enxertia depende da interação fisiológica entre porta-enxerto e copa.

O restabelecimento da conexão vascular pós-enxertia em plantas compatíveis depende, conforme sugerem alguns autores, de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, APX e peroxidase) que atuam na lignificação do xilema para promover a formação e conexão entre os feixes vasculares (QUIROGA et al. 2000; XU et al., 2015). A deficiência nutricional de elementos essenciais prejudicam o crescimento do vegetal, sendo esses elementos necessários para o funcionamento metabólico como síntese das enzimas citadas como necessárias para a desintoxicação da planta a EROs, desbalanço hormonal e restabelecimento da enxertia (MARTÍNEZ-ANDÚJAR et al., 2017).

Na natureza, existem elementos minerais essenciais e não essenciais. Os elementos minerais essenciais são aqueles necessários que o vegetal sobreviva e complete o seu ciclo vegetativo, ao contrário dos elementos não essenciais, que não causam nenhum efeito benéfico para planta (TAIZ et al., 2017). Os metais pesados podem se enquadrar nos dois tipos de classificação dos elementos minerais, sendo que alguns metais como cromo, chumbo, cádmio e arsênio, além de serem não essenciais, causam danos aos vegetais (EDELSTEIN; BEN-HUR, 2018).

A deficiência do elemento mineral zinco (Zn) prejudica a síntese de enzimas antioxidantes, metabolismo de carboidratos, estrutura ribossômica e regulação da expressão de genes (KABATA-PENDIAS, 2011). Estas mesmas enzimas antioxidantes são prejudicadas pelo metal não essencial cromo (Cr), que causa diversos efeitos deletérios às plantas pela elevada produção de EROs (TRIPATHI et al. 2016).

Metais pesados são, geralmente, depositados no solo através de fertilizantes, defensivos e atividades industriais (WU et al., 2016). A deposição de Cr no solo se dá, principalmente, pela indústria têxtil e de eletrodeposição, encontrado nas formas químicas trivalentes e hexavalentes. O Cr hexavalente é a forma iônica mais tóxica para as plantas e pode permanecer no solo ao longo do tempo sem alterar seu estado de oxidação (SANTANA et al., 2012; SHAHID et al., 2017). Esse elemento é absorvido pela planta e translocado para sua parte aérea através do xilema, entretanto, quando sua forma exavalente atravessa a endoderme celular via simplasto, é reduzida para sua forma trivalente, o que indica sua maior retenção no córtex celular da raiz (HAYAT et al., 2012). Plantas que se desenvolvem sob estresse de Cr apresentam aumentada produção de íons prejudiciais às plantas como superóxidos, radicais hidroxila e peróxidos de hidrogênio, resultado do estresse oxidativo, que por sua vez, reduz o pH do meio interno da planta e ocasiona anomalias em seu metabolismo (SANTANA et al., 2012; TRIPATHI; TRIPATHI et al. 2016). Em relação ao sistema antioxidativo das plantas, os efeitos do excesso de Cr danificam a estrutura celular e atividade enzimática, as quais o Zn é componente estrutural ou de ativação (HUMTSOE et al., 2018).

A deficiência do elemento mineral zinco (Zn) prejudica a síntese de enzimas antioxidantes, metabolismo de carboidratos, estrutura ribossômica e regulação da expressão de genes (KABATA-PENDIAS, 2011). Estas mesmas enzimas antioxidantes são prejudicadas pelo metal não essencial cromo (Cr), que causa diversos efeitos deletérios às plantas pela elevada produção de EROs (TRIPATHI et al. 2016).

O Zn faz parte do grupo de nutrientes essenciais envolvidos em reações redox, constituinte do álcool desidrogenase, desidrogenase glutâmica e anidrase carbônica (SAMREEN et al., 2017). Esse elemento é componente das seis classes de enzimas, entre

elas oxidorreductase, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e sua absorção, via solo, se dá na forma química bivalente e transporte através de condutos xilemáticos (MARSCHNER, 2012). Uma das principais referências em nutrição mineral de plantas, Marschner (2012), afirma que a deficiência de Zn leva a encurtamento de entrenós do caule por reduzir a produção de auxina (Ax), e esta é investigada cientificamente como promotora de uma melhor cicatrização da incisão da enxertia e aceleração das reconexões vasculares de xilema e floema (MELNYK et al., 2015).

De acordo com a literatura, acreditamos que o elemento Cr esteja presente no vegetal com função antagonista ao Zn, elemento essencial que pode promover à planta benefícios em suas atividades fisiológicas e produção de hormônios vegetais relacionados à dominância apical. Portanto, investigamos tais elementos em plantas enxertadas a fim de se comparar o restabelecimento vegetal e suas respostas fisiológicas e crescimento em condições estressantes e não estressantes.

Os nossos resultados experimentais preliminares (testes-pilotos) estão apresentados no próximo tópico do texto. Após a descrição destes, os dados experimentais, em definitivo, e a sua discussão científica foram redigidos em formato de artigo científico, conforme normas de publicação do periódico **Scientia Horticulturae** [Qualis capes: A1 (Ciências Agrárias)], *GUIDE FOR AUTHORS* <https://www.elsevier.com/journals/scientia-horticulturae/0304-4238/guide-for-authors>

2. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Abaixo são apresentadas as hipóteses de nulidade (H0).

Espera-se que H0 seja falsa, considerando verdadeira a hipótese alternativa (H1), na qual se verifica efeito significativo:

(H0) Metais pesados essenciais e não essenciais (Cr e Zn) não prejudicam o reestabelecimento pós-enxertia de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) enxertado em plantas de abóboras (*Cucurbita moschata* L.);

(H0) O fornecimento de Zn e Cr não interferem na produção de componentes fotossintéticos, tais como clorofilas e carotenoides durante o restabelecimento do vegetal pós-enxertia.

(H1) Metais pesados essenciais e não essenciais (Zn e Cr, respectivamente) prejudicam o reestabelecimento pós-enxertia de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) enxertado em plantas de abóboras (*Cucurbita moschata* L.);

(H1) O fornecimento de Zn e Cr interferem na produção de componentes fotossintéticos, tais como clorofilase carotenóides.

3. TESTE-PILOTO

3.1 Condução Experimental do teste-piloto

O teste-piloto foi implantado com plantas jovens de pepino japonês (*Cucumis sativus* L.), não enxertadas (pé-franco). Tal teste teve como objetivo aprender as metodologias laboratoriais, testá-las e, inevitavelmente, realizar ajustes metodológicos.

As plantas de pepino foram adquiridas de viveiro comercial de mudas e instaladas em cultivo protegido pertencente à área experimental da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* Lagoa do Sino, município de Buri-SP, situado a 596 metros de altitude e com as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 23°47'57" Sul, Longitude: 48°35'15" Oeste. O ambiente de cultivo foi composto por estrutura metálica do tipo arco, coberta com filme plástico agrícola de polietileno transparente (PEBD, anti-UV) com 150µm, pé-direito de 3 metros, construída adotando-se o sentido Leste-Oeste, com sombrite laminado conhecido como *Aluminet® Polysack* apoiado sob o teto que proporciona a passagem de intensidade luminosa entre 0 a 1200 µmol/m²/s (DFFFA, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos) para proteção contra intempéries climáticas que poderiam interferir nas respostas das plantas aos tratamentos.

Utilizamos 12 repetições individuais de plantas e estas foram transplantadas 9 dias após emergência (DAE) para tubetes de cultivo de mudas, com volume individual de 400 mL, preenchidas com substrato vermiculita de textura fina. Após o período de aclimação das plantas jovens pós-transplante (7 dias após o transplante) sob cultivo protegido, aplicamos a solução nutritiva de Hoagland e Arnold nº2 à 50% de força-iônica (F.I.) via radicular, com condutividade elétrica em torno de 1,0 mS.cm⁻¹ com intervalo de segurança de ± 0,2 mS.cm⁻¹, para a manutenção basal do metabolismo vegetativo. Quanto a aplicação dos metais minerais Cr e Zn, via radicular, utilizamos soluções “estoque”, em que estas foram preparadas a partir de reagentes puros para análise (P.A.) a partir de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇·7H₂O) e sulfato de zinco (ZnSO₄·7H₂O).

No teste-piloto consideramos como a dose ‘ideal’ de Cr (tolerada pela espécie sem prejuízo ao seu metabolismo) a concentração de 30 µM, e a dose prejudicial de Cr aplicada foi de 100 µM, de acordo com o estudo de Rai et al., (2004). A dose adicional considerada como ideal de zinco foi de 2 µM, segundo estudo realizado por Samreen et al., (2017). A seguir, o descritivo de cada um dos tratamentos empregados:

T1 (testemunha) = solução nutritiva a 50% de força-iônica sem aplicação de metais pesados essenciais e não essenciais; T2 = solução nutritiva a 50% de força-iônica com aplicação de dose elevada (10 μM) do metal pesado essencial Zn via solução nutritiva; T3 = solução nutritiva a 50% de força-iônica com aplicação da dose prejudicial (100 μM) do metal pesado não-essencial Cr via solução nutritiva; T4 = solução nutritiva a 50% de força-iônica com aplicação da menor dose de metal pesado essencial Zn (2 μM) e da dose não prejudicial de Cr (30 μM).

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 6 repetições de uma planta cada.

Dimensões lineares do crescimento vegetativo

As medidas de crescimento foram realizadas ao longo dos 45 dias após o transplante (DAT) com intervalo de 7 dias, seguindo-se as recomendações de medidas de crescimento publicadas por Benincasa (2003) em seu manual de análise de crescimento de plantas. Segue abaixo os parâmetros avaliados.

Altura da parte aérea

Realizamos a medida da distância entre a superfície do solo e a parte mais alta da planta através da inflexão de uma folha superior com o uso de régua graduada em milímetros.

Comprimento de caule

Realizamos a medida da distância entre a base do caule ou colo e o ápice do mesmo com o uso de régua graduada em milímetros.

Número de folhas e medidas de superfície foliar

Realizamos a contagem do número de folhas em unidades. Medidas de comprimento e largura da folha totalmente expandida mais jovem foram coletadas.

Análise de clorofilas (a e b) e carotenoides

A quantificação de clorofilas (a e b) foi realizada de acordo com metodologia proposta por Freire et al. (2013). Em um almofariz foram colocadas 0,020 a 0,050g de folhas

frescas congeladas, as quais foram pulverizadas em nitrogênio líquido. Esse material foi homogeneizado em 4mL de solução de acetona/tampão Tris-HCl (80:20, v/v, pH 7,8, 0,2M). A suspensão resultante foi transferida para tubos de centrifuga (capacidade volumétrica de 1,5mL) e mantidos em freezer a -20°C por 1h. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g durante 5min. a 4°C. Para as leituras do espectrofotômetro, foram utilizados 1500µL do sobrenadante + 1500µL de solução de acetona/tampão Tris-HCl utilizando-se 663nm, 647nm, 537nm e 470nm. A concentração de clorofilas *a* e *b* e carotenoides foram calculadas segundo as equações e expressos em µg de pigmento por g de matéria fresca:

$$\text{Clorofila } a = 0,01373.(A663) - 0,000897.(A537) - 0,003046.(A647);$$

$$\text{Clorofila } b = 0,02405.(A647) - 0,004305.(A537) - 0,005507.(A663);$$

$$\text{Carotenóide} = (A470 - (17,1.(Cl_a - Cl_b) - 9,479.(antocianina)))/119,26.$$

3.2 Análise estatística

Os dados foram analisados a partir de estatística descritiva. Valores não aceitáveis foram encontrados na análise dos pigmentos e, então, retirados da amostra. Posteriormente, realizamos a análise de variância (ANOVA) para acessar os efeitos dos tratamentos sobre as respostas estudadas.

As pressuposições da ANOVA foram checadas a partir dos testes de Shapiro-Wilk (normalidade) e Levene (homogeneidade de variâncias). A *posteriori*, as médias dos tratamentos foram comparadas, par a par, a partir do teste de Tukey. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* R (R CORE TEAM, 2019). Em todos os testes de significância utilizou-se $\alpha = 0,05$.

3.3 Resultados e considerações gerais sobre o teste-piloto

Tabela 1. Análise de variância (ANOVA) para pigmentos fotossintéticos de *Cucumis sativus* L. e variáveis biométricas no teste-piloto considerando-se 4 tratamentos.

Variável	GL Residual	Estatística F	Valor p	CV
Clorofila <i>a</i> (µmol)	13	0,5866	0,6344 ^{ns}	26,67%
Clorofila <i>b</i> (µmol)	13	0,2862	0,8346 ^{ns}	38,22%
Antocianina (µmol)	13	0,3704	0,7757 ^{ns}	53,90%
Carotenóides (µmol)	10	7,2293	0,0073 ^{**}	16,90%
Diâmetro (mm)	16	1,8242	0,1834 ^{ns}	9,05%
Altura (cm)	16	1,3462	0,2947 ^{ns}	11,05%

** p<0,01.

A Tabela 2 indica as médias e erro padrão das concentrações de clorofila *a*, clorofila *b*, antocianina e carotenóides.

Tabela 2. Médias e erros-padrão para os pigmentos fotossintéticos de *Cucumis sativus* L. nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Clorofila a	Clorofila b	Antocianina	Carotenóides
0 (controle)	0,00802±0,000911 a	0,00619±0,00101 a	0,0121±0,00361 a	0,00468±0,000291 a
100 µM Cr	0,00873±0,001176 a	0,00537±0,00131 a	0,0157±0,00466 a	0,00358±0,000461 ab
10µM de Zn	0,00713±0,001018 a	0,00661±0,00113 a	0,0177±0,00404 a	0,00419±0,000376 ab
30µM Cr + 2µM Zn	0,00701±0,000911 a	0,00543±0,00101 a	0,0152±0,00361 a	0,00270±0,000326 b

Letras distintas nas colunas identificam médias estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05).

Observamos que os metais pesados não influenciaram em aspectos de clorofila a, clorofila b e antocianina. Os carotenóides tiveram variações, porém tais dados não foram possíveis de serem interpretados em comparação aos reportados em literatura.

As medidas de crescimento coletadas (Tabela 3) não diferiram estatisticamente pelo teste de tukey.

Tabela 3. Médias e erros-padrão para as variáveis de crescimento de *Cucumis sativus* L. nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Diâmetro (mm)	Altura (cm)
0 (controle)	3,54±0,123 a	7,53±0,326 a
100 µM Cr	3,16±0,151 a	6,55±0,400 a
10µM de Zn	3,16±0,151 a	7,46±0,400 a
2µM Zn	3,36±0,123 a	7,25±0,326 a

As médias não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os resultados apresentados revelam divergências em comparação ao que é reportado pela literatura. Em estudos com pepino pé-franco, Tripathi et al., (2016) constata que há redução de tamanho das plantas, matéria seca e pigmentos fotossintetizantes com a aplicação de 50 µM de Cr, com evidência de diferenças mais severas na concentração de 100 µM de Cr.

A aplicação das doses adicionais de Zn, ideal e a considerada excessiva, também não apresentaram diferenças significantes, ao contrário do que é apresentado nos estudos científicos consultados, em que doses de 2 µM de Zn proporcionam maior produção vegetativa e aumento de pigmentos fotossintetizantes (SAMREEN et al., 2017).

Por fim, tais resultados e experiências de execução (*'treinamento prático com a mão na massa'*) dos testes preliminares, assim como execução dos protocolos de análises e boas práticas laboratoriais foram de fundamental importância para adaptações, melhorias e *'curva de aprendizagem'* a serem incorporados no experimento definitivo. Após a execução das avaliações experimentais preliminares, interpretamos os resultados, ajustamos as

metodologias e implantamos o experimento definitivo. Vale ressaltar que, após realização desses teste-piloto, estabelecemos uma importante parceria colaborativa com o Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira' (IAC), localizado no município paulista de Cordeirópolis.

Desta forma, optamos por conduzir o experimento definitivo nas instalações do IAC (Laboratório de fisiologia vegetal) durante o período de recesso letivo (recesso e férias da graduação) por se tratar de uma equipe com vasta experiência laboratorial em análises de enzimas antioxidantes com foco de estudo em organismos vegetais frutíferos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HARBI, A. R.; AL-OMRAN, A. M.; ALHARBI, K. Grafting improves cucumber water stress tolerance in Saudi Arabia. **Saudi journal of biological sciences**, v. 25, n. 2, p. 298-304 2018.

BARON, D. et al. An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. **Scientia horticulturae**, v. 243, p. 84-91, 2019.

BARON, D. et al. Physiological changes modulated by rootstocks in atemoya (*Annona x atemoya* Mabb.): gas exchange, growth and ion concentration. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 1, p. 219-225, 2017.

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 41p. 2003.

BINO R. J. et al. The light-hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. **New Phytol**, v. 166, p.427–438, 2005.

BOWNE, J. et al. Abiotic stress and metabolomics. **Annual Plant Reviews online**, p. 61-85, 2018.

COHEN, R.; BURGER, Y.; HOREV, C.; KOREN, A. Introducing grafted cucurbits to modern agriculture, the Israeli experience. **Plant Disease**, v. 91, n. 8, p. 916 – 923, 2007.

COLLA, G. et al. Grafting: an effective tool for abiotic stress alleviation in vegetables. **Horticulture for food and environment security**. New Delhi: Westville Publishing House, p. 19–28, 2013.

COLLINS, N.C.; TARDIEU, F.; TUBEROSA, R. Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? **Plant Physiology**. v. 147, n. 2, p. 469– 486, 2008.

CONAB. **Indicadores da Agropecuária**, n. 6, p. 01-118, 2017.

CUYPERS, A. et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. **Biometals** v. 23, p. 927–940, 2010.

DOS SANTOS, I. C. et al. Differential accumulation of flavonoids and phytohormones resulting from the canopy/rootstock interaction of citrus plants subjected to dehydration/rehydration. **Plant Physiology and Biochemistry**, v 119, p. 147-158 2017.

EDELSTEIN, M. et al. Using grafted vegetables to increase tolerance to salt and toxic elements. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 9978, p. 1–18, 2016.

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

FREIRE, J. D. O., CAVALCANTE, L. F., NASCIMENTO, R. D., & REBEQUI, A. M. Chlorophyll content of leaf and mineral composition of passion fruits irrigated with saline water and biofertilizers. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)**, v. 36, n. 1, p. 57-70, 2013.

GOTO, R. **Programa brasileiro para a modernização da horticultura: normas de classificação do pepino**. São Paulo: CQH/CEAGESP, 2014. p. 82.

GRATÃO, P. L.; ALVES, L. R.; LIMA, L. W. Heavy Metal Toxicity and Plant Productivity: Role of Metal Scavengers. **Plant-Metal Interactions**, p. 49-60, 2019.

HUANG, Y. et al. Improving cucumber tolerance to major nutrients induced salinity by grafting onto *Cucurbita ficifolia*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, n. 1, p. 32–38, 2010.

HUMTSOE, B. M.; DAWSON, J.; RAJANA, P. Effect of nitrogen, boron and zinc as basal and foliar application on growth and yield of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 6, p. 01-04, 2018.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2011.

KUMAR, M.; SUGATHA, P.; HEBBAR, K.B. Superoxide dismutase Isozymes and their heat stability in coconut (*Cocos nucifera* L.) leaves. **Annals of Biology**, v. 30, p. 593–597, 2014.

KUMAR, P. et al. Effect of nickel and grafting combination on yield, fruit quality, antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation, and mineral composition of tomato. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 178, n. 6, p. 848–860, 2015c.

KUMAR, P. et al. Grafting affects growth, yield, nutrient uptake, and partitioning under cadmium stress in tomato. **HortScience**, v. 50, n.11, p. 1654-1661, 2015a.

KUMAR, P. et al. Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 477, 2015b.

LIU, S. et al. Grafting cucumber onto luffa improves drought tolerance by increasing ABA biosynthesis and sensitivity. **Scientific reports**, v. 6, p. 1-14, 2016.

LÓPEZ-SERRANO, L. et al. Pepper rootstock and scion physiological responses under drought stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2019.

LÓPEZ-SERRANO, L., et al. Pepper rootstock and scion physiological responses under drought stress. **Frontiers in plant science**, v. 10, 2019.

MARSCHNER P. Marschner's mineral nutrition of higher plants. 3 ed. London, Academic Press. 651p. 2012.

MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C. et al. Hormonal and nutritional features in contrasting rootstock-mediated tomato growth under low-phosphorus nutrition. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 533, 2017
MAURYA, D. et al. Grafting techniques in vegetable crops: A review. **IJCS**, v. 7, n. 2, p. 1664-1672, 2019.

MELNYK, C. W. et al. A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. **Current Biology**, v. 25, n. 10, p. 1306-1318, 2015.

MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.

MOHAMMADI, A.; OMID, M. Economical analysis and relation between energy inputs and yield of greenhouse cucumber production in Iran. **Applied Energy**, v. 87, p. 191–196, 2010.

PENELLA, C. et al. Grafting pepper onto tolerant rootstocks: An environmental-friendly technique overcome water and salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 33-41, 2017.

PENELLA, C. et al., Salt-tolerant rootstock increases yield of pepper under salinity through maintenance of photosynthetic performance and sinks strength. **Journal of plant physiology**, v. 193, p. 1-11, 2016.

QUIROGA, M. et al. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1119-1128, 2000.

RAI, V. et al. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. **Plant Science**, v. 167, n. 5, p. 1159-1169, 2004.

ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S.; SENGUPTA, D.N. Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 34, p. 835–847, 2012.

SAMREEN, T. et al. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1802-1807, 2017.

SANTANA, K.B. et al. Physiological analyses of *Genipa americana* L. reveals a tree with ability as phytostabilizer and rhizofilterer of chromium ions for phytoremediation of polluted watersheds. **Environmental and Experimental Botany**, v. 80, p.35-42, 2012.

SARWAR, N. et al. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 6, p. 925–937, 2010.

SAVVAS, D. et al. Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. **Scientia horticulturae**, v. 127, n. 2, p.156-161, 2010.

SAVVAS, D.; NTATSI, G.; BAROUCHAS, P. Impact of grafting and rootstock genotype on cation uptake by cucumber (*Cucumis sativus* L.) exposed to Cd or Ni stress. **Scientia Horticulturae**, v. 149, p. 86–96, 2013.

SHAHID, M. et al. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. **Chemosphere**, v. 178, p. 513-533, 2017.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TRIPATHI, A. et al. Chromium (VI)-induced phytotoxicity in river catchment agriculture: evidence from physiological, biochemical and anatomical alterations in *Cucumis sativus* (L.) used as model species. **Chemistry and Ecology**, v. 32, n; 1, p. 12-33, 2016.

WU, X. et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8244-8259, 2016.

XU, Q. et al. Physiological aspects of compatibility and incompatibility in grafted cucumber seedlings. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 140, n. 4, p. 299-307, 2015.

Metais pesados (cromo e zinco) influenciam o restabelecimento de vegetais pós-enxertia?

Lucas G. P. Bernardi^a; Iuri E. de Paula Ferreira^a; Dirceu Mattos Jr.^b; Daniel Baron^{a,*}

^aUniversidade Federal de São Carlos (UFSCar), Centro de Ciências da Natureza, Rod. Lauri Simões de Barros, km 12,189 Bairro Aracaçu, Cp – 64. Buri, SP, Brasil.

^bCentro de Citricultura 'Sylvio Moreira', Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Via Anhanguera, km 158 - Cascalho, Cp - 04. Cordeirópolis, SP, Brasil.

* danielbaron@ufscar.br

Resumo

Os metais pesados zinco (Zn) e cromo (Cr), são encontrados em áreas naturais ou de cultivo como contaminantes e podem acarretar prejuízos diretos na propagação vegetativa. A espécie vegetal *Cucumis sativus* L. (pepino) é cultivada a partir da técnica da enxertia e, tal manejo agrônomo, proporciona à cultura características como tolerância a estresse por metais pesados. Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito de metais pesados no restabelecimento vegetal pós-enxertia em plantas de pepino. Os tratamentos foram aplicados, via solução nutritiva, foram: controle; 30 μ M de Cr (Idem); 100 μ M de Cr; 10 μ M de Zn; 2,44mM de Zn e 30 μ M de Cr + 10 μ M de Zn. Todos os tratamentos receberam a adição da solução nutritiva nº2 'Hoagland e Arnon'. O delineamento experimental implantado foi o de distribuição inteiramente casualizada, analisado a partir de um fatorial 2x2 com dois tratamentos adicionais, totalizando 6 tratamentos com 5 repetições por tratamento. Coletamos dados de crescimento semanalmente durante 29 dias após transplante (DAT). Ao final do experimento, avaliamos as trocas gasosas, atividade enzimática de ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase em folhas e na região da enxertia, quantificação de clorofila e carotenóides foliares, e biomassa. Para identificar tendências no padrão de resposta, as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo método de Scott-Knott, ao que verificamos significância dos efeitos de tratamentos pela ANOVA. As medidas lineares de crescimento apresentaram diferença entre os tratamentos com metais pesados e o tratamento controle, todavia os aspectos avaliados de clorofila, carotenóides, trocas gasosas e enzimas antioxidantes, com exceção para a atividade da ascorbato peroxidase foliar e taxa de assimilação de carbono (A_{net}), não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. As respostas observadas nas plantas sob estresse indicaram um comportamento fisiológico adequado para o restabelecimento da enxertia com a promoção da atividade de enzimas e preservação do aparato fotossintético. De modo geral, foi possível observar que o método da enxertia promoveu a superação do estresse aos metais pesados, proporcionando o crescimento das plantas restabelecimento da conexão vascular, o que nos leva a aceitar a hipótese científica testada de que metais pesados influenciam o restabelecimento da enxertia em plantas de pepino.

Palavras-chave: Bioquímica vegetal, *Cucumis sativus* L., Efeitos Fisiológicos, Enxertia.

Introdução

Metais pesados são, geralmente, depositados no solo através de fertilizantes, defensivos e atividades industriais (Wu et al., 2016). Esses metais podem ser classificados em essenciais, como o zinco (Zn), que desempenha funções fundamentais na fisiologia do vegetal, por exemplo, no metabolismo de carboidratos, estrutura ribossômica, regulação da expressão de genes e síntese de várias enzimas (Kabata-Pendias, 2011; Samreen et al., 2017). Já o metal pesado cromo (Cr) é reportado como um elemento deletério para o metabolismo vegetal a 50 µM (Tripathi, et al. 2016) em sua forma hexavalente, devido sua grande capacidade de prejudicar os processos morfológicos e fisiológicos de crescimento vegetal (Conceição Gomes et al., 2017), como o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que ocasionam o estresse oxidativo na célula vegetal (Sinha et al., 2018).

Para contornar o estresse ocasionado pelos metais pesados em diversas culturas, a prática da enxertia é comumente utilizada, por exemplo, o pepino (*Cucumis sativus* L.) (Savvas et al., 2010; Edelstein et al., 2017), pois, algumas espécies vegetais apresentam tolerância na absorção e translocação desses elementos prejudiciais a parte aérea da planta (Colla et al., 2013; Kumar et al., 2015). A propagação por enxertia é um método que consiste na união de duas plantas vivas para o desenvolvimento de uma única composição vegetal, em que o vegetal responsável por absorver água e sais minerais é conhecido como porta-enxerto (parte 'radicular') e o vegetal responsável por realizar o processos fotossintético é conhecido como copa (parte 'aérea') (Baron et al., 2019).

De maneira geral, os vegetais possuem mecanismos de defesa que minimizam a absorção de metais contaminantes ou desintoxicação dos mesmos quando absorvidos pela planta através de enzimas como a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) (Kumar et al., 2014; Gratão et al., 2019). Em condições estressantes, a atividade dessas enzimas aumenta, a fim de desintoxicar o vegetal das EROs geradas a partir do estresse oxidativo ocasionado pelos metais pesados (Gratão et al., 2019). Essas enzimas também são fundamentais para o sucesso da enxertia e o restabelecimento da conexão vascular do vegetal, pois a incisão realizada no vegetal e necessidade de cicatrização são disparadores da produção de EROs e, com isso, é relatado maior atividade enzimática em plantas enxertadas (Xu et al., 2015).

A interação entre porta-enxerto e a copa enxertada causam alterações bioquímicas e fisiológicas nesta composição vegetal formada, uma vez que esta é dependente da raiz para a absorção e translocação de nutrientes, água e hormônios (Dos Santos et al., 2017; Al-Harbi

et al., 2018) para a parte aérea que afeta de maneira direta as trocas gasosas e o crescimento vegetal (Baron et al., 2018; Lopez-Serrano et al., 2019).

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência e interação dos metais pesados (Cr e Zn), não essenciais e essenciais, no restabelecimento de plantas enxertadas. Testamos a hipótese científica de que esses metais prejudicam o reestabelecimento pós-enxertia de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) enxertado em plantas de abóboras (*Cucurbita moschata* L.).

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal

As mudas de pepino japonês foram adquiridas de viveiro comercial de mudas localizado em Santa Cruz do Rio Pardo/SP, km 225, estado de São Paulo. As mudas de pepino (*Cucumis sativus* L.) utilizadas como enxerto pertencem a cv. 'Soldier', e o porta enxerto de abóbora (*Cucurbita moschata* L.) foi semeado com a cv. 'Potent'. A semeadura da abóbora foi realizada 4 dias antes da semeadura do pepino, a fim de se obter diâmetros de caule similares entre as duas cultivares. A técnica de enxertia foi realizada pelo método de encostia (Amaro et al., 2018) no dia 17 de janeiro de 2019, 10 dias após a semeadura do pepino e, após a realização desta, ainda durante o restabelecimento do vegetal pós-enxertia, as plantas enxertadas foram transplantadas em sacos de cultivo, com volume de 4L preenchidos com vermiculita de granulometria média, no dia 21 de janeiro de 2019 para aclimação ao ambiente experimental.

2.2 Implantação Experimental

O experimento foi instalado em cultivo protegido pertencente à área experimental do Centro de Citricultura 'Sylvio Moreira', município de Cordeirópolis/SP, situado nas coordenadas 22°27'22" S e 47°29'27" O, com altitude de 713 m, e clima do tipo *Cfa*, caracterizado como subtropical úmido sem estação seca e com temperatura média do mês mais quente maior ou igual a 22,0 °C (ROLIM et al., 2005). O cultivo protegido foi composto por estrutura metálica do tipo arco, coberta com filme plástico agrícola de polietileno transparente (PEBD, anti-UV) com 150µm, pé-direito de 3 metros, construída respeitando o sentido leste-oeste, oscilando de 0 a $1200 \pm 2 \text{ mol} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (DFFFA, densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos), no período compreendido entre 07h às 18h.

As plantas foram submetidas aclimatadas por 7 dias apenas com a aplicação da solução nutritiva de Hoagland e Arnold nº2 à 50% de F.I., com condutividade elétrica de 0,5 mS.cm⁻¹ e adotado intervalo de segurança de ± 0,1 mS.cm⁻¹ para a manutenção basal do metabolismo vegetativo. Adotamos a disponibilidade hídrica semanal média de 300 mL de solução nutritiva Hoagland & Arnon (1950) nº 2 a 50% de F.I e 100 m L de aplicação dos tratamentos com metais pesados e 400 m L de água. Tais volumes foram adotados a partir de teste de capacidade do substrato utilizado.

Após o período de aclimação das plantas jovens pós-transplante aplicamos a solução nutritiva de Hoagland e Arnold nº2 a 50% de F.I e os tratamentos com metais pesados. Quanto a aplicação dos elementos minerais cromo (Cr) e zinco (Zn), via raiz, utilizamos soluções 'stock' a partir da fonte dicromato de potássio hepta hidratado (CrK₂Cr₂O₇·7H₂O, P.M 472,2877 g.mol⁻¹) e de sulfato de zinco hepta hidratado (ZnSO₄·7H₂O P.M 287,5496 g/mol). Os tratamentos aplicados foram o controle (sem aplicação de metais pesados), 30µM de Cr, 100 µM de Cr, 10 µM de Zn, 2,44mM de Zn e 30 µM de Cr + 10 µM de Zn. Todos os tratamentos receberam a solução nutritiva 'Hoagland e Arnon' (Tabela 1).

Tabela 1. Composição nutricional basal da solução nutritiva completa nº2 de Hoagland e Arnon (1950) preparada a 50% (½) da força iônica na etapa pré-experimental e experimental de cultivo de *Cucumis Sativus* L. (pepineiro) e *Cucurbita moschata* L. (abóbora). Sais P.A. (puro para análise)⁽¹⁾

Sais P.A. ⁽¹⁾ utilizados no preparo das Soluções estoques	Solução Estoque (g.L ⁻¹)	½ (50%) de força-iônica (mmol.L ⁻¹)
NH ₄ H ₂ PO ₄ (M)	115,0	0,237
KNO ₃ (M)	101,1	1,680
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O (M)	236,1	1,948
MgSO ₄ ·7H ₂ O (M)	246,5	1,017
H ₃ BO ₃	2,86	5,899
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	3,713
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	0,454
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08	0,165
H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,02	0,041
E.D.T.A.	26,1	0,054
FeSO ₄ ·7H ₂ O	24,9	0,051

⁽¹⁾ = diluição em água destilada (1 dm³).

2.3 Trocas gasosas

Os dados de trocas gasosas e o teste de eficiência do fotossistema II (fluorescência da Clorofila a) foram coletados ao final do experimento, com 29 dias após transplante (DAT). Os dados de trocas gasosas foram coletados com o auxílio do equipamento medidor de trocas gasosas (*Infra Red Gas Analyser*, Licor®6800) e os parâmetros avaliados foram a taxa de

assimilação líquida de CO₂ (A_{net} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$); concentração interna de CO₂ na câmara subestomática (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$); eficiência do uso da água (A_{net}/E); eficiência instantânea da carboxilação da rubisco (A_{net}/C_i); eficiência intrínseca do uso da água (A_{net}/g_{sw}) e fluorescência da clorofila *a*. A intensidade de luz fixada foi de $700 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e concentração de referência de CO₂ foi delimitada na faixa de $380 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$. A câmara foi programada para manter a temperatura da folha a 30°C. Para garantir a estabilidade dos parâmetros de mensuração, a luz na câmara de fotossíntese foi estabilizada em $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com temperatura para estabilização foliar de 30°C. O valor de referência de CO₂ adotado foi de $380 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

2.4 Dimensões lineares de crescimento vegetativo

Coletamos com frequência semanal, durante os primeiros 29 dias após o transplante, características dimensionais das plantas como diâmetro de caule (mm), número de folhas unitário), altura (cm) e comprimento de planta (cm). Ao término do período de condução experimental em cultivo protegido, todas as plantas foram coletadas e separadas em caule, folhas e raiz. As folhas foram higienizadas com água destilada e detergente e, posteriormente, água destilada.

Após higienização, a área foliar total de cada planta foi mensurada no equipamento integrador de área foliar (*AreaMeter*, Licor®3100). As folhas de cada planta foram pesadas e colocadas para secagem em estufa com circulação de ar forçado a 70°C por 72 horas (XU et al., 2015).

2.5 Análise de pigmentos fotossintetizantes

O protocolo metodológico para análise de clorofila e carotenóides seguiu a metodologia proposta por Wellburn (1994). Nós coletamos 5 discos foliares de cada planta, com área circular de 28.26mm^2 cada e depositamos estes em tubos com 5 mL de dimetilsulfoxido (DMSO). Posteriormente, os tubos foram mantidos em banho-maria por 30 min a 70°C no escuro. Após o banho-maria, foram retiradas alíquotas de 3mL para análise em espectrofotômetro nas faixas de absorvância de 480, 649 e 665nm.

2.6 Enzimas antioxidantes

A folha mais jovem, completamente expandida, de cada repetição vegetal da planta foi coletada em envelopes de plástico e embaladas em folhas de alumínio e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido (N₂). O mesmo foi realizado para o caule,

especificamente para a região enxertada. As amostras foram armazenadas em *ultrafreezer* (-80°C) para posteriores análises laboratoriais.

Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado o protocolo de Bradford (1976) e, para isso, foi necessário a realização da extração do material vegetal utilizando a relação de 1g de amostra foliar vegetal para 5 ml de solução de tampão fosfato de potássio com pH ajustado a 7,5, juntamente com aproximadamente 0,462g de DTT e 4% de PVPP, para posteriormente centrifugação a 10.000 rpm por 30 min a 4°C e resgate do sobrenadante com diluição de 20 µL em 1 ml de solução de Bradford e leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

A análise da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) para análises em folha e caule foi realizada a partir do método de Giannopolitis; Ries (1977), que consiste na diluição de 1,765ml de tampão fosfato de sódio com pH ajustado a 7,8, 780 µL de metionina, 225 µL de NBT, 30 µL de EDTA, 150 µL de riboflavina e 50 µL de amostra vegetal extraída segundo descrito anteriormente. Tal diluição deve ser submetida a reação por 5 min. em câmara de luz e posterior leitura em espectrofotômetro a 560nm.

A análise da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi realizada em folhas e para o caule, com pequenas modificações na metodologia proposta por Kraus et al. (1995), monitorando a atividade da solução de 10mL de tampão fosfato (pH 7,5) acrescidas de 25 µL juntamente com 25 µL de extração vegetal durante 1 minuto em espectrofotômetro a 240nm.

Já a atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) foi efetuada apenas para a folha a partir do método desenvolvido por Nakano e Asada (1981), a partir da diluição do tampão fosfato de potássio ajustado ao pH 7,0, adicionado a 100 µL de ascorbato, 100 µL de solução estoque EDTA, 100 µL de peróxido de hidrogênio e 50 µL de extração vegetal, com leitura em espectrofotômetro a 290 nm com observação da reação por 1 minuto.

2.7 Delineamento experimental

Executamos um experimento inteiramente aleatorizado com 6 tratamentos e 6 repetições. Os tratamentos foram formulados em esquema fatorial 2x2 com dois tratamentos adicionais (Tabela 2), considerando três dosagens de Cr e Zn, incluindo-se doses zero (testemunha).

Tabela 2: Distribuição dos tratamentos e exposição da composição fatorial e tratamentos adicionais

Doses de Zn	Doses de Cr		
	0	30 μ M	100 μ M
0	X	X	X
10 μ M	X	X	
2,44 Mm	X		

O delineamento experimental adotado foi o de distribuição inteiramente casualizada, composto por uma estrutura de tratamentos complexa, impossibilitando análises convencionais como ANOVA two-way e comparações múltiplas pelo teste de Tukey. A fim de facilitar as análises estatísticas e inferências, podemos considerá-lo como um delineamento fatorial 2x2, com tratamentos de baixas doses de Cr e Zn considerados como fatores, com dois tratamentos adicionais (Marini, 2000; Piepho et al. 2006). Neste caso, o desdobramento dos efeitos principais e interações pode ser conduzido a partir da construção de contrastes ortogonais.

Os dados foram analisados a partir da análise de variância (ANOVA) para modelos lineares clássicos (Gauss-Markov), considerando-se a decomposição da soma de quadrado de tratamentos em contrastes ortogonais (Corrente et al. 2010). Os tratamentos e contrastes ortogonais escolhidos para análise são dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamentos em função das doses de Zn e Cr e contrastes ortogonais definidos para a análise dos dados da espécie copa *Cucumis Sativus* L. (pepineiro) enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora).

Tratamentos	Z n	Cr	Contrastes Ortogonais*				
			Linear Zn	Linear Cr	Zn x Cr	Fatorial x Adicional	AD1 x AD2
Controle	0	0	-1	-1	+1	+1	0
30 μ M Cr	0	1	-1	+1	-1	+1	0
10 μ M Zn	1	0	+1	-1	-1	+1	0
30 μ M Cr / 10 μ M Zn	1	1	+1	+1	+1	+1	0
100 μ M de Cr	2	0	0	0	0	-2	-1
2,44 mM de Zn	0	2	0	0	0	-2	+1

* Linear Zn – efeito principal do Zn no fatorial 2x2; Linear Cr - efeito principal do Cr no fatorial 2x2; Zn x Cr – interação entre Zn e Cr no fatorial 2x2; Fatorial x Adicional – comparação entre os tratamentos fatoriais e adicionais; AD1 x AD2 – comparação entre os tratamentos adicionais (2,44 mM de Zn e 100 μ M de Cr)

Os contrastes ortogonais foram escolhidos de maneira a fornecer uma análise completa do fatorial 2x2, com doses nulas e moderadas de Zn e Cr, além de interferência por excessos de Cr e Zn (tratamentos adicionais). Os dois primeiros contrastes ('Linear Zn' e 'Linear Cr') são relativos aos efeitos principais de Cr e Zn no fatorial 2x2, ou seja, indicam se acréscimos das doses inferiores destes metais (doses intermediárias) diferem do controle negativo. O terceiro contraste, Zn x Cr, indica se há interação entre Cr e Zn no experimento fatorial 2x2. O quarto contraste ('Fatorial x Adicional') trata-se da comparação entre o

experimento fatorial 2x2 e os tratamentos adicionais, que apresentam doses excessivas dos metais pesados. Por fim, o quinto contraste ('Ad1 x Ad2') trata-se da comparação entre os tratamentos com excesso de Zn e Cr.

Para identificar tendências no padrão de resposta, as médias dos tratamentos foram agrupadas pelo método de Scott-Knott quando se verificou significância dos efeitos de tratamentos pela ANOVA. No caso de clorofila e carotenóides, violações quanto às pressuposições da ANOVA foram encontradas e, desta maneira, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal e Wallis para comparar os tratamentos quanto à distribuição destas variáveis (Martins & Rodrigues, 2011). As análises foram realizadas com o auxílio do *software* R (R CORE TEAM, 2019). Em todos os testes de significância considerou-se o nível de significância $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

3.1 Trocas Gasosas

A taxa de assimilação (A_{net}) apresentou efeitos significativos de tratamentos (ANOVA, $p < 0,05$; Tabela 3). Neste caso, não houve efeitos lineares de Zn e Cr, nem interação entre estes, para doses moderadas (fatorial 2x2) ($p > 0,05$). Porém, os contrastes relativos Fatorial x Adicional e Ad1 x Ad2 foram significativos ($p < 0,05$). Dessa maneira, concluímos que houve diferenças quanto à taxa de assimilação para doses excessivas de Cr e Zn comparadas às doses nulas ou moderadas (tratamentos do fatorial 2x2). Além disso, ao compararmos os excessos de Zn e Cr, observaram-se menores taxas de assimilação para as plantas com excessos de Cr, enquanto doses elevadas de Zn não diferiram dos tratamentos com doses nulas e moderadas em fatorial 2x2 (Figura 2).

Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis de doses de Cr e Zn e a taxa de assimilação de carbono (A) da espécie copa *Cucumis sativus* L. (pepineiro) enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora).

FV	GL	Assimilação (A)			
		SQ	Média Sq	F	Pr(>F)
Tratamentos	5	179,84	35,97	3,098	0,0269
Linear Zn	1	0,81	0,81	0,070	0,7939
Linear Cr	1	41,50	41,50	3,574	0,0708
Zn x Cr	1	2,65	2,65	0,228	0,6374
Fat x Ad	1	70,20	70,20	6,046	0,0215*
AD1 x AD2	1	64,68	64,68	5,571	0,0267*
Residual	24	278,67	11,61		

Graus de liberdade residual = 24. FV: Fonte de Variação. GL: Graus de Liberdade.

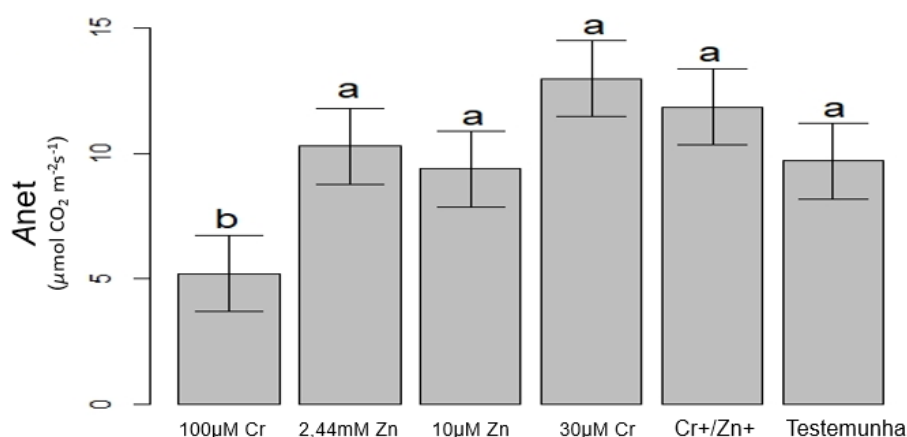


Figura 1. Taxa de assimilação (A_{net}) da espécie copa *Cucumis sativus* L. (pepineiro) cv. *Soldier* enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora) cv. *Potent* com comparações de médias pelo método de Scott-Knott com $\alpha = 0,05$.

Também foram verificados efeitos significativos de tratamentos para a eficiência instantânea de carboxilação da rubisco (A_{net}/C_i) (ANOVA, $p < 0,05$; Tabela 4). O efeito linear de Cr foi significativo ($p < 0,05$), indicando que doses moderadas de Cr aumentam o A_{net}/C_i . Porém, os contrastes Fatorial x Adicional e Ad1 x Ad2 foram significativos ($p < 0,05$). Observou-se que excessos de Cr ocasionam decréscimos na A_{net}/C_i , enquanto Zn em excesso e tratamentos do fatorial 2x2 (doses nulas e moderadas) não diferem significativamente (Figura 2, $p < 0,05$).

Tabela 4. Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis de doses de Cr e Zn e a eficiência intrínseca de carboxilação (A_{net}/C_i) da espécie copa *Cucumis sativus* L. (pepineiro) cv. *Soldier* enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora) cv. *Potent*.

FV	GL	Eficiência instantânea de carboxilação (A_{net}/C_i)				
		SQ	Média Sq	F	Pr(>F)	
Tratamentos	5	0,003187	0,0006374	5,384	0,001858	**
Linear Zn	1	0,000047	0,0000472	0,398	0,533968	
Linear Cr	1	0,000609	0,0006089	5,141	0,032650	*
Zn x Cr	1	0,000038	0,0000377	0,318	0,577974	
Fat x Ad	1	0,000827	0,0008274	6,986	0,014241	*
AD1 x AD2	1	0,001666	0,0016657	14,065	0,000988	***
Residual	24	0,002842	0,0001184			

Graus de liberdade residual = 24. FV: Fonte de Variação. GL: Graus de Liberdade. Código de significância: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

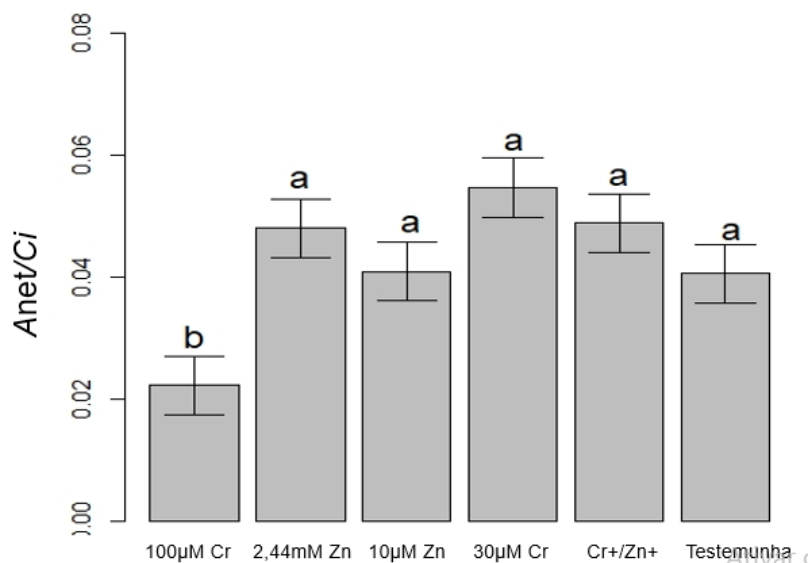


Figura 2. Eficiência instantânea de carboxilação (A_{net}/C_i) da espécie copa *Cucumis sativus* L. (pepineiro) cv. *Soldier* enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora) cv. *Potent* com comparações de médias pelo método de Scott-Knott com $\alpha = 0,05$.

3.2 Crescimento vegetal

Diferenças significativas entre tratamentos não foram encontradas para a massa de matéria seca da raiz ($p= 0,0766$), área foliar ($p= 0,0812$) e o volume de raiz ($p= 0,9602$). Quanto ao número de folhas, o resultado foi inconclusivo, pois, desvios à normalidade invalidaram a ANOVA. Por outro lado, o diâmetro de caule, a altura de planta, o comprimento do caule e a massa de matéria seca foliar foram parâmetros que apresentaram diferenças significativas com respeito aos tratamentos, com destaque aos efeitos lineares de Cr, linear Zn e efeito do tratamento adicional sob tratamentos do fatorial (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de Variância (ANOVA) para as respostas de crescimento vegetativo em função dos tratamentos em a espécie copa *Cucumis sativus* L. (pepineiro) enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora).

FV	GL	Diâmetro		Altura		Comprimento		MSF	
		F	p	F	p	F	P	F	P
Tratamentos	5	3,025*	0,0295	9,765*	<0,0001	10,492*	<0,0001	7,910*	0,0001
Linear Zn	1	6,600*	0,0168	6,298*	0,1924	6,340*	0,0189	0,001	0,9837
Linear Cr	1	2,673	0,1151	0,382	0,5422	1,165	0,2913	9,511*	0,0051
Zn x Cr	1	0,055	0,8173	1,112	0,3021	0,129	0,7222	0,040	0,8438
Fat x Ad	1	3,073	0,0924	19,630*	0,0002	22,816*	<0,0001	18,106*	0,0003
AD1 x AD2	1	2,727	0,1117	20,955*	0,0001	22,010*	<0,0001	11,892*	0,0021

Graus de liberdade residual = 24. FV: Fonte de Variação. GL: Graus de Liberdade.

No desdobramento da análise fatorial 2x2 (doses nulas e intermediárias de Zn e Cr), o efeito principal de Zn foi significativo para diâmetro, altura e comprimento das plantas (Tabela 5; $p<0,05$). Observamos que a aplicação da 10 µM de Zn ocasiona um decréscimo no diâmetro do caule, porém este tratamento proporcionou plantas com maiores valores dos variáveis

comprimentos de caule e altura de planta (Tabela 6). Em contraste, o efeito linear do Cr foi significativo para a matéria-seca foliar (Tabela 5; $p < 0,05$).

Tabela 6. Efeitos principais do fator Zn sobre as medidas lineares de crescimento da espécie copa *Cucumis Sativus* L. (pepineiro) enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora).

Níveis de Zn	Diâmetro	Altura	Comprimento
0	0,79±0,061 a	27,8±1,93 b	31,3±1,77 b
10 µM	0,74±0,061 b	34,0±1,93 a	37,0±1,77 a

* Letras diferentes indicam que o contraste “Linear Zn” foi estatisticamente significativo ao nível $\alpha = 0,05$ pelo teste F

A interpretação dos efeitos principais de Zn e Cr e a comparação das médias marginais só foram possíveis porque, para as variáveis de crescimento, não houve interação significativa entre Zn e Cr no desdobramento do fatorial 2x2 (Tabela 5; valor $p > 0,05$). As diferenças entre as médias nos tratamentos fatoriais e adicionais (contraste Fatoriais x Adicionais) foram significativas para altura de planta, comprimento de caule e matéria-seca foliar; diferenças significativas entre os tratamentos adicionais Zn e Cr também foram encontradas para as mesmas variáveis (Tabela 5; $p < 0,05$). Nestas variáveis, o tratamento com excesso de Cr (100 µM) apresentou os piores resultados, diferindo significativamente do tratamento com excesso de Zn (2,44mM) (Figura 3). O tratamento com excesso de Zn, porém, apresentou resultados compatíveis com os tratamentos considerando doses nulas ou moderadas de Zn e Cr (ou seja, do fatorial 2x2).

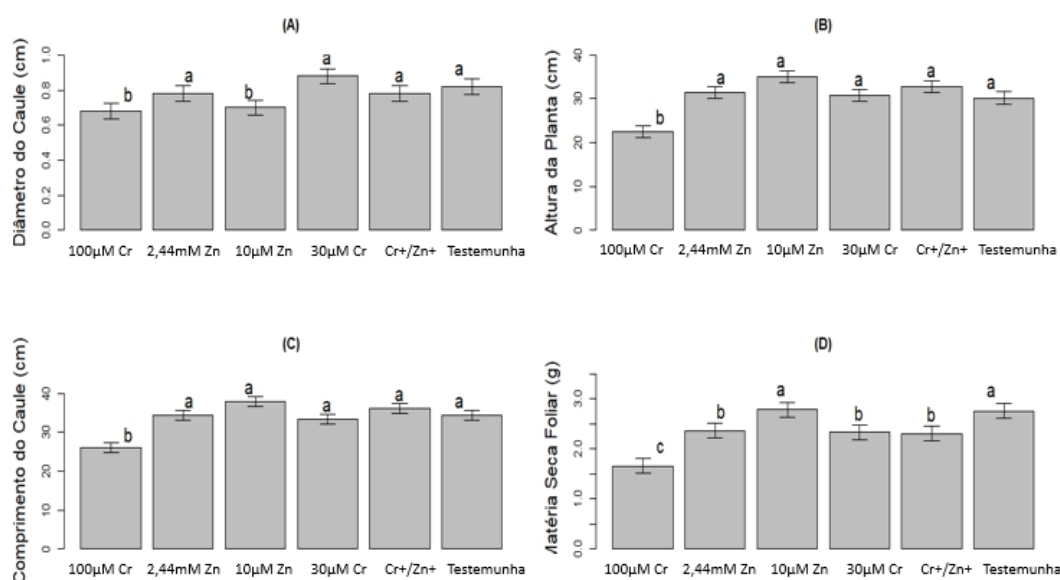


Figura 3. Diferenças entre tratamentos para análises Scott-Knott (com $\alpha = 0,05$) em parâmetros de diâmetro do caule (cm) (A), altura da planta (cm) (B), comprimento do caule (cm) (C) e matéria seca foliar (g) (D).

3.2 Carotenóides e clorofila

Os dados de carotenóides foram submetidos à análise de variância e foi constatado que não houve significância entre os tratamentos aplicados ($p > 0,05$). Para os dados de clorofila *a*, não houve normalidade dos resíduos provenientes da ANOVA ($p = 0,0028$) e para clorofila *b* o mesmo padrão encontrado ($p = 0,0299$). Através das análises estatísticas de Kurskal-Wallis, verificou-se que não houve diferenças entre tratamentos quanto à distribuição de clorofila *a* e clorofila *b* ($P < 0,05$).

As variáveis compostas a partir destes dados de quantificação, tais como clorofila *a* / *b* também não apresentaram normalidade dos resíduos provenientes da ANOVA ($p = 0,001269$). Do mesmo modo, Kurskal-Wallis, verificou-se que não houve diferenças entre tratamentos quanto à distribuição de clorofila *a/b* ($p = 0,7496$). Para a clorofila total (CLT) também não houve normalidade dos resíduos provenientes da ANOVA ($p = 0,0464$). Por Kurskal-Wallis ($p = 0,8727$), verificamos que não houve diferenças entre tratamentos quanto à distribuição de CLT. O produto de clorofila total por carotenoide não apresentou diferenças entre os tratamentos por meio da ANOVA ($p = 0,8911$).

3.3 Enzimas antioxidantes

Para a análise de atividade da enzima APX foliar, constatou-se diferenças entre os tratamentos pela ANOVA (Tabela 7). Os dados de APX foram transformados pela escala Log para garantir que as pressuposições da ANOVA (normalidade e homogeneidade de variância) fossem atendidas.

Tabela 7. Análise de Variância (ANOVA) para as variáveis de doses de Cr e Zn e a atividade de ascorbato peroxidase (APX) da espécie copa *Cucumis sativus* L. (pepineiro) cv. *Soldier* enxertada na espécie porta-enxerto *Cucurbita moschata* L. (abóbora) cv. *Potent*

FV	GL	APX Foliar			
		SQ	Média Sq	F	Pr(>F)
Tratamentos	5	6,9773	1,39547	13,448*	<0,0001
Linear Zn	1	0,834	0,843	8,032*	0,00917
Linear Cr	1	4,697	4,697	45,263*	<0,0001
Zn x Cr	1	0,263	0,263	2,534	0,12452
Fat x Ad	1	0,841	0,841	8,109*	0,00889
AD1 x AD2	1	0,343	0,343	3,301	0,08175
Residual	24	2,490	0,104		

Graus de liberdade residual = 24. FV: Fonte de Variação. GL: Graus de Liberdade. SQ: Soma dos quadrados

O gráfico com atividade da enzima APX na parte foliar está representado na figura 4.

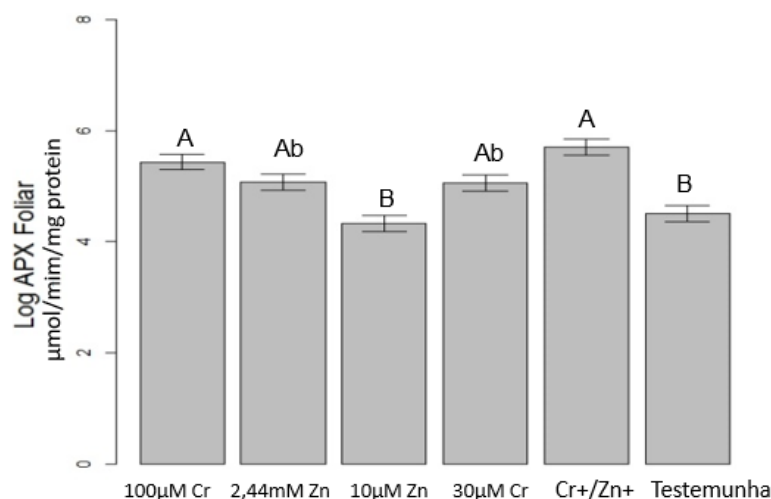


Figura 4. Médias e erro padrão da atividade de APX entre tratamentos com aplicação de Cr, Zn, interação das doses baixas dos metais (30 μM Cr+/10 μM Zn+) e testemunha. Comparações pelo método de Scott-Knott considerando-se o nível de 5% de significância.

A atividade da enzima CAT e quantificação de SOD nas folhas não foram influenciadas por efeitos de tratamentos (ANOVA, $p > 0,05$).

4. Discussão

De maneira geral, as plantas superaram o estresse induzido pelos metais pesados, com alterações fisiológicas acentuadas, como a atividade da enzima APX e interferência nas trocas gasosas em tratamentos que receberam elevadas doses dos elementos Cr e Zn. Aspectos de crescimento foram influenciados por aplicações de Cr em doses baixas e excessivas. Por outro lado, o Zn, aplicado em baixa concentração, favoreceu um maior crescimento da planta e menores alterações metabólicas.

De acordo com Dhir et al., (2009) o Cr é nocivo ao Ciclo de Calvin/Benson, em específico a enzima ribulose-1,5-bifosfato (RubisCO) pois, devido às alterações ocasionadas pelo estresse oxidativo, sobretudo a mudança de pH da planta, influencia na atividade catalítica da RubisCO, o que remete diretamente na diminuição da taxa assimilação de CO_2 (Foyer et al., 1987).

O elemento Zn é reportado como cofator da anidrase carbônica, o que resulta em maior concentração de CO_2 no cloroplasto e, conseqüentemente, melhora a capacidade de carboxilização da Rubisco (Salama et al., 2006). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas nas trocas gasosas de vegetais que recebem o tratamento com 10 μM de Zn e o controle. Constatamos que não houveram diferenças em relação aos pigmentos fotossintetizantes em plantas sob influência de metais pesados e plantas controle. A não alteração destes parâmetros pode relacionar-se a eficiência do sistema antioxidante, sobretudo a atividade de APX pois, como reporta Dhir et al., (2009) e Takami et al., (2012), o

estresse por Cr ocasiona uma maior atividade dessa enzima e, algumas espécies vegetais, não apresentam alterações em aspectos de pigmentos fotossintéticos sob exposição ao elemento Cr. Os pigmentos fotossintetizantes são influenciados pelo estresse oxidativo e produção de EROs (Farouk, Al-Amri, 2019) e a enzima APX é relatada como uma das principais enzimas responsáveis pela dismutação de H_2O_2 , regulação de crescimento, oxidação de compostos fenólicos, defesa contra patógenos, entre outras funções (Gratão et al., 2019). Em plantas enxertadas, a proteção dos pigmentos fotossintetizantes e fotossistema II é justificada pela capacidade da enxertia promover melhorias no sistema de defesa oxidativo (Yang et al., 2015) que está associada a capacidade que os porta-enxertos comerciais possuem em reter íons prejudiciais em suas raízes e a diminuição da translocação destes para as folhas (Bañuls et al., 1997; Meloni et al., 2003).

Metais pesados em excesso ocasionam elevada concentração EROs (Eleftheriou et al., 2015). Observamos de maneira geral que em plantas de pepino enxertadas em abóbora há elevada atividade da enzima APX em sua parte foliar, sobretudo em dosagens críticas de Cr ($100\mu M$) e na interação entre os metais pesados Cr e Zn. O aumento da atividade desta enzima também é reportado em estudos com plantas de pepino enxertadas, em comparação a plantas não enxertadas, sob estresse do metal cobre (Zhang et al., 2010b). Podemos destacar que, para os tratamentos em que houveram elevada produção de APX ($100\mu M$ de Cr; $30\mu M$ + $10\mu M$ de Zn; $30\mu M$ de Cr; $2,44mM$ de Zn), reportamos baixa produção de matéria seca foliar. Já os tratamentos que apresentaram maior produção de biomassa foliar (controle e $10\mu M$ de Zn), observamos baixa atividade da enzima APX. De acordo com Zhang et al., (2010a) plantas de pepino enxertadas em abóbora submetidas à estresse do metal Cu apresentaram comportamento similar quanto à produção de matéria seca da parte aérea e o estresse por este metal ocasionou diminuição das enzimas antioxidantes, com exceção da APX. Elevada atividade de enzimas antioxidantes é apontada como benéfica em plantas submetidas a estresse por metais pesados, o que remete a uma maior adaptabilidade destas plantas e eficácia no restabelecimento da conexão vascular (Zhang et al., 2010b; Xu et al., 2015).

EROs também podem ser produzidos naturalmente durante o restabelecimento da conexão vascular em plantas de pepino submetidas à técnica da enxertia devido ao corte realizado e necessidade de cicatrização (Xu et al., 2015). Durante a produção de EROs em plantas enxertadas inibe o desenvolvimento de patógenos e bactérias na região da enxertia, além de facilitar a lignificação do caule (Xu et al., 2015). Neste contexto, a fim de desintoxicar as plantas de EROs, a enzima SOD dismuta o O_2^- em diferentes organelas citoplasmáticas, tais como cloroplasto, mitocôndria e peroxissomos (Navrot et al., 2007). Portanto, uma elevada

atividade desta enzima favorece o restabelecimento da conexão vascular em plantas enxertadas (Xu et al., 2015).

A enzima CAT é a principal enzima com a função de converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 no cloroplasto, tecidos vasculares e mesófilo foliares (Gratão et al., 2019). Desta forma, a uniformidade da atividade enzimática da CAT é justificada pela necessidade desta na manutenção da conexão vascular para o sucesso da enxertia. Miao et al., (2019) comprova que a atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e peroxidase (POD) aumentam em ao longo dos dias após enxertia com diferentes técnicas de enxertia. Xu et al. (2015) reportam maior atividade dessas enzimas (SOD, CAT e APX) em plantas enxertadas em comparação a plantas não enxertadas de pepino, assim como em combinações incompatíveis, pois, segundo Aloni et al., (2008), o enxerto pode modificar o equilíbrio dinâmico de EROs nas plantas e, conseqüentemente, às enzimas (CAT, SOD, APX) por promoverem a eliminação do excesso de EROs e a cicatrização da enxertia. Dados não publicados gerados em nosso estudo indicam que o porta-enxerto de abóbora possui capacidade de acumular elevadas quantidades de Cr em sua parte radicular, com translocação do elemento para as folhas em pequenas quantidades de acordo com os níveis de metais aplicados, diferentemente do elemento Zn que é translocado mais facilmente para as folhas deste vegetal.

Constatamos que o efeito positivo do Zn aplicado a 10 μ M proporcionou maior altura e comprimento da planta (Tabela 6). Tal efeito benéfico se dá pelo papel deste metal na síntese do triptofano, precursor do hormônio auxina (AIA), que potencializa a dominância apical das plantas (Singh et al., 2010) e, conseqüentemente, melhora os aspectos de cicatrização da região enxertada (Melnyk et al., 2015). A presença do Zn em células do sistema vascular pode levar a diferenciação precoce dos elementos do xilema (Ferreira et al., 2014). Esta mudança na diferenciação celular pode favorecer o desenvolvimento de plantas sob o estresse de metais pesados (Marcondes, Garcia, 2009). Tal processo é importante devido às atividades fisiológicas necessárias para a cicatrização da enxertia reportada pela literatura em algumas importantes etapas, tais como: alinhamento do tecido do câmbio vascular entre a espécie copa e o porta-enxerto; reparo do xilema pela diferenciação do tecido do câmbio vascular através da ponte de calos; e produção do xilema e floema secundários a partir dos novos tecidos do câmbio vascular da ponte de calos (Hartmann et al., 2011). Alterações em aspectos radiculares, que prejudicariam a absorção de nutrientes e, por conseqüência, a cicatrização da enxertia, são apresentados em estudos com excesso do elemento Zn (Somavilla et al., 2018).

O Zn, quando disponibilizado em excesso, pode causar alterações fisiológicas nas plantas como a desorganização da divisão celular da raiz e inibição do alongamento celular

(Potters et al., 2007; Somavilla et al., 2018). O ápice da raiz também é prejudicado devido a alteração do transporte de zinco na planta, o que altera o transporte de AIA (Somavilla et al., 2018). As plantas cultivadas sob dosagem de 2,44 mM de Zn apresentaram menor produção de matéria seca foliar, o que corrobora com os achados científicos que reportam o efeito deletério do Zn disponibilizado em excesso, entretanto, a influência deste elemento no restabelecimento da enxertia é pouco elucidada pela literatura. O metal pesado Cr também apresenta influência no vegetal com a redução da quantidade de matéria seca e menores dimensões lineares de crescimento devido seu elevado nível de toxicidade e capacidade de produção de EROs, o que ocasiona um desbalanço no funcionamento fisiológico vegetal (Shahid et al., 2017).

5. Conclusão

Aceitamos a hipótese científica de que metais pesados influenciam o restabelecimento de plantas pós-enxertia, com o aumento da atividade da enzima APX, menor taxa de assimilação de carbono em plantas e o efeito positivo da aplicação de Zn em baixas concentrações para o crescimento da composição planta. Investigações científicas posteriores, entre estas as 'ômicas' (genômicas, proteômicas e/ou metabolômicas) poderão ser realizadas realizadas como complemento do presente estudo para maior elucidação da influência de metais pesados durante da reconexão vascular em espécies enxertadas de Cucurbitaceae sob a ação de metais pesados essenciais e não essenciais.

6. Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). L. G. Pastore-Bernardi foi bolsista FAPESP Processo no. 2018/13973-0.

7. Referências Bibliográficas

Al-Harbi, A. R.; Al-Omran, A. M.; Alharbi, K. 2018. Grafting improves cucumber water stress tolerance in Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 25, 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.025>

Aloni, B., Karni, L., Deventurero, G., Levin, Z., Cohen, R., Katzir, N., Joel, D. M., 2008. Physiological and biochemical changes at the rootstock-scion interface in graft combinations between Cucurbita rootstocks and a melon scion. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83, 777-783. <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1080/14620316.2008.11512460>.

Amaro, A. C. E., Ramos, A. R. P., Macedo, A. C., Ono, E. O., & Rodrigues, J. D. (2018). Effects of the fungicides azoxystrobin, pyraclostrobin and boscalid on the physiology of Japanese cucumber. *Scientia horticultrae*, 228, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.10.016>

- Bañuls, J., Serna, M. D., Legaz, F., Talon, M., Primo-Millo, E. 1997. Growth and gas exchange parameters of Citrus plants stressed with different salts. *Journal of Plant Physiology*, 150, 194-199. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(97\)80202-7](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80202-7)
- Baron, D., Amaro, A. C. E., Macedo, A. C., Boaro, C. S. F., & Ferreira, G. 2018. Physiological changes modulated by rootstocks in atemoya (*Annona x atemoya* Mabb.): gas exchange, growth and ion concentration. *Brazilian Journal of Botany*, 41, 219-225. <https://doi.org/10.1007/s40415-017-0421-0>
- Baron, D., Amaro, A. C. E., Pina, A., & Ferreira, G. 2019. An overview of grafting re-establishment in woody fruit species. *Scientia horticultrae*, 243, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.012>
- Bowler, C., Slooten, L., Vandenbranden, S., De Rycke, R., Botterman, J., Sybesma, C., Inzé, D., 1991. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *The EMBO journal*, 10, 1723-1732.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Colla, G., Roupheal, Y., Jawad, R., Kumar, P., Rea, E., Cardarelli, M., 2013. The effectiveness of grafting to improve NaCl and CaCl₂ tolerance in cucumber. *Scientia horticultrae*, 164, 380-391. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.023>
- Corrente, J. E., Nogueira, M. C. S., Costa, B. M., 2001. Contrastes ortogonais na análise do controle de volatilização de amônia em compostagem. *Scientia Agricola*, 58, 407-412. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000200027>
- da Conceicao Gomes, M. A., Hauser-Davis, R. A., Suzuki, M. S., & Vitoria, A. P., 2017. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.042>
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2002. Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant, Cell & Environment*, 25, 687-693. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00843.x>
- Edelstein, M.; Cohen, R.; Baumkoler, F.; Ben-Hur, M., 2017. Using grafted vegetables to increase tolerance to salt and toxic elements. *Israel Journal of Plant Sciences*, 64, 3-20. <https://doi.org/10.1080/07929978.2016.1151285>
- Eleftheriou, E., Adamakis, I. D., Panteris, E., Fatsiou, M., 2015. Chromium-induced ultrastructural changes and oxidative stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*. 16, 15852-15871. <https://doi.org/10.3390/ijms160715852>.
- Farouk, S., Al-Amri, S. M. 2019. Ameliorative roles of melatonin and/or zeolite on chromium-induced leaf senescence in marjoram plants by activating antioxidant defense, osmolyte accumulation, and ultrastructural modification. *Industrial Crops and Products*, 142, 111823. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111823>
- Ferreira, P. A. A., Brunetto, G., Giachini, A. J., Soares, C. R. F. S., 2014. Heavy metal uptake and the effect on plant growth. *Heavy Metal Remediation: Transport And Accumulation In Plants*. 127-154.
- Foyer, C. H., Furbank, R. T., Walker, D. A. 1987. Interactions between ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase and stromal metabolites. I. Modulation of enzyme activity by Benson-Calvin cycle intermediates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 894, 157-164.
- Giannopolitis, C. N., Ries, S. K., 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59, 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Gratão, P. L., Alves, L. R., & Lima, L. W. 2019., Heavy Metal Toxicity and Plant Productivity: Role of Metal Scavengers. *Plant-Metal Interactions*. 49-60. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20732-8_3.

- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies Jr, F.T.D., Geneve, R.L., 2011. Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices, eighth ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station. 347.
- Kabata-Pendias, A. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 2011.
- Kraus, T. E., McKersie, B. D., Fletcher, R. A., 1995. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology*. 145, 570-576. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81790-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81790-6).
- Kumar, M.; Sugatha, P.; Hebbar, K.B., 2014. Superoxide dismutase Isozymes and their heat stability in coconut (*Cocos nucifera* L.) leaves. *Annals of Biology*, 30, 593–597. <http://krishi.icar.gov.in/jspui/handle/123456789/2109>
- Kumar, P., Lucini, L., Roupshael, Y., Cardarelli, M., Kalunke, R. M., & Colla, G., 2015. Insight into the role of grafting and arbuscular mycorrhiza on cadmium stress tolerance in tomato. *Frontiers in plant science*. 6, 477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00477>.
- López-Serrano, L., Canet-Sanchis, G., Selak, G. V., Penella, C., San Bautista, A., López-Galarza, S., & Calatayud, Á. 2019. Pepper rootstock and scion physiological responses under drought stress. *Frontiers in plant science*, 10.
- Marcondes, J., Garcia, A. B., 2009. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Arquivos do Instituto Biológico*, 76, 187-194.
- Marini, R. P., 2003. Approaches to analyzing experiments with factorial arrangements of treatments plus other treatments. *HortScience*, 38, 117-120. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.1.117>
- Melnyk, C. W., Schuster, C., Leyser, O., Meyerowitz, E. M. 2015. A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 25, 1306-1318. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.032>
- Meloni, D. A., Oliva, M. A., Martinez, C. A., Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 69-76. [https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0098-8472\(02\)00058-8](https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1016/S0098-8472(02)00058-8)
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22, 867-880. <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J. P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129, 185-195. <https://doi-org/10.1111/j.1399-3054.2006.00777.x>
- Pandey, N., Sharma, C.P., 2003. Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environ. Exp. Bot.* 49, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00088-6).
- Piepho, H. P., Williams, E. R., Fleck, M., 2006. A note on the analysis of designed experiments with complex treatment structure. *HortScience*, 41, 446-452. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.2.446>
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., Jansen, M. A., 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble?. *Trends in plant science*, 12, 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004>
- Rolim, G.S., Camargo, M.B.P., Lania, D.G.; Moraes, J.F.L., 2005. Atualização da classificação climática de Köppen e de Thornthwaite para o Estado de São Paulo com o uso de sistema de informação geográfica. *Congresso Brasileiro De Agrometeorologia*, 14.

- Rouphael, Y., Cardarelli, M., Rea, E., Colla, G., 2008. Grafting of cucumber as a means to minimize copper toxicity. *Environmental and Experimental Botany*. 63, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.015>.
- Salama, Z. A., El-Fouly, M. M., Lazova, G., Popova, L. P. 2006. Carboxylating enzymes and carbonic anhydrase functions were suppressed by zinc deficiency in maize and chickpea plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28, 445-451. <https://doi-org/10.1007/BF02706627>
- Samreen, T., Shah, H. U., Ullah, S., Javid, M., 2017. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*). *Arabian Journal of Chemistry*. 10, 1802-1807. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.005>.
- Santos, C., Rodriguez, E. 2012. Review on some emerging endpoints of chromium (VI) and lead phytotoxicity. *Botany*, 61-82.
- Savvas, D.; Colla, G.; Rouphael, Y.; Schwarz, D., 2010. Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. *Scientia horticulturae*, 127,156-161. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.09.011>
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., Rashid, M. I., 2017. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178, 513-533. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.074>
- Singh, D. K., Ghosh, S. K., Paul, P. K., Suresh, C. P., 2010. Effect of different micronutrients on growth, yield and quality of papaya (*Carica papaya* L.) cv. Ranchi. *Acta horticulturae*, 351-356. http://www.actahort.org/.../851_53.htm
- Sinha, V., Pakshirajan, K., & Chaturvedi, R., 2018. Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. *Journal of Environmental Management*. 206, 715-730. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.033>.
- Somavilla, L. M., Simão, D. G., Tiecher, T. L., Hammerschmitt, R. K., de Oliveira, J. M. S., Mayer, N. A., Brunetto, G., 2018. Structural changes in roots of peach rootstock cultivars grown in soil with high zinc content. *Scientia horticulturae*. 237, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.059>.
- Takami, R., Almeida, J. V., Vardaris, C. V., Colepicolo, P., Barros, M. P. 2012. The interplay between thiol-compounds against chromium (VI) in the freshwater green alga *Monoraphidium convolutum*: toxicology, photosynthesis, and oxidative stress at a glance. *Aquatic toxicology*, 118, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.03.018>
- Tripathi, A., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Kumar, N., 2016. Chromium (VI)-induced phytotoxicity in river catchment agriculture: evidence from physiological, biochemical and anatomical alterations in *Cucumis sativus* (L.) used as model species. *Chemistry and Ecology*. 32, 12-33. <https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1080/02757540.2015.1115841> .
- Wellburn, A. R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*. 144, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2).
- Wu, X.; Cobbina, S. J.; Mao, G.; Xu, h.; Zhang, Z.; Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 8244-8259. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>
- Xu, Q., Guo, S. R., Li, H., Du, N. S., Shu, S., Sun, J., 2015. Physiological aspects of compatibility and incompatibility in grafted cucumber seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 140, 299-307. <https://doi.org/10.21273/JASHS.140.4.299>.
- Yang, Y., Yu, L., Wang, L., Guo, S. 2015. Bottle gourd rootstock-grafting promotes photosynthesis by regulating the stomata and non-stomata performances in leaves of watermelon seedlings under NaCl stress. *Journal of plant physiology*, 186, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.013>

Zhang, Z. K., Hua, L. I., Yu, Z. H. A. G., Huang, Z. J., Kun, C. H. E. N., Liu, S. Q., 2010a. Grafting enhances copper tolerance of cucumber through regulating nutrient uptake and antioxidative system. *Agricultural Sciences in China*, 9, 1758-1770. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60274-1](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60274-1)

Zhang, Z. K., Liu, S. Q., Hao, S. Q., Liu, S. H., 2010b. Grafting increases the copper tolerance of cucumber seedlings by improvement of polyamine contents and enhancement of antioxidant enzymes activity. *Agricultural Sciences in China*. 9, 985-994. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60181-4](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60181-4).