

THAMILA MENEZES GUERRA

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE *Vigna*
unguiculata L. WALP. EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL EM DIFERENTES FASES
FENOLÓGICAS

Serra Talhada-PE

2023

**G
U
E
R
R
A

T
M

R
E
S
P
O
S
T
A
S

M
O
R
F
O
F
I
S
I
O
L
Ó
G
I
C
A
S

·
·
·

2
0
2
3**

THAMILA MENEZES GUERRA

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE *Vigna unguiculata* L. WALP. EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima

Coorientador: Rogério de Aquino Saraiva

Serra Talhada-PE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G934r

Guerra, Thamila

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE *Vigna unguiculata* L. WALP.
EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS / Thamila Guerra. - 2023.
81 f. : il.

Orientador: Andre Luiz Alves de Lima.
Coorientador: Rogerio de Aquino Saraiva.
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal
, Serra Talhada, 2023.

1. Antioxidante. 2. Estresse oxidativo. 3. Feijão-caupi. 4. Mecanismo de toxidez. 5. Metais tóxicos. I. Lima, Andre
Luiz Alves de, orient. II. Saraiva, Rogerio de Aquino, coorient. III. Título

CDD 581.15

THAMILA MENEZES GUERRA

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS DE *Vigna unguiculata* L. WALP. EXPOSTAS A SULFATO DE NÍQUEL EM DIFERENTES FASES FENOLÓGICAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal.

APROVADO em 27/02/2023.

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 ANDRE LUIZ ALVES DE LIMA
Data: 13/04/2023 14:11:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. André Luiz Alves de Lima – UAST/UFRPE

Orientador

Documento assinado digitalmente
 ROGERIO DE AQUINO SARAIVA
Data: 13/04/2023 22:03:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva – UAST/UFRPE

Coorientador

Documento assinado digitalmente
 SERGIO LUIZ FERREIRA DA SILVA
Data: 13/04/2023 18:49:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva – UAST/UFRPE

Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 RAMOM RACHIDE NUNES
Data: 13/04/2023 18:18:34-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Ramom Rachide Nunes – UAST/UFRPE

Examinador Externo

À minha mãe, Maria Aparecida, ao meu pai George, às minhas irmãs Gisele e Lohany por todo apoio, compreensão e amor incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido forças para enfrentar todos os obstáculos que surgiram durante toda minha caminhada e por me mostrar que a persistência pode trazer bons frutos. Sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Maria Aparecida Menezes Guerra e George Alves Guerra, pelos sacrifícios e batalhas que enfrentamos juntos em prol de uma melhor qualidade de vida não só para mim, mas também para minhas irmãs. E a toda minha família que sempre esteve presente.

Ao meu amor, João Pedro, por todo apoio durante toda condução da minha pesquisa e por estar sempre ao meu lado me incentivado. Você foi meu braço direito e sem você tudo teria sido mais difícil. Eu tenho muita sorte de ter uma pessoa tão especial ao meu lado. Amo você!

Ao meu orientador, André Luiz Alves de Lima, pela oportunidade, por acreditar em mim, por todos os ensinamentos, por sua responsabilidade, por todas as orientações e por toda a paciência. És um grande profissional e ser humano.

Ao meu coorientador, Rogério de Aquino Saraiva, por todo o apoio no desenvolvimento do tema da pesquisa. Sou muito grata por seus ensinamentos e tenho muita admiração pelo profissional que és.

Ao NEFP (Núcleo de Estudos em Fisiologia Pós-colheita de Frutas, Hortaliças e Flores), em nome do professor Adriano do Nascimento Simões, pela disponibilidade dos materiais que garantiram o desenvolvimento da pesquisa.

À amiga que o mestrado me deu, Lady Daiane, pela parceria firmada entre a gente e pela troca de conhecimentos para execução de toda parte laboratorial. Você foi fundamental nesse processo.

Aos amigos, Amanda, Marcos, Mayara e Nilo, por toda ajuda durante a condução do experimento.

À Fred Louredo, por todo apoio no campo, paciência e troca de conhecimento durante a condução das análises.

À todos colegas que a turma do mestrado de 2021.1 me deu e que tornaram os dias mais descontraídos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE-UAST), por ser uma instituição pública renomada, que proporcionar educação de

qualidade a todos grupos sociais, formando profissionais, pesquisadores e cidadãos competentes e críticos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PGPV), pela oportunidade de realização do meu tão sonhado mestrado, indispensável na minha formação profissional, pela disponibilidade de toda infraestrutura e por todo apoio a pesquisa científica, fundamental para o desenvolvimento de toda sociedade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa.

“A vida não é fácil para nenhum de nós, mas isso não importa. O que importa é preservar e, acima de tudo, ter confiança de si mesmo. É preciso sentir confiança para fazer algo e alcançar os objetivos, custe o que custar”.

(Marie Curie)

RESUMO

O aumento de atividades antropogênicas têm contribuído para elevação de metais tóxicos, como o níquel (Ni), em níveis indesejáveis nos agroecossistemas. O Ni é considerado um micronutriente essencial para o desenvolvimento e crescimento das plantas, contudo, em altas concentrações pode causar efeitos tóxicos, podendo provocar a bioacumulação e biomagnificação em toda cadeia alimentar. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de defesa de plantas cultivadas ao estresse ocasionado pelo Ni, associando os parâmetros fisiológicos, morfológicos e bioquímicos, sendo essa uma estratégia biotecnológica de grande utilidade para manter a saúde, o crescimento e a produção da cultura. Diante disso, o presente estudo avaliou alterações induzidas por diferentes doses de sulfato de níquel (NiSO₄) nas características bioquímicas e morfofisiológicas em plantas de feijão-caupi (BRS Guariba). O experimento foi conduzido na UFRPE-UAST, em casa de vegetação. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2, com quatro níveis de Ni²⁺ (0, 0,5, 1,5 e 2,0 mM) e dois tempo de aplicação: T1- aplicação desde a semeadura (DAS-0) e T2 – aplicação 10 dias após a semeadura (DAS-10), com 5 repetições, durante 30 dias. Foram realizadas medidas biométricas e de biomassa, massa seca dos nódulos, potencial hídrico foliar (Ψ_w), fluorescência da clorofila *a*, teores de pigmentos fotossintéticos, grau de peroxidação lipídica (TBARS), dano de membrana (DM), conteúdo de H₂O₂, conteúdo de carboidratos solúveis (TSC), bem como a capacidade antioxidante estimada pela atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) e a não enzimática, medida por meio do conteúdo de ácido ascórbico (AA), compostos fenólicos (TPC), captura do radical DPPH e poder redutor do ferro (FRAP). A condutância estomática (*gs*) foi verificada no início, meio e final do experimento. Os resultados demonstram que o NiSO₄ inibiu o desenvolvimento das plantas de feijão-caupi, principalmente, pela diminuição das características analisadas da parte aérea. O conteúdo de pigmentos fotossintéticos foi alterado de formas distintas: pela inibição da biossíntese da Chl_a e acúmulo da Chl_b e carotenoides. O estresse oxidativo foi identificado pelo acúmulo do H₂O₂, com maior intensidade no cenário DAS-0, cerca de 173% maior em 2mM e pelos altos índices de peroxidação lipídica (TBARS), cerca de 75% maior na mesma concentração, quando comparado ao controle. O Ψ_w e a *gs* sofreram reduções com aumento das doses de Ni. O teor de TSC aumentou mais 80% no cenário DAS-0 em 2mM, comparando-o ao controle. As atividades de CAT e APX foram aumentadas com as crescentes doses de NiSO₄, bem como o sistema de defesa antioxidante não enzimático (TPC, DPPH, FRAP e AA). A análise de PCA sugere que o cenário DAS-0 foi mais afetada que a DAS-10, indicando que a fase de desenvolvimento e transplântio devem ser consideradas ao se realizar a implantação em solos contaminados com Ni. Conclusivamente, os resultados aqui obtidos indicam, consistentemente, o efeito da toxidez induzida pela níquel sobre os parâmetros morfofisiológicos e bioquímicos de forma integrada.

Palavras-chave: Antioxidante; Estresse oxidativo; Feijão-caupi; Mecanismo de toxidez; Metais tóxicos.

ABSTRACT

The increase in anthropogenic activities has contributed to the rise of toxic metals, such as nickel (Ni), at undesirable levels in agroecosystems. Ni is considered an essential micronutrient for the development and growth of plants, however, in high concentrations it can cause toxic effects, which can lead to bioaccumulation and biomagnification throughout the food chain. However, little is known about the defense mechanisms of cultivated plants to the stress caused by Ni, associating the physiological, morphological and biochemical parameters, which is a very useful biotechnological strategy to maintain the health, growth and production of the crop. Therefore, this study evaluated alterations induced by different doses of nickel sulfate (NiSO₄) in the biochemical and morphophysiological characteristics of cowpea plants (BRS Guariba). The experiment was conducted at UFRPE-UAST, in a greenhouse. A completely randomized design (DIC) was adopted in a 4x2 factorial scheme, with four levels of Ni²⁺ (0, 0,5, 1,5 and 2,0 mM) and two application times: T1- application from sowing (DAS- 0) and T2 – application 10 days after sowing (DAS-10), with 5 replications, for 30 days. Biometric and biomass measurements, nodule dry mass, leaf water potential (Ψ_w), chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments, degree of lipid peroxidation (TBARS), membrane damage (DM), H₂O₂ content, of soluble carbohydrates (TSC), as well as the antioxidant capacity estimated by the activity of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) and the non-enzymatic one, measured through the content of ascorbic acid (AA), phenolic compounds (TPC), capture of the DPPH radical and iron reducing power (FRAP). The stomatal conductance (gs) was verified at the beginning, middle and end of the experiment. The results show that NiSO₄ inhibited the development of cowpea plants, mainly due to the decrease in the analyzed characteristics of the aerial part. The content of photosynthetic pigments was altered in different ways: by inhibition of Chla biosynthesis and accumulation of Chlb and carotenoids. Oxidative stress was identified by the accumulation of H₂O₂, with greater intensity in the DAS-0 scenario, about 173% higher in 2mM and by the high lipid peroxidation index (TBARS), about 75% higher in the same concentration, when compared to the control. The Ψ_w and gs were reduced with increasing doses of Ni. TSC content increased by a further 80% in the DAS-0 scenario at 2mM compared to the control. CAT and APX activities were increased with increasing doses of NiSO₄, as well as the non-enzymatic antioxidant defense system (TPC, DPPH, FRAP and AA). The PCA analysis suggests that the DAS-0 scenario was more affected than the DAS-10 scenario, indicating that the development and transplanting phase must be considered when implanting in soils contaminated with Ni. Conclusively, the results obtained here consistently indicate the effect of nickel-induced toxicity on morphophysiological and biochemical parameters in an integrated manner.

Keywords: Antioxidant; Cowpea; Mechanism of toxicity; Toxic metals; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de localização da área de estudo situada na Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UAST), município de Serra Talhada, PE. a) Visão aérea da estufa agrícola utilizada no estudo localizada na UAST-UFRPE. b) Estufa agrícola. Fonte: A autora 34
- Figura 2.** Condições ambientais e disponibilidade hídrica via irrigação durante o período experimental de maio a junho de 2022 para a casa de vegetação localizada na UFRPE-UAST 37
- Figura 3.** Design experimental da área de estudo em casa de vegetação. Fonte: A autora 46
- Figura 4.** Efeito dos tratamentos induzidos por concentrações crescentes de NiSO₄ (0 – Controle, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM) na altura da planta (A e B), espessura do caule (C e D), largura da planta (E e G) e área foliar específica (G) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Quando há efeito de interação, as letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os dois tempos de aplicação dos tratamentos 47
- Figura 5.** Aspecto visual de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação..... 48
- Figura 6.** Aspecto visual dos folíolos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em plantas submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM), desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação 49
- Figura 7.** Aspecto visual dos raízes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em plantas submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação..... 51
- Figura 8.** Aspecto visual dos nódulos encontrados no sistema de radicular de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação. Exemplo de nódulos identificados no sistema radicular (C). Efeito dos tratamentos induzidos por concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) na massa

seca dos nódulos. As barras representam o desvio padrão das médias (n=5). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os dois tempos de aplicação dos tratamentos..... 52

Figura 9. Relação da condutância estomática (gs) e temperatura média da folha com a temperatura e umidade média do ambiente no dia de análise, para as plantas submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise..... 53

Figura 10. Potencial hídrico (Ψ_w) em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise 54

Figura 11. Curva de indução de parâmetros fotoquímicos em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) apresentando os parâmetros de eficiência quântica efetiva do fotossistema II do cenário DAS-0 (A) e DAS-10 (B) , quenching fotoquímico do cenário DAS-0 (C) e DAS-10 (D), quenching não fotoquímico do cenário DAS-0 (E) e DAS-10 (F) e taxa de transporte de elétrons do cenário DAS-0 (G) e DAS-10 (H) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condição de casa de vegetação..... 55

Figura 12. Efeito dos tratamentos induzidos por sulfato de níquel (NiSO₄) nos níveis dos pigmentos fotossintéticos: clorofila a (A) e (B), clorofila b (C) e (D), clorofilas totais (E) e (F) e carotenoide (G) em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise..... 58

Figura 13. Dano de membrana quantificado pelo extravasamento de eletrólitos (A e B) e peroxidação lipídica (C), produção de espécies reativas de oxigênio determinada pelo conteúdo de peróxido de hidrogênio (D) e conteúdo de

carboidratos solúveis totais em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise..... 60

Figura 14. Atividade antioxidante quantificada por meio do teor de compostos fenólicos totais (A) e (B), ácido ascórbico (C), atividade sequestradora de (D) DPPH (%) e (E) FRAP em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise..... 62

Figura 15. Atividade antioxidante das enzimas CAT (A), APX (B) e teor de proteínas solúveis totais (C) em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise..... 63

Figura 16. Análise de componentes principais (PCA) entre os parâmetros de crescimento da planta: comprimento (Length), largura (Width) e espessura do caule (EC); área foliar específica (SLA); massa fresca da folha (FW-leaves), caule (FW-stem) e raiz (FW-root), massa seca da folha (DW-leaves), caule (DW- stem) e raiz (DW- root), teor de matéria seca das folhas (TMS-leaves), caule (TMS-stem), raiz (TMS-root) e massa seca dos nódulos (DW-nodules. Parâmetros fotoquímicos inicial (Fo), máximo (Fm) e variável (Fv) de fluorescência; rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm); rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/Fm'$); quenching fotoquímico (qP); quenching não fotoquímico (NPQ); taxa relativa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Condutância estomática (gs); potencial hídrico foliar (Ψ_w); teor de clorofila (Chla), (Chlb) e (Chltotal) e carotenoides (Car); teor de carboidratos solúveis (TSC), ácido ascórbico (AA), compostos fenólicos totais (TPC), conteúdo de H₂O₂; peroxidação lipídica (TBARS) e índice de dano de membrana (IDM). Capacidade antioxidante não enzimática (FRAP) e (DPPH); Capacidade antioxidante enzimática (CAT) e (APX); conteúdo de proteínas solúveis totais (TPS)..... 65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Níveis de toxicidade de níquel e efeitos nas atividades fisiológicas e/ou bioquímicas de várias culturas. As concentrações usadas nos respectivos estudos foram convertidas, quando necessárias, para o padrão de micromolar (mM), conforme os dados fornecidos pelos autores, para uma melhor compreensão durante a leitura **26**
- Tabela 2.** Códigos e descrição dos tratamentos, fase de desenvolvimento do feijão-caupi e datas em que foram realizadas as aplicações..... **35**
- Tabela 3.** Rendimento de matéria fresca e seca e teor de matéria seca em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tratadas com concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (DAS 0) e dez dias após a semeadura (DAS-10) **50**
- Tabela 4.** Parâmetros fotoquímicos de fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm), variável (Fv) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM– Controle, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM) **57**

SÚMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 <i>Contaminação ambiental por metais</i>	21
2.2 <i>Influência dos metais tóxicos na germinação e estabelecimentos das plântulas</i>	22
2.3 <i>Níquel (Ni) no meio ambiente</i>	23
2.4 <i>Essencialidade do níquel nas plantas</i>	24
2.5 <i>Toxicidade do níquel nas plantas</i>	25
2.6 <i>Mecanismo de defesa das plantas em resposta ao estresse por metais tóxicos</i>	29
2.7 <i>Feijão-caupi: Vigna unguiculata (L.) Walp. (Fabaceae)</i>	30
3. HIPÓTESE	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 <i>Objetivo Geral</i>	33
4.2 <i>Objetivos Específicos</i>	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 <i>Área de estudo</i>	34
5.2 <i>Material vegetal e condução dos tratamentos</i>	35
5.3 <i>Manejo de irrigação</i>	36
5.4 <i>Parâmetros morfológicos</i>	37
5.4.1 <i>Morfometria e biomassa das frações da planta e nódulos</i>	37
5.4.2 <i>Área foliar específica</i>	38
5.5 <i>Parâmetros fisiológicos</i>	38
5.5.1 <i>Condutância estomática</i>	38
5.5.2 <i>Fluorescência da clorofila</i>	38
5.5.3 <i>Potencial hídrico foliar</i>	39
5.5.4 <i>Dano de membrana</i>	39
5.6 <i>Parâmetros bioquímicos</i>	40
5.6.1 <i>Conteúdo de clorofilas a, b, totais e carotenoides</i>	40
5.6.2 <i>Peroxidação lipídica</i>	41
5.6.3 <i>Conteúdo de peróxido de hidrogênio</i>	41
5.6.4 <i>Preparo do extrato metanólico para o ensaio da atividade antioxidante do radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder do redutor do ferro (FRAP), conteúdo de compostos fenólicos e ácido ascórbico</i>	41
5.6.5 <i>Ensaio de eliminação de radicais 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)</i>	42

5.6.6	<i>Determinação da capacidade antioxidante pelo poder redutor do ferro (FRAP) ..</i>	42
5.6.7	<i>Quantificação de compostos fenólicos totais (TPC)</i>	43
5.6.8	<i>Quantificação de ácido ascórbico (AA) pelo ensaio de Folin–Ciocalteu.....</i>	43
5.6.9	<i>Carboidratos solúveis totais (TSC)</i>	43
5.6.10	<i>Preparo do extrato enzimático</i>	44
5.6.11	<i>Determinação de proteínas solúveis totais (TSP)</i>	44
5.6.12	<i>Ensaio da atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX).....</i>	44
5.7	<i>Delineamento estatístico e análise dos dado</i>	45
6.	RESULTADOS	47
6.1	<i>Desenvolvimento, área foliar específica, biomassa, nodulação e sintomas visuais de toxicidade em plantas de feijão-caupi sob efeito de sulfato de níquel</i>	47
6.2	<i>Condutância estomática, potencial hídrico e parâmetros fotoquímicos de plantas de feijão-caupi sob efeito de sulfato de níquel</i>	52
6.3	<i>Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas de feijão-caupi</i>	57
6.4	<i>Dano de membrana (DM), peroxidação lipídica (TBARS), conteúdo de H₂O₂ e carboidratos solúveis totais (TSC)</i>	58
6.5	<i>Conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC), ácido ascórbico (AA), captura do radical DPPH e poder de redução do ferro (FRAP).....</i>	60
6.6	<i>Atividade antioxidante enzimática e conteúdo de proteínas solúveis totais (TPS)</i>	62
6.7	<i>Associação das variáveis com a análise de componentes principais (PCA)</i>	64
7.	DISCUSSÃO	66
8.	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Um aumento considerável de ações antropogênicas (como atividades de mineração, uso inadequado de pesticidas, fertilizantes e rejeitos de indústrias) tem contribuindo de forma brusca para a poluição do meio ambiental, sendo parte dessa poluição atribuída a disponibilidade de grandes quantidades de metais tóxicos para o ecossistema, podendo assim afetar a fertilidade de solos, a produtividade de culturas e, conseqüentemente, a bioacumulação desses metais em plantas (FAO and UNEP, 2021). O elemento químico níquel (Ni) é considerado um dos 23 poluentes metálicos que vem ameaçando severamente os sistemas agroecológicos e a saúde humana (KUMAR et al., 2021). Devido ao seu duplo efeito na biota terrestre, de essencialidade e toxicidade, o Ni (II) tem sido interesse de muitas pesquisas (HASSAN, et al., 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos associados às características fisiológicas e morfológicas das plantas responsivas à exposição por esse metal tóxico (FABIANO et al., 2015; HASSAN, et al., 2019; KUMAR et al., 2021).

Do ponto de vista biológico, o Ni é considerado essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, uma vez que ele atua como cofator de enzimas muito importantes para o metabolismo vegetal (KUMAR et al., 2021). Sua deficiência, além de inibir o crescimento vegetativo, também contribui para um aumento na taxa de senescência, bem como provoca alterações no metabolismo do nitrogênio e absorção do ferro (WOOD et al., 2006). Além disso, pode causar clorose nas folhas e induzir necrose em regiões meristemáticas, diminuição da atividade da enzima urease (KÜPPER et al., 2007), reduz a atividade da enzima desidrogenase, o desenvolvimento do endosperma, o crescimento do embrião e da raiz e a produção de sementes (TABATABAEI et al., 2009).

Segundo Yusuf et al. (2010), o nível de alerta de toxicidade do Ni é de mais de 10 mg/kg de massa seca (MS) em espécies sensíveis, > 50 mg/kg de MS em espécies moderadamente tolerantes e > 1.000 mg/kg de MS em plantas hiperacumuladoras de Ni. Em geral, o limite de Ni considerado seguro para as plantas é de aproximadamente 1,5 mg/kg e no solo de 75-150 mg/kg (KUMAR et al., 2021). No Brasil, por exemplo, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (2009) orienta que o limite permitido de Ni em solos agrícolas seja de aproximadamente 70 mg kg⁻¹.

O nível de toxicidade de níquel nas plantas acaba acarretando uma cadeia de reações deletérias em importantes vias metabólicas (SHAHZAD et al., 2018). As principais causas são

33 danos associados a inibição da síntese de pigmentos fotossintéticos, que alteram a taxa de trocas
34 gasosas, redução da condutância estomática, taxa de transpiração e eficiência do uso da água,
35 perturbação do transporte de elétrons durante as reações luminosas no fotossistema II, bem
36 como a perturbação do metabolismo oxidativo, o que acaba contribuindo para a mortalidade
37 das plantas ou biomagnificação a longo prazo, e conseqüentemente, diminuído a produtividade
38 das culturas (SHAHID et al., 2017). Diante disso, as estratégias assumidas pelas plantas para
39 minimizar esse estresse são a ativação de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD),
40 catalase (CAT), e ascorbato peroxidase (APX) e antioxidantes não enzimáticos para eliminar
41 as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BHALERAO; SHARMA; POOJARI, 2015). Segundo
42 dados de uma revisão recente (HASSAN, et al., 2019), é importante entender os papéis
43 funcionais do Ni e seus efeitos tóxicos nas plantas, para que se possa encontrar soluções
44 acessíveis e proeminentes, a fim de minimizar a entrada de Ni no ecossistema.

45 O entendimento das respostas das plantas à toxicidade pelo níquel ainda é limitada aos
46 seus parâmetros morfofisiológicos e bioquímicos de forma isolada ou com poucas associações
47 (HASSAN et al., 2019). A exemplo disso, destacam-se estudos que investigaram apenas as
48 respostas morfológicas de crescimento e desenvolvimento (KRAMER et al., 1997; PERALTA-
49 VIDEA et al., 2004; ODJEGBA et al., 2004; KER et al., 2010; PAPAZOGLU et al., 2011;
50 PAPAZOGLU et al., 2017). São investigados também os efeitos fisiológicos, como, por
51 exemplo, associados às trocas gasosas ou eficiência fotoquímica (CHANEY et al., 2008;
52 ADHIKARI et al., 2012; WANI et al., 2013; CHEN et al., 2014; FOURATI et al., 2016;
53 FOURATI et al., 2019; KOVÁČIK et al., 2019; GE et al., 2020), bem como em relação a
54 perturbação do metabolismo oxidativo pela ativação de defesas antioxidantes (SINGH K.,
55 PANDEY S.N, 2011; THAKUR et al., 2015; ZHANG et al., 2020; AMARI et al., 2020). No
56 entanto, o conhecimento aprofundado desses parâmetros de forma conjunta e integrada é pouco
57 explorado.

58 As respostas dos estágios iniciais do ciclo da vida de plantas cultivadas em ambientes
59 contaminados com poluentes metálicos são cruciais para compreensão das várias maneiras
60 pelos quais esses metais tóxicos (como o níquel) influenciam as fases críticas no crescimento e
61 desenvolvimento das culturas, podendo assim garantir a elaboração de melhores práticas na
62 agricultura (SENEVIRATNE et al., 2019). A exemplo, um estudo realizado por Kuriakose e
63 Prasad (2008), verificou que o estresse por cádmio afeta a germinação de sementes e o
64 crescimento de plântulas de *Sorghum bicolor* (L.) alterando as atividades de enzimas

65 hidrolisantes. No entanto, há muitas lacunas informacionais relacionadas ao estudo da
66 influência de metais tóxicos na germinação de sementes e estabelecimento de plântulas
67 (SENEVIRATNE et al., 2019).

68 Tratando-se de plantas cultivadas, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é
69 considerado uma das mais importantes culturas de segurança alimentar e nutricional, sendo a
70 principal fonte de proteína para milhões de pessoas nos países em desenvolvimento (SINGH,
71 2014). É usado principalmente como cultura de grãos, no entanto, também pode ser usado como
72 forragem animal ou como abubação verde e proteção do solo (BEHURA R, et al., 2015). Um
73 dos pontos fortes do feijão-caupi é sua alta capacidade de adaptação a condições adversas,
74 incluindo ambientes quentes e secos, e solos pobres (JUNIOR et al, 2002; BOUKAR et al.,
75 2018), como a região semiárido do Brasil. Em Pernambuco, estima-se que na segunda safra do
76 ciclo 2022/2023, o estado deverá produzir mais de 30 mil toneladas de feijão-caupi (CONAB,
77 2022). Diante do que foi destacado, acredita-se que o feijão-caupi seja um promissor modelo
78 vegetal para investigação dos efeitos da toxidez induzido pelo níquel.

79 Diante do exposto, esse trabalho é fundamentado na hipótese de que o metabolismo de
80 plantas de feijão-caupi pode ser severamente danificado em seus parâmetros morfofisiológicos
81 e bioquímicos quando submetidas a concentrações elevadas de Ni, principalmente desde a
82 semeadura. Além disso, espera-se que o trasplântio, após o desenvolvimento inicial da plântula,
83 para solos contaminados possa minimizar os efeitos estressores desse metal, sendo essa uma
84 estratégia promissora para garantir a qualidade e a produção das culturas. Portanto, o objetivo
85 principal desse estudo é avaliar alterações induzidas por diferentes concentrações de sulfato de
86 níquel (NiSO₄) nas características bioquímicas e morfofisiológicas em plantas de feijão-caupi.
87 (BRS Guariba), submetidas a esse metal desde semeadura (fase V0) e após o seu
88 desenvolvimento inicial (fase V2), quando ocorre a abertura e o crescimento das folhas
89 primárias.

90
91
92
93
94

95 2. REVISÃO DE LITERATURA

96

97 2.1 Contaminação ambiental por metais

98

99 Um aumento considerável nos últimos anos das atividades industriais e agrícolas, além
100 da crescente urbanização, vem trazendo contribuições evidentes para a poluição ambiental,
101 liberando consideráveis quantidades de metais tóxicos para o ecossistema (SUHANI et al.,
102 2021). No decorrer deste último século, atividades como mineração, fundição, curtumes, uso
103 inadequado de agroquímicos (como fertilizantes, pesticidas e outros produtos químicos),
104 rejeitos de indústrias eletrônicas, como pilhas e baterias, são consideradas as principais causas
105 da liberação de grandes quantidades de metais tóxicos no meio ambiente (JACOB et al., 2018;
106 FAO and UNEP, 2021).

107 Os problemas ambientais associados a contaminação de metais tóxicos, acarretam
108 impacto em escala mundial, uma vez que, por serem compostos inorgânicos e não
109 biodegradáveis, afetam a produtividade das culturas, a fertilidade do solo e conseqüentemente
110 a fitoacumulação desses metais em plantas (BHARGAVA et al., 2012; FOURATI et al., 2019;
111 GE et al., 2020). Mundialmente, cerca de 20 milhões de hectares (que constitui 16% do total
112 arável e 19% do agroecossistema), são considerados locais de contaminação por metais tóxicos,
113 incluindo o Ni, que cobrem um total de 10 milhões de locais em todo território mundial,
114 provocando impacto negativo na economia de aproximadamente 10 bilhões de dólares por ano
115 (KUMAR et al., 2021).

116 Solos poluídos por metais tóxicos alteram sua capacidade de fornecer serviços
117 ecossistêmicos de qualidade, como a suficiência e segurança na produção de alimentos, sendo
118 considerados preocupações globais emergentes que afetam várias formas de vida, incluindo
119 plantas, animais e seres humanos pela ingestão de alimentos contaminados (SRIVASTAVA *et*
120 *al.*, 2017; FAO and UNEP, 2021).

121 Ações antropogênicas são as principais causas da incorporação desses metais tóxicos no
122 ambiente, no entanto, a lixiviação, intemperismo e outros processos geoquímicos contribuem
123 de forma natural para esse processo (CHEN, M. et al., 2015). Como exemplo, certos tipos de
124 rochas, como a serpentinita, apresentam concentrações particularmente elevadas desses
125 elementos que são altamente tóxicos para os seres vivos (concentração de Cr 2980 mg/kg e Ni
126 2000 mg/kg nas rochas serpentinitas) e, como consequência do intemperismo e de processos

127 pedogenéticos podem levar ao aumento da concentração desses metais no solo (MEUSER, H.
128 2010).

129 Dentre os contaminantes inorgânicos mais comuns destacam-se elementos como o
130 arsênio (As), cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), mercúrio (Hg), chumbo (Pb), manganês
131 (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn), que apresentam grande preocupação para as plantas, solo, meio
132 ambiente e saúde humana se estiverem presentes em concentrações e/ou formas químicas que
133 podem ser tóxicas para organismos vivos (IMTIAZ et al., 2016; FAO and UNEP, 2021). Diante
134 disso, estratégias devem ser consideradas a fim de amenizar, remover e compreender os
135 mecanismos de absorção desses metais pelas plantas, podendo assim contribuir para uma
136 sustentabilidade ambiental, bem como para a saúde humana e de outros organismos.

137

138 **2.2 Influência dos metais tóxicos na germinação e estabelecimentos das plântulas**

139

140 Uma das fases mais significativas na vida de uma planta é a germinação das sementes,
141 sendo também muito sensível às condições químicas e físicas do ambiente, deste modo, quando
142 os estágios iniciais no seu ciclo de vida (germinação das sementes e o estabelecimento das
143 plântulas) são afetados por concentrações indesejáveis de metais tóxicos, pode ocorrer
144 consequências duradoras nos níveis individuais da planta, população e comunidade
145 (MOOSAVI et al., 2012).

146 Tratando-se das sementes, mesmo que seu revestimento possa atuar como uma barreira
147 principal restringindo os efeitos nocivos dos metais tóxicos, a maioria das sementes e
148 conseqüentemente das mudas, apresentam um declínio na germinação e também em seu vigor
149 em resposta a esse agente estressor, ocasionados, por exemplo, por alterações no sistema
150 antioxidante (SRIVASTAVA et al., 2014) e na produção de reguladores de crescimento (como
151 o ácido abscísico (ABA)) (ATICI; AĞAR; BATTAL, 2005), catabolismo de proteínas
152 (KARMOUS et al., 2012), alterações proteicas (GIANAZZA et al., 2007), dano fotossintéticos
153 (SRIVASTAVA et al., 2014), entre outros, causando grande preocupação para as práticas
154 agrícolas e também florestais.

155 Segundo Seneviratne et al., (2019), há muitas lacunas informacionais relacionadas ao
156 estudo da influência de metais tóxicos na germinação de sementes e no estabelecimento de
157 plântulas, principalmente pela maioria dos estudos estarem concentrados em culturas de cereais,
158 (especialmente o arroz). Diante disso, se faz necessário a realização de pesquisas adicionais em

159 uma ampla gama de plantas, além de estudos de metais pouco estudados, como o Ni, por
160 exemplo, e dessa forma gerar subsídios para uma melhor compreensão da multiplicidade de
161 maneiras pelas quais os metais tóxicos podem influenciar as fases críticas de crescimento e
162 desenvolvimento das plantas (SRIVASTAVA et al., 2014;SENEVIRATNE et al., 2019).
163 Portanto, os efeitos de metais tóxicos desde da germinação ao desenvolvimento das culturas
164 são uma importante área de pesquisa que merece estudo extensivo a fim de garantir a ampliação
165 de melhores práticas na agricultura.

166

167 **2.3 Níquel (Ni) no meio ambiente**

168

169 O níquel é um metal de transição, de número atômico 28 e massa atômica de
170 aproximadamente 58,69 u (KUMAR et al., 2021). Naturalmente, é o vigésimo segundo (22º)
171 elemento mais abundante na crosta terrestre, compreendendo cerca de 0,008% de todo território
172 (AMARI et al., 2017). O Ni é um componente natural da água e do solo e com base na acidez
173 do solo pode existir em várias formas químicas, dentre elas pode-se citar: Ni(OH)₂, Ni₃O₄,
174 Ni₂O₃, NiO₂, HNiO₂, NiSO₄, NiHCO₃⁺ e NiCO₃ (KUMAR et al., 2021). Ele é encontrado em
175 vários estados de oxidação (variando do -1 até o +4), no entanto, o Ni ⁺² ou Ni (II), é sua forma
176 mais prevalente nos biosistemas (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002). Além disso, é
177 considerado um dos 23 poluentes metálicos que vem ameaçando de forma severa os sistemas
178 agroecológicos e a saúde humana (DUDA-CHODAK A, BASZCZYK U, 2008).

179 Os meios antropogênicos de contaminação pelo Ni (II) no ambiente estão associados a
180 efluentes industriais, galvanoplastia, aterros sanitários, atividades de mineração, lodo de esgoto
181 doméstico municipal, indústria de tintas, além de pilhas e baterias, acessórios de banheiro,
182 cabos, dispositivos de ignição e indústrias têxteis (KUMAR et al., 2021).

183 Com base na produção e reservas mundiais de minas de níquel, em 2021 o Brasil ocupou
184 a oitava (8ª) posição em produção de minas (100.000 t), ficando atrás da China (120.000 t),
185 Canadá (130.000 t), Austrália (160.000 t), Nova Caledônia (190.000 t), Rússia (250.000 t),
186 Filipinas (370.000 t) e Indonésia (1.000.000 t). Já em relação às reservas mundiais, o Brasil
187 ocupa a terceira (3ª) posição (16.000.000 t), ficando atrás da Austrália e Indonésia, ambas com
188 reservas de 21.000.000 t (USGS, 2022). As principais reservas minerais brasileiras de níquel
189 referentes ao ano base de 2019 estão localizadas nos estados de Goiás (Niquelândia e Barro
190 Alto-GO), Bahia (Itagibá-BA) e Pará (São Félix do Xingu, Parauapebas e Canaã dos Carajás-

191 PA), com produção bruta de 4.563.879, 652.639 e 245.240 toneladas, respectivamente (ANM,
192 2020).

193 As principais fontes de contaminação por processos naturais do Ni nos ecossistemas
194 terrestres são por meio do intemperismo, erosão de rochas e erupções vulcânicas (KUMAR et
195 al., 2021). Como exemplo, solos desenvolvidos a partir de rochas denominadas de
196 harzburgitos, que possuem extensão do sertão ao agreste de Pernambuco, contém altas
197 concentrações de Ni disponível, cerca de aproximadamente 85 mg kg^{-1} , sendo essa uma das
198 maiores concentrações já encontradas em solos da região semiárida do nordeste do Brasil (DA
199 SILVA et al., 2022). Estas observações demonstram preocupação ambiental e de saúde, uma vez
200 que, estão acima da diretriz regulatória para solos agrícolas no Brasil que estipulam um valor
201 recomendado de 70 mg kg^{-1} (CONAMA, 2009).

202 A elevada liberação de Ni (II) no meio ambiente gera grande preocupação devido a sua
203 deposição em solos agrícolas e águas superficiais e por esse motivo tem sido interesse de estudo
204 de cientistas das diversas áreas, tais como ambientais, fisiológicas e biológicas, uma vez que, o
205 Ni apresenta duplo efeito (essencialidade e toxicidade) na biota terrestre (HASSAN et al.,
206 2019).

207

208 **2.4 Essencialidade do níquel nas plantas**

209

210 O níquel é considerado um micronutriente essencial para o crescimento e
211 desenvolvimento das plantas, pois, atua como cofator de enzimas importantes, incluindo
212 glicoxalases, ureases, acetil-S-coenzima A-sintase, M redutase, superóxido dismutases,
213 peptídeos deformilases e algumas hidrogenases (VATANSEVER et al., 2016). Sua
214 essencialidade foi relatada a primeira vez por fazer parte do sítio ativo da enzima urease, que
215 hidrolisa a ureia nos tecidos vegetais (POLACCO, J., 1977; BROWN et al., 1987; FABIANO
216 et al., 2015). Além disso, ele exerce funções cruciais na ureólise, biogênese do metano,
217 acitogênese e metabolismo do hidrogênio, bem como na manutenção do estado redox celular,
218 tolerância e/ou defesa ao estresse e eficiência ótima do uso do nitrogênio (POLACCO et al.,
219 2013; VATANSEVER et al., 2016).

220 De acordo com González-Guerrero e colaboradores (2014), o Ni ainda pode
221 desempenhar papel importante da fixação biológica do N (nitrogênio) aumentando sua

222 eficiência, uma vez que ele está presente na enzima hidrogenase (Ni-Fe), responsável por fazer
223 a reciclagem do hidrogênio molecular (H₂), produto obrigatório da redução do nitrogênio.

224 Embora seja considerado um micronutriente essencial, na maioria das plantas o Ni é
225 necessário em concentrações relativamente baixas, cerca de 0,05- 0,10 mg/kg de matéria seca
226 (HASSAN et al., 2019). De acordo com estudos recentes apontados por Kumar, et al. (2021),
227 os sintomas conclusivos da deficiência do níquel em plantas são o embotamento das pontas
228 folhas ou folíolos, ondulação, clorose e necrose de pontas inteiras das folhas e/ou folíolos
229 (ocasionados pelo acúmulo de ureia, por exemplo), fragilidade no rebento, formato de botão
230 distorcido, diminuição da folhagem e das plantas, lâmina mal desenvolvida, redefinição e/ou
231 perda de dominância apical, redução da distância entre os internódios, sistema radicular fraco
232 com raízes fibrosas mortas e, finalmente, morte de plantas inteiras. Entretanto, apesar de sua
233 natureza essencial, em altas concentrações o Ni pode causar efeito fitotóxico, causando
234 alterações nocivas nas plantas.

235

236 **2.5 Toxicidade do níquel nas plantas**

237

238 Acima do nível ideal, metais potencialmente tóxicos podem provocar alterações negativas
239 no crescimento e desenvolvimento das plantas, o que se tornou um problema mundial (RAI et
240 al., 2021). Tratando-se do estresse ocasionado por níveis elevados de níquel, é possível observar
241 distúrbios metabólicos que levam há uma diminuição da plasticidade das paredes celulares ao
242 Ni se ligar à pectina, e, em contrapartida, um aumento das atividades das peroxidases nas paredes
243 celulares e nos espaços intracelulares, sendo as peroxidases essenciais para a ligação e
244 lignificação entre polissacarídeos, destacando-se o ácido ferúlico como agente de ligação
245 (HASSAN et al., 2019). Além disso, a inibição induzida por Ni no crescimento celular está
246 relacionada à inibição da divisão celular (KUMAR et al., 2021).

247 Inicialmente, como mostrado na tabela abaixo (Tabela 1) a toxicidade do Ni afeta a
248 germinação de sementes devido ao contato direto das sementes com o Ni, como relatado por
249 Zhang et al. (2006), reduzindo assim a absorção de água e nutrientes e, finalmente, diminuindo
250 a taxa de fotossíntese nas plantas. Consequentemente, o crescimento das plantas é
251 substancialmente reduzido (PAPAZOGLU et al., 2011; ADHIKARI et al., 2012;
252 PAPAZOGLU et al., 2017; ZHANG et al., 2020), acarretando a diminuição da parte aérea e

253 raízes das plantas (ODJEGBA et al., 2004; KER et al., 2010; SINGH K., PANDEY S.N, 2011;
254 WANI et al., 2013; SAINGER et al., 2014; KOVÁČIK et al., 2019).

255 Da mesma forma, a toxicidade do Ni nas folhas das plantas altera a concentração de
256 pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides), e essas alterações normalmente
257 causam necrose e clorose nas folhas (KRAMER et al., 1997; CHANEY et al., 2008; SINGH
258 K., PANDEY S.N, 2011; CHEN et al., 2014; FOURATI et al., 2016; IRFAN et al., 2017;
259 FOURATI et al., 2019). Além disso, o estresse originado pelo Ni provoca uma redução da
260 estabilidade da membrana e leva à perda de osmólitos e pressão de turgor (HASSAN et al.,
261 2019). Como consequência ocorre o fechamento estomático e também altera o equilíbrio entre
262 as EROs e o sistema de defesa antioxidante, que leva ao acúmulo de EROs, induzindo assim ao
263 estresse oxidativo (SHAHZAD et al., 2018). Esse excesso de espécies reativas de oxigênio
264 altera a síntese de proteínas e lipídios, atividades enzimáticas, ocasionado dano de membrana,
265 oxidação de DNA e redução da divisão celular (SINGH K., PANDEY S.N, 2011; ADHIKARI
266 et al., 2012; SAINGER et al., 2014; THAKUR et al., 2015; ZHANG et al., 2020; AMARI et
267 al., 2020).

268 Além disso, metais tóxicos como o Ni, podem causar efeitos toxicológicos na nodulação
269 e fixação de N₂ em leguminosas, pois o efeito estressor desses metais na simbiose rizóbio-
270 leguminosa está associada ao impedimento da formação de nódulos de fixação de N₂ e
271 contaminação desses metais na eliminação de cepas efetivas de *Rhizobium* do solo (WANI;
272 KHAN; ZAIDI, 2007a). Hammami et al., (2022) observaram que altas concentrações de cloreto
273 de níquel (0,6-2,4 mM) diminuíram as características nos nódulos (quantidade, diâmetro e
274 massa seca) na simbiose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Deste modo, concentrações
275 crescentes de metais tóxicos afetam de forma desfavorável tanto as rizobactérias promotoras de
276 crescimento quanto os processos biogeoquímicos mediados por elas (WANI; KHAN; ZAIDI,
277 2007b).

278 **Tabela 1.** Níveis de toxicidade de níquel e efeitos nas atividades fisiológicas e/ou bioquímicas
279 de várias culturas. As concentrações usadas nos respectivos estudos foram convertidas, quando
280 necessárias, para o padrão de micromolar (mM), conforme os dados fornecidos pelos autores,
281 para uma melhor compreensão durante a leitura.

Nível de toxicidade	Concentração convertida	Cultura	Efeitos	Referências
500 μM	0,5 mM	<i>Thlaspi goesingense</i>	Desenvolvimento de clorose entre as veias e lesões necróticas e uma	(KRAMER et al., 1997)

redução significativa na perda de água da planta.				
500 mg/L	1,7 mM	<i>Medicago sativa</i>	Concentração letal para mudas de alfafa de 16 dias de crescimento da planta.	(PERALTA-VIDEA et al., 2004)
0,3 mM	-	<i>Pistia stratiotes</i>	O alongamento da raiz foi significativamente Inibido e apresentou diminuição gradual da área foliar.	(ODJEGBA et al., 2004)
10 μ M	0,01 mM	<i>Brassica oleracea</i>	Desenvolvimento de clorose ou apresentava sintomas de manchas marrons com ondulação da borda da folha jovem.	(CHANEY et al., 2008)
200-400 mg/kg	0,4-0,8 mM	<i>Helianthus annuus L</i>	Diminuição da raiz e da massa total da planta e da razão raiz / parte aérea	(KER et al., 2010)
10 ppm	0,04 mM	<i>Pistia stratiotes L</i>	Murcha, clorose, escurecimento das pontas das raízes e raízes quebradas, além disso, o conteúdo relativo de água diminuiu. Os antioxidantes (prolina e APX) aumentaram, enquanto outros carotenoides e conteúdo de proteína e atividade da catalase foram diminuídos.	(SINGH K., PANDEY S.N., 2011)
40,5 e 61,1 mg/kg	3,86 e 7,23 mM	<i>Cynara cardunculus</i>	Redução significativa da altura da planta, número de folhas e produção de biomassa fresca e seca.	(PAPAZOGLU et al., 2011)
200 mg/kg	-	<i>Ricinus Communis L.</i>	Foi identificado sintoma de crescimento reduzido, além disso, as raízes tratadas com Ni apresentaram diminuição do número de células na região do córtex, também parecia que a região do córtex consistia em células parenquimatosas alongadas em vez de tecido parenquimatoso normal como na planta de controle.	(ADHIKARI et al., 2012)
580 mg/kg	-	<i>Lentilha var. malika</i>	Diminuiu significativamente o comprimento das raízes e brotos, bem como o conteúdo de clorofila, leghemoglobina, o conteúdo de nitrogênio, o rendimento da semente e a proteína do grão.	(WANI et al., 2013)

100 μM	0,1 mM	<i>Populus cathayana</i>	Diminuição significativa do conteúdo de pigmento e taxa fotossintética, causando prejuízo visível na estrutura da organela celular e induzindo distúrbios e desequilíbrios óbvios no conteúdo de N das plantas femininas.	(CHEN <i>et al.</i> , 2014)
8,0 mM	–	<i>Brassica juncea</i>	Afetou negativamente o comprimento da radícula, o índice de vigor de plântulas, além de diminuir significativamente a biomassa da raiz e da parte aérea medida. Induziu também níveis de prolina significativamente maiores em todas as partes da planta e aumento o conteúdo de nitrogênio total nas raízes e caules.	(SAINGER <i>et al.</i> , 2014)
400 μM	0,4 mM	<i>Brassica juncea</i>	O acúmulo de Ni aumentou os teores de Fe e K, tióis não protéicos e prolina livre, além de ocasionar um desequilíbrio redox, produzindo EROs.	(THAKUR <i>et al.</i> , 2015)
100 μM	0,1 mM	<i>Cakile maritima</i>	Prejudicou a atividade da fotossíntese, conteúdo de clorofila e fotossistema II, além de ocasionar diminuição na parte aérea e raiz da planta.	(FOURATI <i>et al.</i> , 2016)
75,4 mg/kg	157 mM	<i>Beta vulgaris L.</i>	O acúmulo de Ni inibiu o crescimento e a concentração destacada foi letal para as plantas	(PAPAZOGLU <i>et al.</i> , 2017)
1200 $\mu\text{g/L}$	0,005 mM	<i>Eichhornia crassipes</i>	Afetou a biossíntese da clorofila e, portanto, resultou em sintomas visíveis de clorose, clorose peciolar e necrose levando à decomposição da planta.	(IRFAN <i>et al.</i> , 2017)
50 μM	0,05 mM	<i>Sesuvium portulacastrum L.</i>	Induziu clorose, diminuição do conteúdo de pigmento fotossintético, deficiência de acúmulo de nutrientes e danos à membrana.	(FOURATI <i>et al.</i> , 2019)
30 μM	0,03 mM	<i>Taraxacum</i>	Depleção da biomassa da raiz, clorofilas, conteúdo de água e alguns minerais.	(KOVÁČIK <i>et al.</i> , 2019)
0,6 a 2,4 mM	–	<i>Vigna unguiculata</i>	Número de folhas significativamente afetados; crescimento da parte aérea mais afetado do que o crescimento das raízes; conteúdo de clorofila 'b' e carotenoides diminuídos;	(MUJEEB <i>et al.</i> , 2019)

aumento significativo do teor de fenóis.				
33,06 μM	0,33 mM	<i>Hydrilla verticillata</i>	Inibição do crescimento da planta e aumento do conteúdo de MDA nas hastes.	(ZHANG et al., 2020)
100 μM	0,1 mM	<i>Brassica juncea</i>	O conteúdo de MDA aumentou, o níquel também aumentou as atividades da (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX), sugerindo um maior nível de estresse oxidativo	(AMARI et al., 2020)
200 μM	0,2 mM	<i>Sedum alfredii</i>	O alto estresse de Ni aumentou a translocação raiz-rebento de Ni	(GE et al., 2020)
25 a 400 mg/kg	0,6 - 2,4 mM	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Diminuição significativa no peso seco da raiz e da parte aérea, relação parte aérea/raiz, número de vagens, conteúdo de nitrogênio nas raízes e parte aérea, número de nódulos, peso seco dos nódulos e diminuiu intensamente com o aumento da concentração de HMs no solo. Diminuiu os pigmentos da fotossíntese e o verdor da folha (SPAD). Atividades de eliminação de DPPH, POD, SOD, APX e CAT melhoradas pelo aumento da concentração	(HAMMAMI et al., 2022)

282

283 Levando em conta que um grupo muito diverso de processos morfofisiológicos e
 284 bioquímicos no metabolismo das plantas estão diretamente associados aos micronutrientes,
 285 como o níquel por exemplo, elucidar o mecanismo por trás da absorção desse elemento
 286 envolvidos nesses processos é de grande relevância para o avanço da ciência vegetal e precisam
 287 ser explorados.

288

289 **2.6 Mecanismo de defesa das plantas em resposta ao estresse por metais tóxicos**

290

291 Por serem sésseis, as plantas não possuem a capacidade de evitar o estresse abiótico
 292 simplesmente se deslocando para um ambiente mais favorável. Como alternativa, elas
 293 desenvolveram a capacidade de compensar as condições estressantes, mediante alteração dos
 294 processos fisiológicos e bioquímicos de desenvolvimento para manter o crescimento e a
 295 reprodução (YADAV et al., 2021).

296 A suscetibilidade das plantas atribuídas aos metais tóxicos acionam mecanismos
297 antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, contudo, a direção de sua resposta depende
298 internamente da espécie de planta, do metal e de sua severidade (SOLANKI et al., 2011). Esses
299 mecanismos possuem a função tanto de eliminar radicais livres formados pela presença de
300 metais tóxicos, ou atuar como quelantes (APEL; HIRT, 2004)

301 O sistema de defesa antioxidante enzimático das plantas é composto pela superóxido
302 dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX) e catalase (CAT),
303 no qual, de forma integrada, estas enzimas atuam nos diferentes compartimentos celulares,
304 favorecendo o equilíbrio entre a taxa de formação e eliminação dessas espécies reativas de
305 oxigênio, mantendo os níveis de EROs ideais para sinalização celular (APEL; HIRT, 2004). Os
306 antioxidantes não enzimáticos conhecidos são o ascorbato (AsA), glutathione (GSH),
307 carotenoides, alcaloides, tocoferóis, prolina e compostos fenólicos (flavonoides, taninos e
308 lignina), apresentam função importante no sequestro de radicais livres (GILL et al., 2010;
309 QAMER et al., 2021; SADEGHIPOUR et al., 2021).

310 A toxicidade do Ni também induz estresse oxidativo que pode ser medido como
311 malondialdeído (MDA), produto secundário da peroxidação lipídica, que ocasiona uma reação
312 em cadeia induzida por EROs, causando a degradação de fosfolipídios de membrana, com isso,
313 o MDA é um marcador essencial de dano oxidativo, utilizado para verificar o grau de injúria
314 provocado à membrana celular (SHAHZAD et al., 2018).

315 Diante das estratégias de busca realizadas para o desenvolvimento desse trabalho,
316 percebe-se uma escassez de pesquisas relacionadas aos mecanismos bioquímicos de plantas
317 associadas as suas respostas fisiológicas e morfológicas, principalmente se tratando do níquel.
318 Com base em dados de revisões recentes, a falta de informações sobre os mecanismos de
319 absorção e tolerância do níquel pelas plantas intensifica as problemáticas relacionadas ao seu
320 acúmulo no ambiente, particularmente nos solos, tornando-se perigoso para produção agrícola
321 em um futuro próximo (HASSAN et al., 2019; RAI et al., 2021). Deste modo, dados dos
322 mecanismos de adaptação das plantas ao estresse por níquel em nível morfológico, fisiológico
323 e bioquímico devem ser melhor explorados de forma conjunta e integrada.

324

325 **2.7 Feijão-caupi: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae)**

326

327 O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers), é uma cultura herbácea anual cultivada
328 principalmente nos sistemas agroecológicos de clima seco como os dos trópicos da América
329 Latina, África e sul da Ásia (BOUKAR et al., 2018). É uma leguminosa pertencente à família
330 Fabacea, tribo Phaseoleae, gênero *Vigna* e seção *Catjang* (MARECHAL, MASCHERPA, &
331 STAINER, 1978). No Brasil, a depender da região, a cultura recebe vários nomes populares,
332 dentre os quais estão: feijão-de-corda e feijão-macassa (na região Nordeste); feijão-de-praia,
333 feijão-da-colônia e feijão-de estrada (na região Norte) e feijão miúdo (na região Sul) (NEVES,
334 et al, 2011).

335 Tratando-se de plantas cultivadas, o feijão-caupi é considerado uma das mais
336 importantes culturas de segurança alimentar e nutricional, sendo a principal fonte de proteína
337 para milhões de pessoas nos países em desenvolvimento (SINGH, 2014). É usado
338 principalmente como cultura de grãos, no entanto, também pode ser usado como forragem
339 animal e, ainda como adubação verde e proteção do solo (BEHURA R, et al., 2015; ANDRADE
340 JÚNIOR, et al., 2002). Além disso, um dos seus pontos fortes é sua alta capacidade de adaptação
341 a condições adversas, incluindo ambientes quentes e secos e solos pobres (BOUKAR, et al.,
342 2018), como a da região do semiárido do Brasil, além de servir como fonte de renda para
343 pequenos agricultores (NKOMO, et al., 2021).

344 Em termos de produção, Pernambuco é o segundo maior produtor de feijão do Nordeste,
345 ficando atrás apenas da Bahia, sendo a região propícia preferencialmente à cultura de variedade
346 caupi, que exibe rusticidade bastante elevada, sobretudo em relação à demanda hídrica,
347 adaptando-se bem às condições de menor disponibilidade de água, além disso, no Brasil, o
348 feijão-caupi é o segundo mais cultivado (CONAB, 2022). Para a safra de 2022/2023, a Conab
349 estima uma produção de 39,8 mil toneladas de feijão-caupi em Pernambuco, com produtividade
350 de 320 kg/ha (CONAB, 2023).

351 A cultivar BRS Guariba, obtida do cruzamento da linhagem IT85F-2687, introduzida
352 do International Institute of Tropical Agriculture – IITA, em Ibadan, Nigéria, com a linhagem
353 TE87-98-8G, do Programa de Melhoramento da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI, possui
354 ciclo precoce (65-70 dias) e características moderadamente tolerantes a seca e altas
355 temperaturas, além de apresentar ampla adaptabilidade a condições adversas (FREIRE FILHO,
356 et al., 2004). Diante dessas observações, acredita-se que esta espécie vegetal tem grande
357 potencial para servir de modelo para avaliar o efeito do níquel em suas funções bioquímicas e
358 morfofisiológicas.

359

360 **3. HIPÓTESE**

361

362 Plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), quando submetidas a concentrações
363 crescentes de sulfato de níquel (NiSO₄) desde a semeadura (na fase de desenvolvimento V0)
364 terão seus parâmetros morfológicos, fisiológicos e bioquímicos mais danificados do que quando
365 submetidas as mesmas concentrações após seu desenvolvimento inicial (na fase de
366 desenvolvimento V2).

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390 4.OBJETIVOS

391

392 4.1 Objetivo Geral

393

- 394 • Avaliar alterações induzidas por diferentes concentrações de sulfato de níquel (NiSO₄)
395 nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em plantas de feijão-caupi
396 (BRS Guariba) em diferentes fases fenológicas.

397

398 4.2 Objetivos Específicos

399

- 400 • Analisar o crescimento e desenvolvimento de plantas de feijão-caupi na ausência e sob
401 diferentes concentrações de Ni (II), a partir de parâmetros biométricos;
- 402 • Avaliar alterações nos parâmetros fisiológicos associados a medidas de condutância
403 estomática (gS), eficiência fotoquímica e potência hídrico foliar Ψ_w ;
- 404 • Determinar os conteúdos de pigmentos fotossintéticos (clorofilas *a*, *b*, totais e
405 carotenoides) em plantas de feijão-caupi na ausência e presença de Ni (II);
- 406 • Quantificar o conteúdo de carboidratos solúveis totais (TSC) em plantas de feijão-caupi
407 na ausência e sob diferentes concentrações de Ni (II);
- 408 • Verificar a sinalização de estresse oxidativo por meio do conteúdo de ácido
409 tiobarbitúrico (TBARS), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e dano de membrana em
410 plantas submetidas concentrações crescentes de Ni (II);
- 411 • Avaliar as mudanças na capacidade de proteção oxidativa com base na atividade das
412 enzimas APX e CAT e não enzimática, por meio da quantificação do DPPH, FRAP,
413 compostos fenólicos totais (TPC) e ácido ascórbico (AA) em folhas de plantas de feijão-
414 caupi na ausência e presença de Ni (II).

415

416

417

418

438

439

5.2 Material vegetal e condução dos tratamentos

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456

457

458

Sementes de *Vigna unguiculata* L., Walp. (Cultivar BRS GUARIBA), foram obtidas através do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) de Recife-PE. As sementes foram esterilizadas superficialmente através da imersão em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 5 minutos, posteriormente lavadas com água destilada para remoção do excesso do hipoclorito de sódio e secas em temperatura ambiente. A semeadura foi realizada no dia 16/05/2022, em vasos de 3,6 L de capacidade com substrato de areia fina lavada (seca em estufa de circulação de ar forçado a 120°C, por 24 h) e vermiculita na proporção de 1:1 (v/v), irrigadas três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira), com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) de ½ força iônica durante todo o experimento. Para o ensaio de toxicidade, as plantas foram submetidas a doses crescentes (0,5, 1 e 2 mM) de sulfato de níquel (NiSO₄), dissolvidos na solução nutritiva, durante um período de exposição de 30 dias, aplicados em diferentes fases fenológicas da cultura do feijão-caupi. Para o grupo controle, as plantas foram tratadas apenas com a solução nutritiva. A aplicação dos tratamentos no primeiro cenário do experimento iniciou-se na fase de desenvolvimento V0 (desde a semeadura), perdurando até o dia 14/06/2022. Já no segundo cenário, a aplicação dos tratamentos foi iniciada 10 dias após a semeadura (25/05/2022), quando as plântulas apresentaram dois pares de folhas totalmente expandidas, na fase V2, encerrada no dia 23/06/2022. Para ambas condições houve um grupo controle específico a fim de comparar o efeito da toxicidade do Ni⁺² nas diferentes fases fenológicas do feijão-caupi durante o tempo de exposição ao sulfato de níquel.

459

460

Tabela 02. Códigos e descrição dos tratamentos, fase de desenvolvimento do feijão-caupi e datas em que foram realizadas as aplicações

Códigos dos tratamentos	Descrição dos tratamentos	Fase de desenvolvimento de aplicação	Data de início e finalização das aplicações
N1T1	Solução nutritiva + 0,0 mM de NiSO ₄ (grupo controle)		
N2T1	Solução nutritiva + 0,5 mM de NiSO ₄	FASE V0 (Semeadura)	Início: 16/05/2022 Final: 14/06/2022
N3T1	Solução nutritiva + 1,0 mM de NiSO ₄		
N4T1	Solução nutritiva + 2,0 mM de NiSO ₄		
N1T2	Solução nutritiva + 0,0 mM de NiSO ₄ (grupo controle)	FASE V2	Início: 25/05/2022 Final: 23/06/2022

N2T2	Solução nutritiva + 0,5 mM de NiSO ₄	(Dois pares de folhas totalmente expandidas)
N3T2	Solução nutritiva + 1,0 mM de NiSO ₄	
N4T2	Solução nutritiva + 2,0 mM de NiSO ₄	

461

462 **5.3 Manejo de irrigação**

463

464 As irrigações foram realizadas utilizando o modelo de Hargreaves & Samani (1982).
 465 Este modelo estima a evapotranspiração de referência, ETo (mm dia⁻¹), considerando as
 466 temperaturas diárias mínima, máxima e média, calculada através da equação (1).

467

$$468 \quad ET_0 = 0,0023 (T_{méd} + 17,8) * (T_{máx} - T_{mín})^{0,5} * (R_a * 0,408) \quad (1)$$

469

470 Em que:

471 T_{méd} = Temperatura média, °C;

472 T_{máx} = Temperatura máxima, °C;

473 T_{mín} = Temperatura mínima, °C;

474 R_a = Radiação extraterrestre, MJ/m por dia.

475 Na variável R_a considerou-se os valores 32,10 para maio e 30,40 para junho,
 476 considerando a latitude de 8° (MEDEIROS, 2013). As variáveis de temperatura foram coletadas
 477 diariamente em data logger, localizado no interior da casa de vegetação.

478 A evapotranspiração da cultura foi estimada através da equação (2):

479

$$480 \quad ET_C = ET_0 * K_C \quad (2)$$

481

482 Onde ET_c é a evapotranspiração da cultura em mm dia⁻¹, ETo corresponde a
 483 evapotranspiração de referência em mm dia⁻¹, obtido através da equação de Hargreaves &
 484 Samani e K_c o coeficiente da cultura, onde foram consideradas as fases do ciclo dos 0-15 dias,
 485 0,5 e dos 16-44 dias, 0,8. As irrigações foram efetuadas respondendo-se as ET_cs do período
 486 anterior a última irrigação (ANDRADE, et al., 2018). No período experimental a ETo média
 487 foi de 4,76 mm dia⁻¹, com valores máximos de 6,84 mm dia⁻¹ e mínimos de 3,04 mm dia⁻¹.

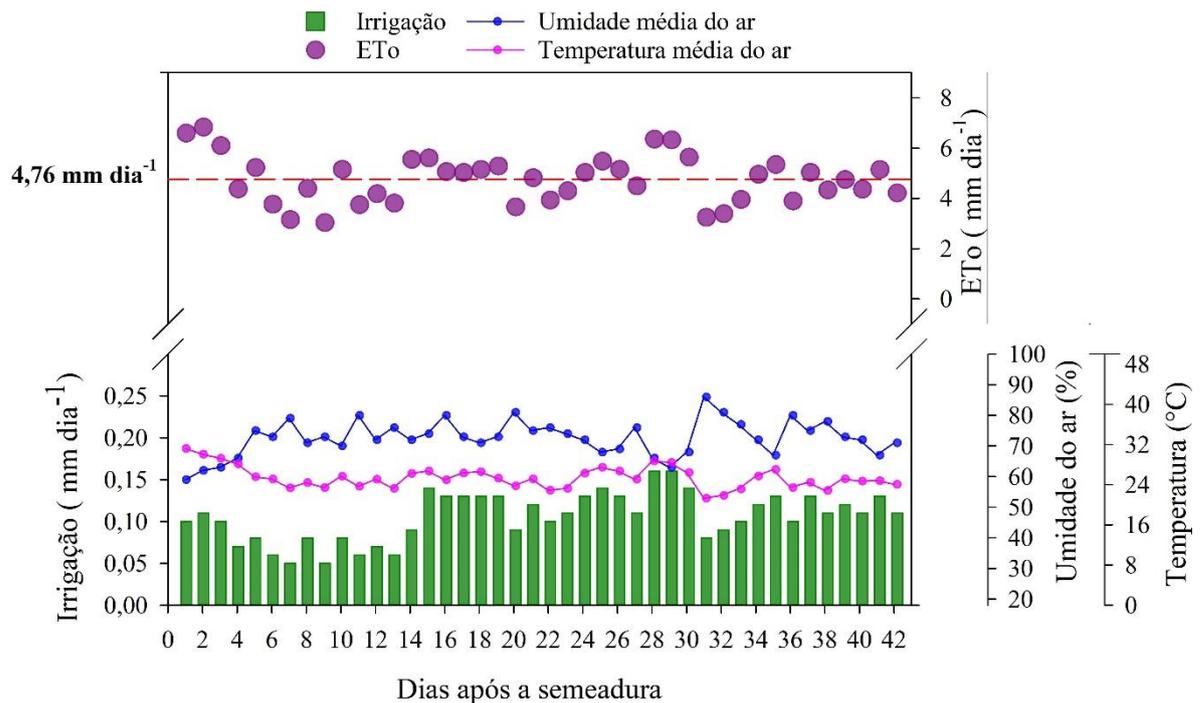


Figura 02. Condições ambientais e disponibilidade hídrica via irrigação durante o período experimental de maio a junho de 2022 para a casa de vegetação localizada na UFRPE-UAST.

488

489 5.4 Parâmetros morfológicos

490

491 5.4.1 Morfometria e biomassa das frações da planta e nódulos

492

493 Aos 30 dias após a semeadura, para ambos cenários experimentais, foram verificadas:

- 494 • Altura da parte aérea (cm): aferida do colo até a gema apical (com auxílio de uma
- 495 trena manual);
- 496 • Largura da planta (cm): verificada a partir da média das duas maiores extremidades
- 497 no topo da planta (com auxílio de uma trena manual);
- 498 • Diâmetro do coleto (mm): aferido com o auxílio de um paquímetro digital (Stainless
- 499 Hardened).

500

501 Foram realizadas amostragens de biomassa para a obtenção do peso fresco (g) e seco
 502 (g) das plantas de feijão-caupi ao final dos 30 dias de exposição ao Ni (II), nos dois cenários
 503 experimentais. A obtenção do peso fresco foi determinada no momento final do experimento
 504 de cada cenário com auxílio da balança semi-analítica, onde foram coletados o peso das folhas,
 caule e raiz, separadamente. Para o peso seco, o material fracionado foi acondicionado em sacos
 505 de papel e alocado em estufa de circulação de ar forçada a 55°C, até atingir o peso constante de

506 matéria seca. O teor de matéria seca (TMS) das frações foi determinado a partir do peso seco
507 dividido pelo peso fresco, expresso em porcentagem (%).

508 Considerando a não esterilização do substrato utilizado neste trabalho, foram verificadas
509 a presença de nódulos nas raízes, nas quais foram cuidadosamente lavadas de forma manual e
510 secas em estufa de circulação de ar forçada a 55°C por 72 h. Posteriormente, verificada a
511 extensão da nodulação, os nódulos foram cuidadosamente removidos do sistema radicular das
512 plantas de feijão-caupi com auxílio de uma pinça e pesados em balança analítica para obtenção
513 da sua massa seca (mg).

514

515 **5.4.2 Área foliar específica**

516

517 Para determinação da Área Foliar Específica (AFE), a partir da equação (5), foi coletado
518 um folíolo de cada indivíduo, localizado no intermédio da planta e imediatamente foram
519 digitalizadas em scanner de mesa para determinação da área foliar, usado o software *Lafore*.
520 Posteriormente, os folíolos foram secos a 55°C por 72 horas em estufa e pesados em balança
521 analítica (BIOPRECISA, FA2104N) para determinar a massa seca (PÉREZ-
522 HARGUINDEGUY et al., 2013).

523

$$524 \quad AFE = \frac{\text{Área foliar (m}^2\text{)}}{\text{peso seco (kg)}} \quad (5)$$

525

526 **5.5 Parâmetros fisiológicos**

527

528 **5.5.1 Condutância estomática**

529

530 Foram realizadas medidas de condutância estomática (nos dias 10, 15 e 30 após a
531 semeadura para as plantas que receberam as doses crescentes de Ni (II) desde a semeadura e 0,
532 15 e 30 dias após o início da aplicação das doses crescentes de Ni (II) para as plantas que os
533 receberam 10 dias após a semeadura), com um porômetro portátil (Modelo SC-1 Leaf
534 Porometer). As leituras foram realizadas no período da manhã entre as 8-10 horas (SILVA et
535 al., 2003).

536

537 **5.5.2 Fluorescência da clorofila**

538

539 Foram realizadas medidas dos parâmetros indicadores de eficiência fotoquímica, a fim
540 de monitorar danos no aparelho de captação luminosa em resposta as diferentes concentrações
541 de NiSO₄. As avaliações foram realizadas ao final de cada cenário experimental. As medidas
542 foram realizadas em folhas localizadas na região intermediária da planta, utilizando o método
543 do pulso de saturação, com auxílio de um fluorímetro de luz modulada (Modelo MINI-PAM-
544 II, da fabricante WALZ) após a adaptação das folhas ao escuro por aproximadamente 60 min,
545 com auxílio de pinças. As variáveis de fluorescência obtidas a partir das análises foram:

- 546 (i) eficiência quântica efetiva do fotossistema II [$\Delta F/F_m' = (F_m' - F_s)/F_m'$];
547 (ii) taxa aparente de transporte de elétrons do PSII [$ETR = (\Delta F/F_m' \times PPFD \times 0.5 \times$
548 $0.84)$];
549 (iii) coeficiente de quenching fotoquímico [$qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$] e
550 (iv) coeficiente de quenching não fotoquímico [$NPQ = (F_m - F_m'/F_m')$],

551 Onde: F_m = fluorescência máxima após a adaptação das folhas ao escuro; F_m' =
552 fluorescência máxima na presença de luz; F_s = fluorescência no estado de equilíbrio dinâmica
553 na presença de luz; F_o' = fluorescência basal após excitação do FSI por radiação infravermelha;
554 DFFF = densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativo; 0,5 = coeficiente que indica a
555 fração de excitação distribuída para o FSII e 0,84 = coeficiente indica a fração de luz absorvida
556 para o PSII.

557

558 **5.5.3 Potencial hídrico foliar**

559

560 O potencial hídrico foliar foi obtido no momento final do experimento (aos 30 dias) de
561 cada cenário, utilizando uma câmara de pressão tipo Scholander (Modelo 3005F01). As
562 medidas foram realizadas na antemanhã (04h30 – 05h30), usando uma folha em perfeito estado
563 fitossanitário, completamente expandida e não senescente, localizada na região mediana da
564 planta, sendo feita a leitura de um folíolo por planta.

565

566 **5.5.4 Dano de membrana**

567

568 Para a determinação do dano de membrana foi utilizada a metodologia de
569 extravasamento de eletrólitos, conforme Singh; Kumar; Kumar, (2008), com modificações.
570 Para cada unidade experimental foram utilizados dez discos foliares com diâmetro de 12,63
571 mm que foram acondicionados em tubos de ensaio contendo 10 mL de água ultrapura. Após
572 fechados, permaneceram em repouso durante 9 horas, em temperatura de 25°C, e, após esse
573 tempo, foram aferidas a condutividade inicial do meio (C₁) por meio de um condutivímetro de
574 bancada (TECNAL, Tec-4MP). Posteriormente os tubos foram submetidos à temperatura de
575 100° C, por 30 minutos, em banho-maria (Lavadora ultrassônica, Eco-sonics) e após o
576 resfriamento do conteúdo foi aferida a condutividade final (C₂). Nesta análise o dano de
577 membrana foi determinado pela equação (3):

578

$$579 \quad DM = \left(\frac{C_1}{C_2} \right) * 100 \quad (3)$$

580

581 Onde: DM = Dano de membrana; C₁= Condutividade elétrica inicial e C₂=
582 Condutividade elétrica final.

583

584 **5.6 Parâmetros bioquímicos**

585

586 **5.6.1 Conteúdo de clorofilas a, b, totais e carotenoides**

587

588 Foram pesados 0,5 g de matéria fresca (MF) das folhas de cada planta, sendo
589 solubilizados em 5 mL de acetona a 80%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a
590 6000 g por 15 minutos a 4°C. As medidas dos teores de clorofila (Chl) e carotenoides foram
591 realizadas em espectrofotômetro ((Libra S8, Biochrom) nos comprimentos de onda de 470, 645
592 e 663 nm, de acordo com os métodos de Lichtenthaler; Buschmann, (2001). A estimativa das
593 concentrações de clorofila foi realizada pelas seguintes relações, determinadas em mg g⁻¹.

594

$$595 \quad Chl_a = \left[\frac{(12,25 * A_{663} - 2,79 * A_{645})}{1000 * W} \right] * V \quad (6)$$

$$596 \quad Chl_b = \left[\frac{(21,5 * A_{645} - 5,10 * A_{663})}{1000 * W} \right] * V \quad (7)$$

$$597 \quad Chl_{\text{totais}} = Chl_a + Chl_b \quad (8)$$

$$598 \quad Carotenoides = \left[\frac{(1000 * A_{470}) - (1,82 * Chl_a) - (84,02 * Chl_b)}{198} \right] \quad (9)$$

599 Onde: A é a absorvância, V o volume final do extrato (5 mL), e W o peso em gramas do tecido
600 vegetal (0,5 g).

601

602 **5.6.2 Peroxidação lipídica**

603

604 O nível de peroxidação lipídica foi determinado por meio da quantificação de espécies
605 reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), baseado no método descrito por Coelho Júnior et al.
606 (2019), com modificações. Para a extração, foram pesados 0,1 g das folhas, sendo macerados e
607 solubilizados com 1,0 mL de TCA a 6%. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 7960 g
608 por 15 minutos a 4°C. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram adicionadas a 1500 µL do
609 meio de reação contendo 20% de TCA e 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras
610 foram aquecidas a 95°C por 30 min e posteriormente foram imersas em banho de gelo para a
611 paralização da reação e em seguida as leituras de absorvância foram realizadas a 532 nm e a
612 600 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado para o cálculo da atividade de TBARS foi
613 de 155 mM⁻¹cm⁻¹, expressando os resultados com base em nmol g⁻¹ MF.

614

615 **5.6.3 Conteúdo de peróxido de hidrogênio**

616

617 A quantificação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi determinado de
618 acordo com as metodologias de Kasnak; Palamutoglu. (2021) e Zheng et al. (2019), com
619 modificações. Para a obtenção do extrato, amostra de 0,1g das folhas foram homogeneizadas
620 em 2,0 mL de ácido tricloroacético 0,1 % (TCA). Em seguidas o homogenato foi centrifugado
621 a 12000 g por 15 min a 4°C. Alíquotas de 600 µL do sobrenadante foram adicionadas a 1400
622 µL do meio de reação contendo 0,7 mL de iodeto de potássio e 0,7 mL de tampão fosfato de
623 potássio (pH=7,0). As leituras foram registradas em espectrofotômetro com absorvância de 390
624 nm. O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi determinado com base em uma curva padrão de
625 H₂O₂ e expresso em µmol g⁻¹ MF.

626

627 **5.6.4 Preparo do extrato metanólico para o ensaio da atividade antioxidante do** 628 **radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder do redutor do ferro (FRAP),** 629 **conteúdo de compostos fenólicos e ácido ascórbico**

630

631 Para a obtenção do extrato metanólico, amostras de 0,2 g do tecido foliar foram
632 maceradas e homogeneizadas em 1,5 mL de metanol (P.A) e posteriormente foram mantidas
633 em repouso por 24 h, a 4° C. Após esse período, os extratos foram centrifugados a 9000 g por
634 21 minutos a 5°C.

635

636 **5.6.5 Ensaio de eliminação de radicais 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

637

638 A capacidade antioxidante pela captura do radical livre DPPH foi determinada de acordo
639 com a método proposto por Eugênio et al. (2021), com adaptações. Para o ensaio, foram
640 adicionados 840 µL de DPPH (0,1 mM) e 60 µL do sobrenadante (obtido no item 5.6.4), as
641 amostras foram homogeneizadas em agitador de tubo e mantidas em repouso por 30 minutos
642 (tempo este que foi determinado a partir de monitoramento teste a cada 10 minutos a fim de
643 averiguar a redução da absorbância até sua estabilização). Após os 30 minutos de reação, foram
644 realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm. O decaimento da absorbância das amostras
645 correspondeu na porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL), e foi obtido através da
646 seguinte equação:

647

$$648 \quad \%SRL = \frac{(Abs_{Controle\ DPPH} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Controle\ DPPH}} * 100 \quad (10)$$

649

650 Sendo a absorbância do controle DPPH obtida utilizando-se 840 µL de DPPH (0,1 mM)
651 e 60 µL do extrator (metanol P.A).

652

653 **5.6.6 Determinação da capacidade antioxidante pelo poder redutor do ferro (FRAP)**

654

655 A atividade antioxidante avaliada pelo método FRAP (Poder de Redução do Ferro) foi
656 determinada de acordo com a metodologia proposta por Eugênio et al. (2021) com adaptações.
657 Para o ensaio, uma alíquota de 900 µL do reagente FRAP (composto por 25 mL de tampão
658 fosfato (0,3 M; pH 3,6), 2,5 mL da solução de TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de
659 cloreto férrico (20 mM) foram adicionados a 30 µL do sobrenadante (obtido no item 5.6.4).
660 Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos e mantidas em
661 repouso por 30 minutos, a 37°C (em banho-maria), no escuro. Após o período de incubação, as
662 leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 594 nm. Para obtenção do branco, foi utilizado

663 900 µL do reagente FRAP e 30 µL do extrator (metanol P.A). O potencial antioxidante dos
664 extratos foi determinado com base numa curva de calibração, obtida usando sulfato ferroso
665 (FeSO₄.7H₂O) em concentrações entre 0 e 2000 µM. Os resultados foram expressos em mM
666 Fe²⁺ Kg⁻¹.

667

668 **5.6.7 Quantificação de compostos fenólicos totais (TPC)**

669

670 O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pela metodologia proposta
671 por Jaramillo-Flores et al. (2003), com adaptações. Foram utilizados 100 µL do sobrenadante
672 (obtido no item 5.6.4), 400 µL de água ultrapura e 500 µL do reagente Folin–Ciocalteu (1 N).
673 Em seguida, foi acrescentado 500 µL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 20% (p/v)
674 e a mistura permaneceu em repouso por 10 min. Posteriormente, as leituras foram realizadas
675 em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 757 nm. Para a construção da curva de
676 calibração foi utilizada uma solução padrão de ácido gálico. A quantidade de polifenóis solúveis
677 totais foi expressa em mg de ácido gálico mg⁻¹ MF.

678

679 **5.6.8 Quantificação de ácido ascórbico (AA) pelo ensaio de Folin–Ciocalteu**

680

681 O conteúdo de ácido ascórbico foi determinado pelo método proposto por Sánchez-
682 Rangel et al. (2013), com adaptações. Para o ensaio, foram utilizados 100 µL do sobrenadante
683 (obtido no item 5.6.4), 400 µL de água ultrapura e 500 µL do reagente Folin–Ciocalteu (1 N),
684 essa mistura permaneceu em repouso por 2 min. Posteriormente, as leituras foram realizadas
685 em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. Para a construção da curva de
686 calibração foram utilizadas soluções padrões de ácido ascórbico (0 - 200 µM). A quantidade de
687 AA total foi expressa em mM de ácido ascórbico por grama de MF.

688

689 **5.6.9 Carboidratos solúveis totais (TSC)**

690

691 O teor de carboidratos solúveis totais foi determinado de acordo com o método proposto
692 por Dubois et al. (1956), com modificações. Para o preparo do extrato, amostras de 0,2 g do
693 tecido foliar foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0).
694 O homogeneizado foi então centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4°C. Para o ensaio, foram

695 utilizados 50 µL do extrato, 450 µL de água ultrapura, 500 µL de fenol a 5% e 2500 µL de
696 ácido sulfúrico (P.A). Posteriormente, os tubos foram agitados em um agitador de tubos e
697 mantidos em repouso por 15 min, imersos em banho de gelo, até as leituras serem realizadas no
698 espectrofotômetro a 490 nm. A curva de calibração foi construída por meio de uma solução de
699 glicose anidra. O teor de carboidratos solúveis totais foi expresso em mg de carboidratos por
700 100 gramas de MF.

701

702 **5.6.10 Preparo do extrato enzimático**

703

704 Para obtenção do extrato enzimático, 0,1 g do tecido foliar (que foram imediatamente
705 congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (-80°C) após a coleta) foi
706 macerado com auxílio de nitrogênio líquido e homogeneizados em 2 mL do mix de pulverização
707 contendo tampão fosfato de potássio 0,1 mol/L (pH 7,0), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200
708 mM e pirrolidina insolúvel (PVPP) 1% (p/v). Em seguida, o extrato foi centrifugado a 7960 g
709 por 23 min, a 4°C (SPEROTTO, 2014).

710

711 **5.6.11 Determinação de proteínas solúveis totais (TSP)**

712

713 Para a medição das proteínas solúveis foram utilizados os métodos de Bradford (1976) e
714 Zimmermann et al. (2006), com adaptações. Para o ensaio do teor de proteína, foram utilizados
715 10 µL do sobrenadante (obtido no item 5.6.10) 90 uL do tampão fosfato de potássio pH 7,0 (0,1
716 mol/L) e 1000 µL da solução de Bradford, sendo homogeneizado em agitador de tubos e
717 mantidos em repouso por 15 min. Após o período de incubação, as leituras foram realizadas a
718 595 nm. O conteúdo de proteína foi estimado de acordo com curva padrão elaborada com
719 albumina do soro bovino (BSA), sendo determinada em mg proteína por grama de MF.

720

721 **5.6.12 Ensaio da atividade da catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX)**

722

723 A atividade da catalase foi determinada segundo a metodologia proposta por Havir &
724 Michale (1987) e Anderson et al. (1995), com modificações. Para o ensaio, alíquotas de 25 uL
725 do extrato enzimático (obtido no item 5.6.10) foram adicionados a 25 uL de água ultrapura e
726 900 uL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e mantidas em banho-maria a uma

727 temperatura de 27° C. No momento da leitura, foi então adicionado 50 uL de H₂O₂ (20 mM).
728 Foi feito o acompanhamento do decaimento da absorbância a 240 nm por 1,5 minutos, com
729 leituras realizadas em espectrofotômetro de forma sucessiva a cada 10 segundos. A atividade
730 da catalase foi calculada com base no coeficiente de extinção molar de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ para H₂O₂,
731 e expressa em μmol H₂O₂ mg⁻¹ proteína min⁻¹.

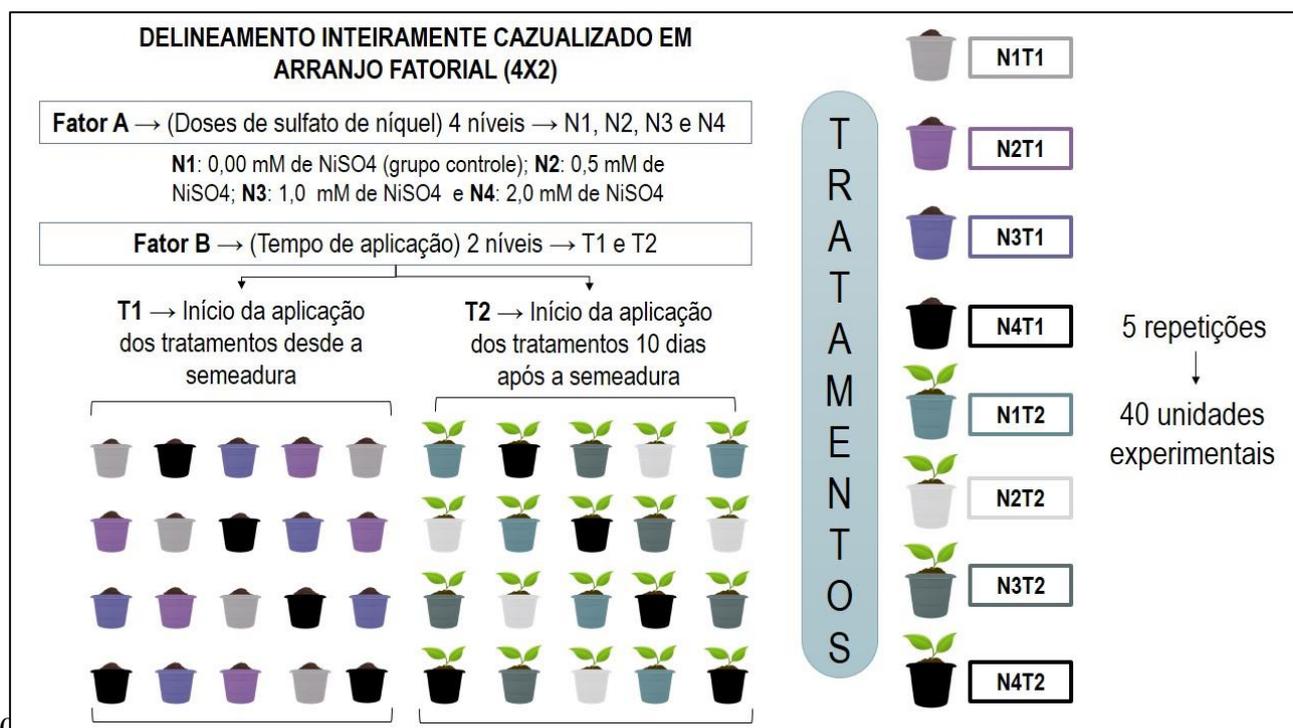
732 A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada segundo a metodologia
733 proposta por Nakano & Asada, (1981), com adaptações. Para o ensaio, alíquotas de 25 uL do
734 extrato enzimático (obtido no item 5.6.10) foram adicionados a 25 uL de água ultrapura e 900
735 uL do tampão fosfato de potássio (111 mM; pH 7,0), 50 μL de ácido ascórbico (10 mM) e
736 mantidas em banho-maria a uma temperatura de 27° C por, 5 minutos. No momento da leitura,
737 foi então adicionado 50 uL de H₂O₂ (30 mM). Foi feito o acompanhamento do decaimento da
738 absorbância a 290 nm por 1,5 minutos, com leituras realizadas em espectrofotômetro de forma
739 sucessiva a cada 10 segundos. A atividade da ascorbato peroxidase foi calculada com base no
740 coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹, e expressa em μmol AsA mg⁻¹ proteína min⁻¹.

741

742 **5.7 Delineamento estatístico e análise dos dado**

743

744 O experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em
745 arranjo fatorial 4 x 2 de combinações de tratamentos com os seguintes fatores: quatro níveis de
746 Ni (II) (0; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) e dois tempos de aplicação das doses crescentes de níquel: desde
747 a semeadura (que será identificada como DAS-0 (Dias Após a Semeadura-0)) e aplicação dos
748 tratamentos 10 dias após a semeadura (que será identificada como DAS-10 (Dias Após a
749 Semeadura-10), com 5 repetições, totalizado 40 unidades experimentais.



750

751 **Figura 03.** Design experimental da área de estudo em casa de vegetação. Fonte: A autora

752

753 Os valores médios e desvio padrão dos tratamentos foram calculados a partir de três
 754 repetições independentes e em seguida foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-
 755 Wilk) e homocedasticidade (Levene), para avaliar se os dados possuem distribuição normal e
 756 variâncias homogêneas. Atendendo esses requisitos, as médias foram submetidas à análise de
 757 variância (ANOVA) e, em seguida, submetidas ao teste de Tukey ($p < 0,05$). A Análise de
 758 Componentes Principais (PCA) foi obtida através da integração dos parâmetros morfológicos,
 759 fisiológicos e bioquímicos e posterior decomposição em vetores. Os resultados da matriz de
 760 correlação foram apresentados em biplots com sua distribuição no espaço de ordem, variâncias
 761 e correlação de Pearson. A estatística foi realizada utilizando o software RStudio para análise
 762 dos dados. Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa SigmaPlot 14.0.

763

764

765

766

767

768

769 **6. RESULTADOS**

770

771 **6.1 Desenvolvimento, área foliar específica, biomassa, nodulação e sintomas visuais**
772 **de toxicidade em plantas de feijão-caupi sob efeito de sulfato de níquel**

773

774 Para os índices morfométricos analisados (altura, largura da planta e espessura do caule),
775 não houve efeito de interação entre os fatores estudados, desta forma os valores estão sendo
776 apresentados a partir da média dos tratamentos \pm DP (desvio padrão). Estas análises foram
777 verificadas 30 dias após a semeadura para ambos cenários experimentais (DAS-0 e DAS-10).

778

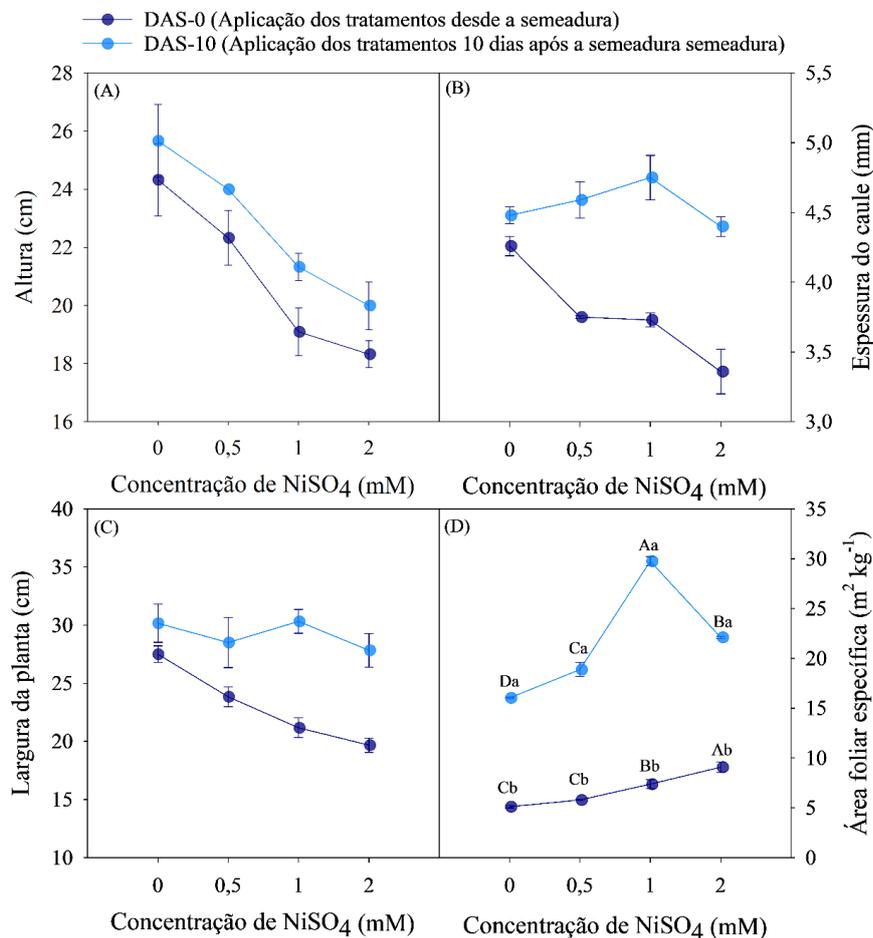


Figura 4. Efeito dos tratamentos induzidos por concentrações crescentes de NiSO₄ (0 – Controle, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM) na altura da planta (A), espessura do caule (B), largura da planta (C) e área foliar específica (D) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). Quando há efeito de interação, as letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os dois tempos de aplicação dos tratamentos, indicando diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

779

780 Os resultados indicam que a altura da planta, espessura do caule e largura da planta foram
781 afetadas negativamente pelas concentrações crescentes de sulfato de níquel quando aplicados
782 desde a semente (Fig. 4-A, B e G). Com base na altura da planta, houve uma diminuição de
783 6,95, 10,45 e 8,35% com o aumento das concentrações (0,5 mM, 1 mM e 2 mM de NiSO₄,
784 respectivamente) quando comparado o cenário DAS 10 com o DAS 0. Na espessura do caule,
785 houve uma diminuição de 18,30, 21,47 e 23,64 % com o aumento das concentrações (0,5 mM,
786 1 mM e 2 mM de NiSO₄, respectivamente), do cenário DAS 10 para o DAS 0. De modo
787 semelhante, na largura da planta houve uma diminuição de 18,38, 28,88 e 29,32% de DAS 10
788 para DAS 0, com o aumento das doses de Ni (II) (0,5 mM, 1 mM e 2 mM de NiSO₄,
789 respectivamente). Visualmente, observando as plantas ao final dos 30 dias de exposição ao Ni
790 (II), é possível notar diferenças na altura e largura das plantas entre os tratamentos para ambas
791 os cenários (DAS-0 (Fig. 5-A) e DAS-10 (Fig. 5-B)).

792

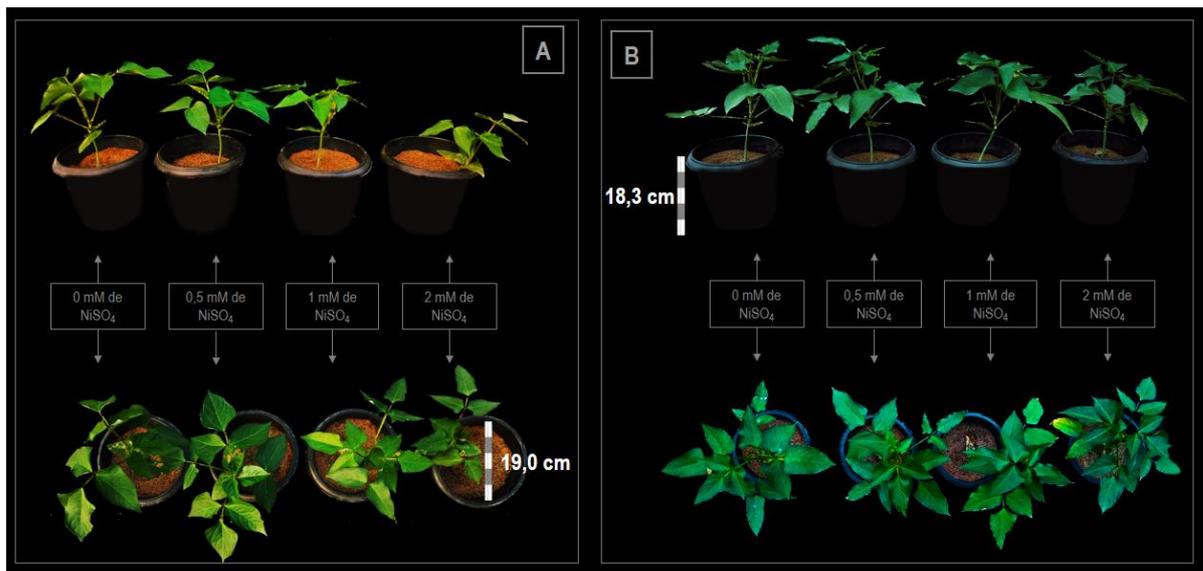


Figura 5. Aspecto visual de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semente (A) e 10 dias após a semente (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação.

793

794 Foi observado que houve efeito de interação e diferenças significativas quanto a área
795 foliar específica para ambas os cenários experimentais, sendo a DAS 10 a que apresentou
796 maiores valores, considerando também que eram plantas mais velhas e conseqüentemente,
797 maiores (Fig. 4-D). Observando as condições isoladas, para as plantas do cenário DAS-0, a

798 AFE aumentou com as doses crescentes de NiSO₄. Já para o cenário DAS-10, o maior valor de
799 AFE foi referente ao tratamento com 1 mM de NiSO₄ ($29,75 \pm 0,45 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), seguido pelos de
800 2 mM ($22,10 \pm 0,11 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$), 0,5 mM ($18,87 \pm 0,71 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) e o grupo controle ($16,02 \pm 0,08$
801 $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$). Com o registro visual é possível observar o efeito inibitório no desenvolvimento dos
802 folíolos das plantas de feijão-caupi com o aumento das doses de sulfato de níquel,
803 principalmente no cenário DAS-0 (Figura 6).

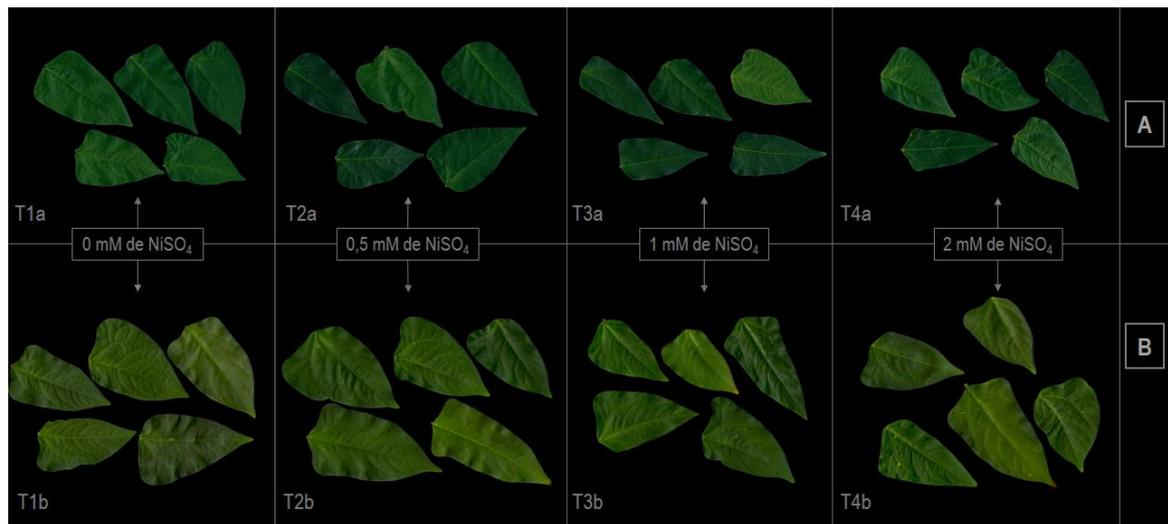


Figura 6. Aspecto visual dos folíolos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em plantas submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM), desde a sementeira (A) e 10 dias após a sementeira (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação.

804

805 Ao final dos 30 dias de exposição ao Ni (II) tanto no cenário DAS-0 como no DAS-10,
806 houve variações da produção de biomassa em relação à massa fresca e seca das frações
807 analisadas, bem como no teor de matéria seca com o aumento das concentrações de NiSO₄
808 (Tabela 03).

809 A maior dose de de NiSO₄ (2mM), quando comparado ao grupo controle de cada cenário
810 experimental, proporcionou uma diminuição da massa fresca da folha em 20,30% no cenário
811 DAS-0 e 42,07% no DAS-10. Em relação a massa fresca do caule e raiz, não houve diferenças
812 significativas entre as doses crescentes de Ni (II) em ambos cenários. A maior concentração de
813 Ni (II) diminuiu a massa seca das folhas e raiz em 32,38 e 43,96%, respectivamente, não
814 havendo diferença significativa para a massa seca do caule, no DAS-0. Já no DAS-10, a maior
815 dose de Ni (II), diminuiu a massa seca da folha e caule em 61,68 e 56,82%, respectivamente.
816 Não houve diferenças significativas para a massa seca da raiz no DAS-10. Com relação as

817 raízes, em ambos cenários experimentais, mesmo que não tenha havido tantas diferenças
 818 significativas entre as análises realizadas, visualmente (Figura 7-A e B), é possível observar
 819 nos tratamentos com as maiores doses de NiSO₄ que as raízes, aparentemente, se desenvolveram
 820 menos que a do grupo controle.

821

822 **Tabela 03.** Rendimento de matéria fresca e seca e teor de matéria seca em plantas de feijão-
 823 caupi (*Vigna unguiculata*) tratadas com concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle),
 824 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (DAS 0) e dez dias após a semeadura (DAS-10).

[mM de NiSO ₄]	CENÁRIO	MF folha	MS folha	MF caule	MS caule	MF raiz	MS raiz	TMS folha	TMS caule	TMS raiz
				(g)				(%)		
0,0	DAS-0	23,25 a	4,54 a	12,90 a	2,29 a	18,12 a	2,07 ab	19,59 a	20,81 a	11,47 a
0,5		24,54 a	4,70 a	15,37 a	3,00 a	22,41 a	2,47 a	19,12 a	19,32 ab	10,35 a
1,0		22,05 ab	3,90 ab	9,90 a	1,75 a	20,25 a	1,45 bc	17,69 a	17,27 b	7,11 b
2,0		18,53 b	3,07 b	12,00 a	1,96 a	17,28 a	1,16 c	16,57 a	16,32 b	6,91 b
CV (%)		6,48	8,94	19,02	23,2	11,95	13,99	7,39	6,74	8,72
0,0	DAS-10	15,33 a	1,67 a	5,94 a	0,44 a	13,77 a	0,88 a	10,90 a	7,37 a	7,60 a
0,5		12,61 ab	1,20 b	5,52 a	0,41 ab	19,59 a	1,35 a	9,49 ab	7,36 a	6,79 a
1,0		11,76 bc	0,99 bc	4,42 a	0,27 ab	13,25 a	0,86 a	8,40 b	6,18 ab	6,44 a
2,0		8,88 c	0,64 c	4,32 a	0,19 b	14,69 a	0,85 a	7,92 b	4,55 b	5,78 a
CV (%)		9,28	12,04	15,11	26,42	30,97	39,74	9,58	16,04	12,26

825 MF folha: massa fresca da folha; MS folha: massa seca da folha; MF caule: massa fresca do caule; MS
 826 caule: massa seca do caule; MF raiz: massa fresca da raiz; MS raiz: massa seca da raiz; TMS folha: teor
 827 de matéria seca da folha; TMS caule: teor de matéria secado caule; TMS raiz: teor de matéria seca da
 828 raiz. As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

829

830 Em relação ao TMS da folha, é possível observar uma tendência de queda dos valores
 831 médios com o aumento das concentrações de NiSO₄ quando comparados ao controle, sendo
 832 12,93, 22,94 e 27,34% menor para 0,5 mM, 1 mM e 2 mM de NiSO₄, respectivamente no DAS-
 833 10, não havendo diferenças significativas no DAS-0. O mesmo pode ser observado para os
 834 dados do TMS do caule, diminuindo cerca de 16,14 e 38,26% quando comparado ao controle,
 835 para as concentrações de 1 mM e 2 mM de NiSO₄, respectivamente no DAS-10. No DAS-0, foi
 836 possível observar uma diminuição do TMS do caule de 21,58% na maior dose de Ni (II), quando
 837 comparado ao controle. Já em relação ao TMS da raiz, os valores obtidos não diferiam
 838 significativamente entre as concentrações de NiSO₄ no DAS-10, no entanto, mesmo assim, a
 839 maior dose (2mM) apresentou uma diminuição de aproximadamente 24%, quando comparado
 840 ao grupo controle. No DAS-0, as maiores concentrações de Ni (II) foram significativamente
 841 menores que o controle, cerca de 38% em 1 mM e 40% em 2mM.

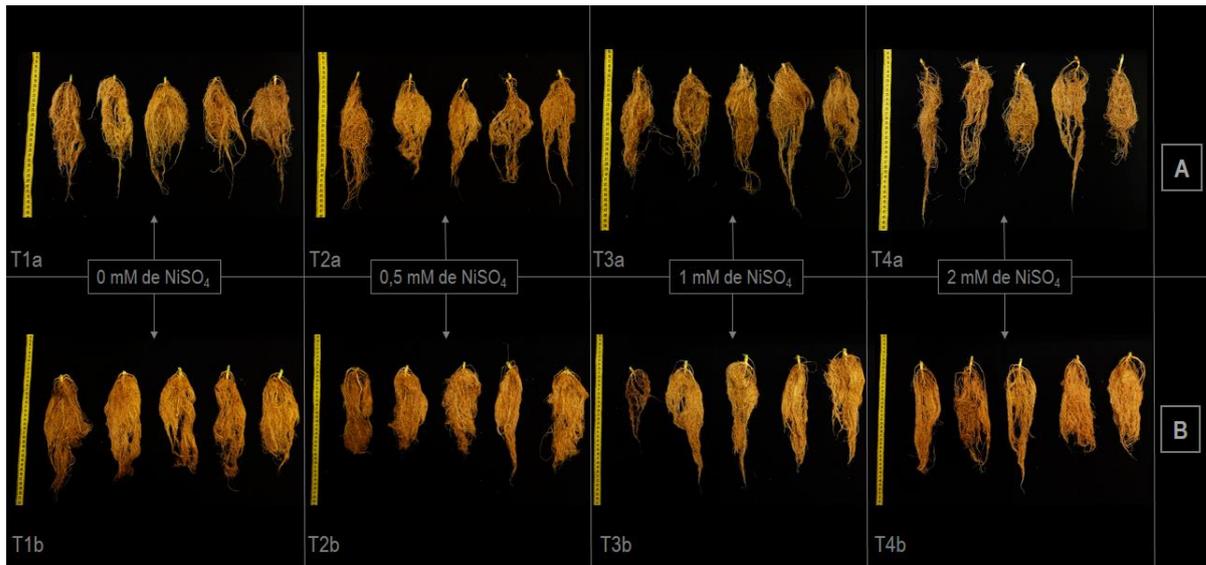


Figura 7. Aspecto visual dos raízes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) em plantas submetidas a concentrações crescentes de NiSO_4 (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação.

Os resultados do presente estudo indicaram o desenvolvimento de nódulos no sistema radicular, uma vez que o substrato não passou pelo processo de esterilização. Foi possível observar que a massa seca dos nódulos foi significativamente afetada pelas doses crescentes de Ni (II) (Fig.8-A e B). A massa seca dos nódulos no cenário DAS-10 foi significativamente maior que o DAS-0, exceto pelo tratamento com menor dose de Ni (II). Com base no efeito dos tratamentos, quando comparado ao controle, no DAS-10, houve uma diminuição de 74,14; 25,48 e 13,44%, para as concentrações de 0,5 mM, 2 mM e 1 mM de NiSO_4 , respectivamente (Fig. 8-D). No cenário DAS-0, a concentração intermediária (1 mM), diminuiu 37,60% da massa seca dos nódulos, quando comparado ao controle. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com 0, 0,5 e 2 mM.

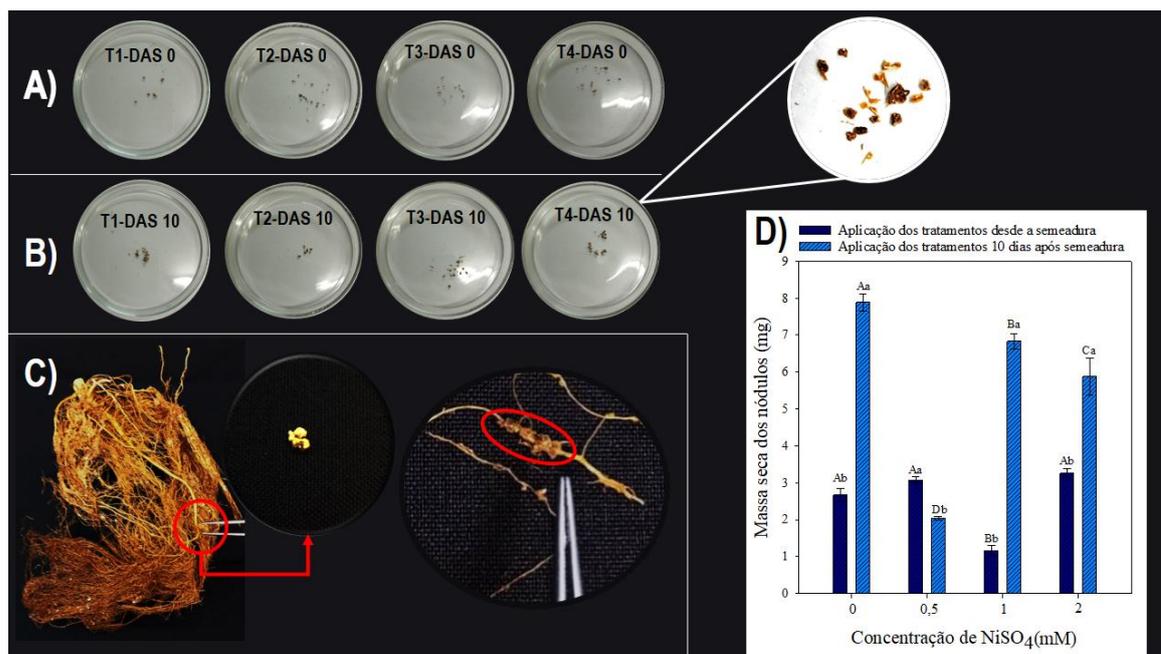


Figura 8. Aspecto visual dos nódulos encontrados no sistema de radicular de plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a sementeira (A) e 10 dias após a sementeira (B) durante 30 dias em condição de casa de vegetação. Exemplo de nódulos identificados no sistema radicular (C). Efeito dos tratamentos induzidos por concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) na massa seca dos nódulos. As barras representam o desvio padrão das médias (n=5). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os dois tempos de aplicação dos tratamentos.

843 **6.2 Condutância estomática, potencial hídrico e parâmetros fotoquímicos de plantas de** 844 **feijão-caupi sob efeito de sulfato de níquel**

845

846 Os dados mostram uma diminuição significativa durante os 30 dias de análise da gs com
847 o aumento das concentrações de NiSO₄, tanto para os tratamentos aplicados DAS-0 (Fig. 9-A),
848 quanto para o cenário de aplicação 10 dias após sementeira (Fig. 9-B). No cenário DAS-0,
849 verificou-se que após 10 dias de aplicação dos tratamentos houve uma diminuição de 14,86 e
850 19,05%, para as concentrações de 1 mM e 2 mM, respectivamente, não havendo diferença
851 significativa entre o grupo controle e o de menor dose de NiSO₄ (0,5 mM). Com 15 dias de
852 análise observou-se uma tendência significativa de queda da gs com o aumento das
853 concentrações. Ao final do experimento, notou-se uma brusca diminuição para os tratamentos
854 com 1 mM e 2 mM, cerca de 32,33 e 35,15%, respectivamente, quando comparado ao controle
855 (Fig. 9-A). No cenário DAS-10 foi verificada a condutância no dia 0, ou seja, quando as plantas

856 não receberam as doses de NiSO₄ e estavam todas sob a mesma condição, irrigadas apenas com
 857 solução nutritiva, sendo possível observar que não houve diferença significativas entre os
 858 tratamentos. Porém, 15 dias após aplicação dos tratamentos o estudo mostrou um efeito severo
 859 da fitotoxicidade induzida pelo Ni, onde foi possível notar uma diminuição de 15,69, 23 e
 860 29,85%, para os tratamentos com 0,5 mM, 1mM e 2 mM de NiSO₄, respectivamente, quando
 861 comparados ao controle. O mesmo pode ser observado ao final do experimento, quando as
 862 plantas apresentaram uma queda de 15,80, 28,54 e 46,54% para os tratamentos com 0,5 mM,
 863 1mM e 2 mM de NiSO₄, respectivamente (Fig. 9-B).
 864

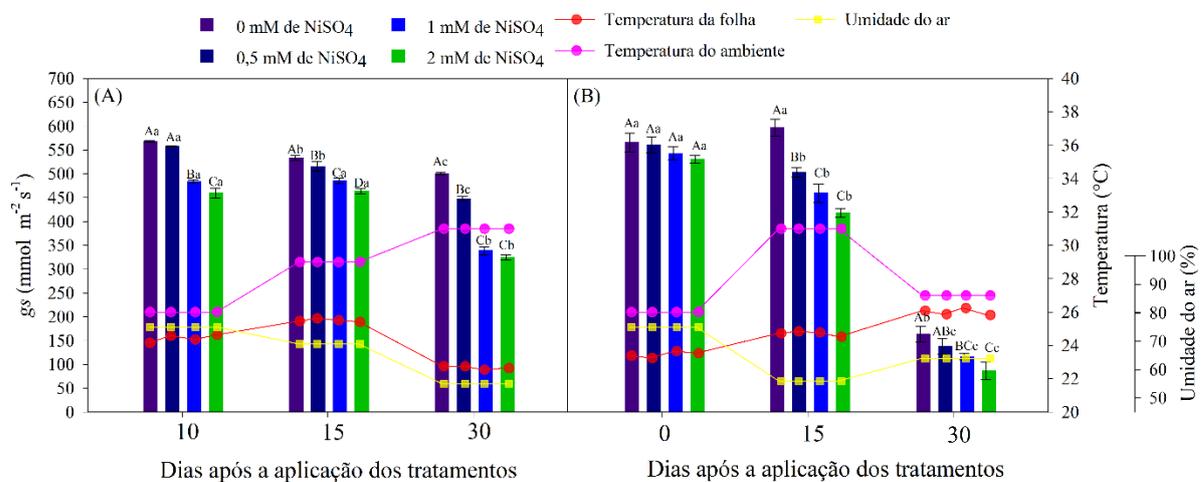


Figura 9. Relação da condutância estomática (g_s) e temperatura média da folha com a temperatura e umidade média do ambiente no dia de análise, para as plantas submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) desde a semeadura (A) e 10 dias após a semeadura (B). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise.

865

866 A avaliação do potencial hídrico (Ψ_w) foliar mostrou que o sulfato de níquel afetou
 867 significativamente o status hídrico das plantas de feijão-caupi. Na ausência de sulfato de níquel
 868 (plantas controle) o Ψ_w foi similar para as duas condições experimentais (-0,139 MPa, para o
 869 grupo de plantas que recebeu os tratamentos DAS-10 e -0,145 MPa para os DAP-0). Os
 870 resultados analisados indicam que o status hídrico da planta foi mais afetado pelas
 871 concentrações crescentes de sulfato de níquel quando aplicados desde a semeadura (Fig.10),
 872 apresentando uma redução média de 1,92, 2,45 e 2,86 vezes menor, para 0,5 mM, 1 mM e 2
 873 mM de NiSO₄, respectivamente, quando comparado ao controle.

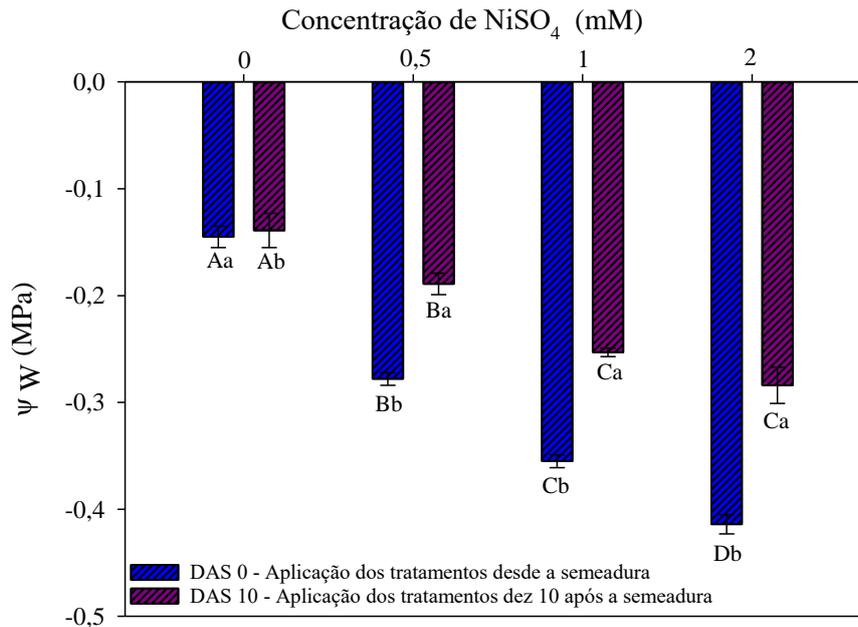


Figura 10. Potencial hídrico (Ψ_w) em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise.

874

875 A mesma tendência de queda do *status* hídrico das plantas pode ser observada para o
 876 cenário de aplicação dos tratamentos 10 dias após a semeadura, entretanto, não houve diferença
 877 significativa para as duas maiores doses de NiSO₄ ($-0,25 \pm 0,004$ e $-0,28 \pm 0,017$ MPa, para 1
 878 mM e 2 mM, respectivamente).

879 Em relação à análise da dinâmica dos parâmetros fotoquímicos estimados com base na
 880 fluorescência da clorofila *a*, foi possível observar danos moderados do sal de sulfato de níquel
 881 sobre os processos de eficiência fotoquímica, uma resposta que ficou mais clara sob a maior
 882 concentração de NiSO₄ (2 mM), em ambas condições (Figura 11).

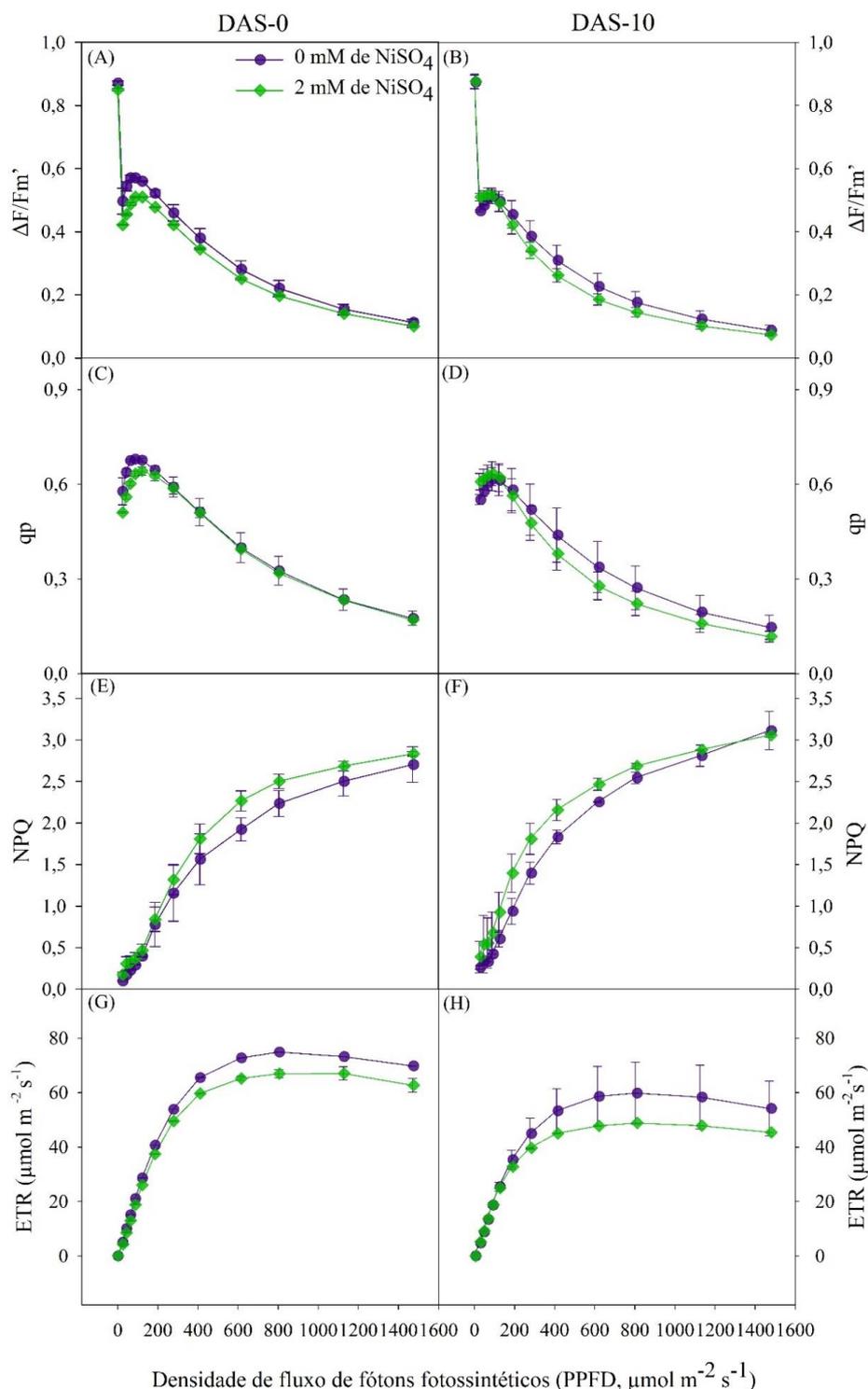


Figura 11. Curva de indução de parâmetros fotoquímicos em resposta à densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD) apresentando os parâmetros de eficiência quântica efetiva do fotossistema II do cenário DAS-0 (A) e DAS-10 (B), quenching fotoquímico da condição DAS-0 (C) e DAS-10 (D), quenching não fotoquímico do cenário DAS-0 (E) e DAS-10 (F) e taxa de transporte de elétrons do cenário DAS-0 (G) e DAS-10 (H) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condição de casa de vegetação.

883 Os valores do rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) foram maiores no
 884 início da análise para os dois cenários de tratamento (DAS-0 e DAS-10) (Fig. 11-A e B). Em
 885 $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF, o tratamento sob concentração elevada (2 mM) apresentou
 886 singelamente menor eficiência quântica efetiva, quando comparado ao controle, porém, sem
 887 diferenças expressivas em ambas os cenários experimentais.

888 Com base no quenching fotoquímico (qp), os resultados se mostram semelhantes ao
 889 $\Delta F/F_m'$, com menores magnitudes no maior PPF, onde foi possível observar que não houve
 890 diferenças entre os tratamentos, em ambas os cenários (Fig. 11-C e D).

891 Houve diferença para o quenching não fotoquímico (NPQ) a partir de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
 892 PPF para o cenário DAS-10 (Fig. 12-F) e de $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF para o cenário DAS-0
 893 (Fig. 11-E). Tratando-se do cenário DAS-0, o tratamento com 2 mM apresentou maiores valores
 894 de NPQ durante todo PPF, indicando dissipação excessiva de calor no fotossistema II. Em
 895 relação o cenário DAS-10, houve a mesma tendência de aumento, no entanto, as plantas
 896 controles apresentaram uma variação que seguiu o mesmo comportamento das plantas sob nível
 897 elevado de Ni(II), a partir do $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, demonstrando o estresse sofrido por esse
 898 grupo de plantas com o aumento da densidade luminosa.

899 A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi notoriamente diferente entre os tratamentos
 900 de 0 e 2 mM no cenário DAS-0 (Fig. 12-G), com maiores variações do PPF a partir de 400
 901 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo os menores valores referentes a maior dose de NiSO₄. No cenário DAS-
 902 10, é possível observar ainda que a ETR foi significativamente menor que no cenário DAS-0,
 903 tanto para as plantas tratados com 2mM de NiSO₄, como para o grupo controle.

904 Como mostrado na Tabela 4, não houve diferença significativa entre os tratamentos nos
 905 parâmetros dependentes do escuro para a fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima
 906 (Fm), fluorescência variável e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm), em
 907 ambas as condições experimentais ($p < 0,05$).

Tabela 04. Parâmetros fotoquímicos de fluorescência inicial (Fo), máxima (Fm), variável (Fv) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) em plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 – Controle, 0,5 mM, 1 mM e 2 mM)

[mM de NiSO ₄]	Cenário experimental	Fo	Fm	Fv	Fv/Fm
0,0	DAS-0	451,00 a	3441,33 a	2990,33 a	0,869 a
0,5		479,33 a	3342,00 a	2862,67 a	0,857 a
1,0		523,33 a	3285,33 a	2762,00 a	0,841 a

2,0		429,33 a	3243,00 a	2813,67 a	0,868 a
CV (%)		13,11	4,14	4,2	1,94
0,0		451,33 a	3556,33 a	3105,00 a	0,874 a
0,5		448,33 a	3594,33 a	3146,00 a	0,876 a
1,0	DAS-10	381,67 a	3612,67 a	3231,00 a	0,894 a
2,0		442,33 a	3612,33 a	3170,00 a	0,877 a
CV (%)		22,71	4,37	4,27	2,81

908 Valores médios seguidos pelas mesmas letras em uma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao
909 nível de 0,05 ($p < 0,05$).

910

911 **6.3 Conteúdo de pigmentos fotossintéticos em plantas de feijão-caupi**

912

913 Não houve efeito de interação entre os fatores estudados para o conteúdo de clorofila *a*
914 (Chl*a*), clorofila *b* (Chl*b*) e clorofilas totais (Chl totais). Neste caso, os resultados estão sendo
915 apresentados a partir da média \pm DP. O conteúdo de Chl*a* foi singelamente menor para os
916 tratamentos submetidos as doses crescentes de NiSO₄ desde a semeadura (Fig. 12-A). O estresse
917 por NiSO₄ diminui o teor de clorofilas *a* em cerca de 5,06, 3,03 e 3,64%, para as concentrações
918 de 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, respectivamente, quando comparado o cenário DAS-10 com o DAS-
919 0 (Fig. 12-A). De forma contrária, foi observado que o conteúdo de clorofilas *b* aumentou
920 expresivamente com o aumento das concentrações de NiSO₄, em ambos cenários experimentais,
921 sendo o DAS-0 o que apresentou valores maiores (Fig. 12-B). Quando comparado ao grupo de
922 plantas controle, na maior dose de Ni (II), o conteúdo de Chl*b* foi 1,26 vezes maior no cenário
923 DAS-0 e 1,49 vezes maior no DAS-10. De forma semelhante, o teor de clorofilas totais
924 aumentou com o aumento das concentrações de NiSO₄ (Fig. 12-C). O conteúdo de carotenoides
925 não diferiu significativamente entre os tratamentos para o cenário DAS-0 ($p < 0,05$). No
926 entanto, para o grupo controle no cenário DAS-10, o teor de carotenoides foi significativamente
927 menor ($9,59 \pm 0,24$) quando comparado aos outros tratamentos, seguido pela maior dose de
928 NiSO₄ ($9,98 \pm 0,51$), conforme observado na Figura 12-D.

929

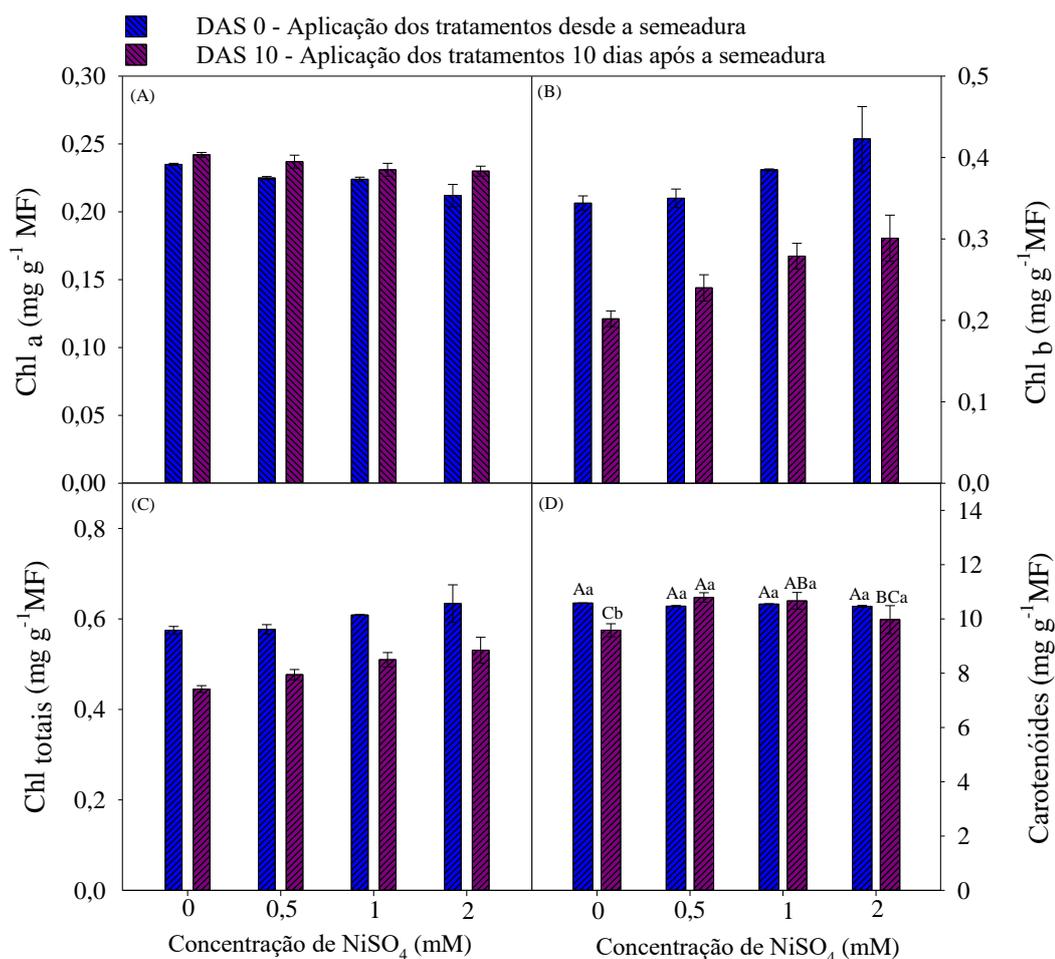


Figura 12. Efeito dos tratamentos induzidos por sulfato de níquel (NiSO₄) nos níveis dos pigmentos fotossintéticos: clorofila *a* (A) e (B), clorofila *b* (C) e (D), clorofilas totais (E) e (F) e carotenoide (G) em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise.

930

931 **6.4 Dano de membrana (DM), peroxidação lipídica (TBARS), conteúdo de H₂O₂ e** 932 **carboidratos solúveis totais (TSC)**

933

934 Não houve efeito de interação entre os fatores estudados para o índice de dano de
 935 membrana, medido pelo extravasamento de eletrólitos, neste caso, os resultados estão sendo
 936 apresentados a partir da média ± DP. O estresse ocasionado pelo NiSO₄ aumentou
 937 significativamente o DM com o aumento das concentrações, aproximadamente 28, 49 e 62%

938 maior que o controle para as concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, respectivamente, no
939 cenário DAS-0 e 14, 29 e 62% no DAS-10 (Fig. 13-A).

940 Como mostrado na Figura 13-B, a tendência de aumento do teor MDA (caracterizado por
941 TBARS) se dá pelo aumento das concentrações de NiSO₄. É possível observar um aumento
942 gradativo de 24,66, 56,67 e 75%, para as doses 0,5 mM, 1 mM e 2mM, respectivamente, quando
943 comparados ao controle para o cenário DAS-0. Em relação o cenário DAS-10, houve a mesma
944 tendência de aumento do teor de MDA com o aumento das concentrações, no entanto, não
945 houve diferença significativa entre a menor dose (0,5 mM) e a dose intermediária (1 mM) de
946 NiSO₄.

947 O estresse provocado pelo sulfato de níquel levou ao acúmulo de peróxido de hidrogênio
948 (H₂O₂) no cenário DAS-0 (Fig. 13-C). Este radical livre aumento cerca de 60,70, 159,62 e
949 173,29%, com o aumento das concentrações (0,5 mM, 1 mM e 2 mM, respectivamente), quando
950 comparado as plantas controles, embora não diferiu significativamente entre a menor dose e a
951 intermediária. No cenário DAS-10, as plantas do grupo controle apresentaram o menor
952 conteúdo de H₂O₂, contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos com NiSO₄.

953 O conteúdo de carboidratos solúveis totais (TSC) aumentou significativamente no cenário
954 DAS-0 com o aumento das doses de NiSO₄, equivalente a 19,33, 46,91 e 91,08%, para as
955 concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 2mM, respectivamente, quando comparado ao controle (Fig.
956 13-D). No entanto, notam-se variações acentuadas o cenário DAS-10, no qual o grupo controle
957 apresentou o maior teor de TSC (176,36 ± 0,92), seguida pelo tratamento com maior dose de
958 NiSO₄ (159,15 ± 1,42), embora sem diferença significativa entre a menor dose (136,48 ± 4,06)
959 e a dose intermediária (134,15 ± 1,37).

960

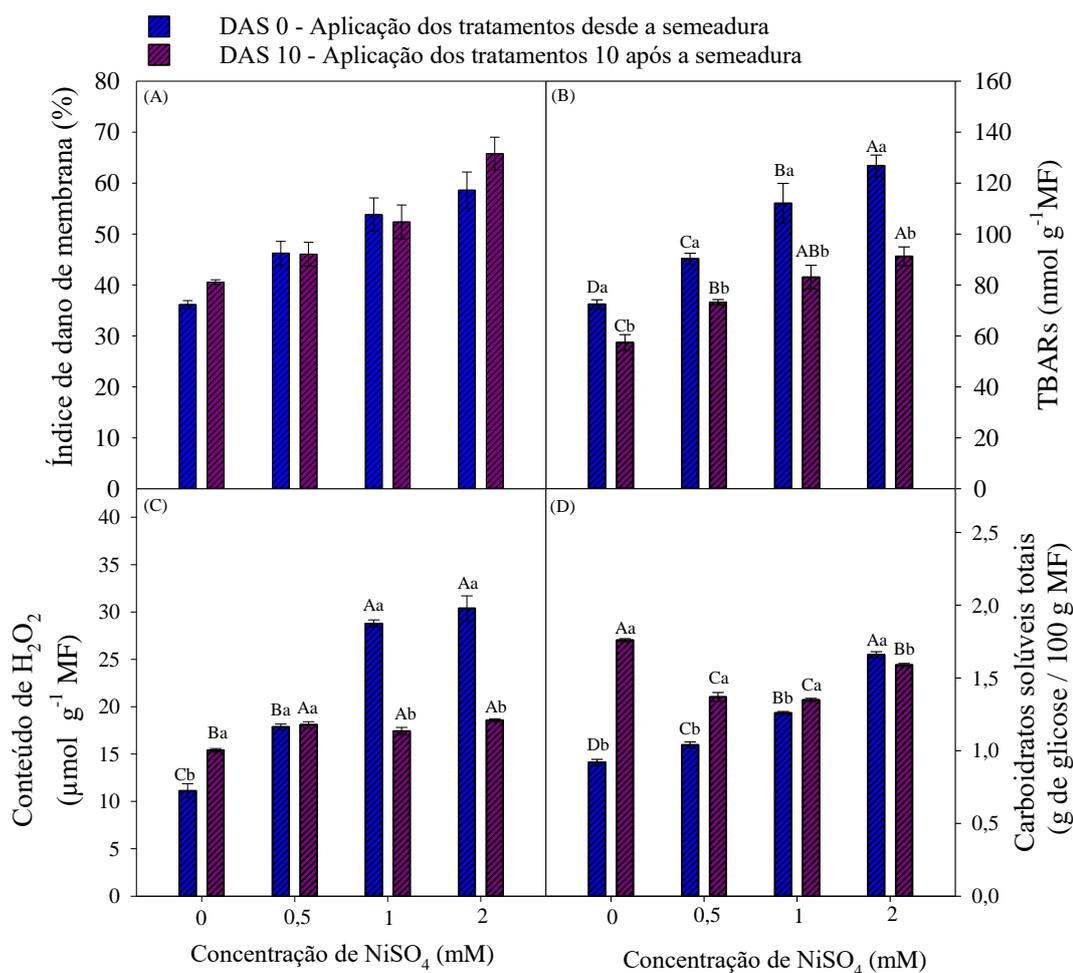


Figura 13. Dano de membrana quantificado pelo extravasamento de eletrólitos (A e B) e peroxidação lipídica (C), produção de espécies reativas de oxigênio determinada pelo conteúdo de peróxido de hidrogênio (D) e conteúdo de carboidratos solúveis totais em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise.

961

962 **6.5 Conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC), ácido ascórbico (AA), captura do** 963 **radical DPPH e poder de redução do ferro (FRAP)**

964

965 Não houve efeito de interação entre os fatores estudados para o conteúdo de compostos
 966 fenólicos totais, neste caso, os resultados estão sendo apresentados a partir da média ± DP. O
 967 incremento das concentrações de NiSO₄ aumentou significativamente o TPC nas folhas de
 968 feijão-caupi, com valores de 1,12, 1,16 e 1,21 vezes maior para as doses de 0,5 mM, 1 mM e

969 2mM, respectivamente, quando comparado ao controle no cenário DAS-0 e 1,12, 1,15 e 1,24
970 vezes maior para o DAS-10 (Figura 14-A).

971 O teor de ácido ascórbico foi significativamente aumentado pelo estresse ocasionado pelo
972 sulfato de níquel no cenário DAS-0 (Fig. 14-B). Quando submetidas a dose máxima de NiSO₄ (2
973 mM), as plantas de feijão-caupi aumentaram o teor AA em cerca de 49,56%, quando
974 comparadas ao grupo controle. No cenário DAS-10, foi observada a mesma tendência de
975 aumento do conteúdo de AA, no entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos
976 com 1 mM (504,46 ± 7,65) e 2 mM (521,86 ± 5,01) de NiSO₄. No que diz respeito ao tempo de
977 aplicação dos tratamentos, o teor de AA foi maior no cenário DAS-0 para as maiores
978 concentrações de NiSO₄ (1 mM e 2 mM), enquanto que para o cenário DAS-10 o conteúdo foi
979 maior para o grupo controle e o de menor dose de sulfato de níquel (0,5 mM).

980 A capacidade antioxidante, medida com base na atividade de eliminação do radical DPPH
981 e redução do ferro (FRAP), foi detectada em todos os tratamentos (Fig. 14-C e D). Plantas de
982 feijão-caupi quando submetidas a dose máxima de sulfato de níquel (2 mM) apresentaram
983 atividade sequestradora de DPPH e FRAP significativamente maiores em relação aos demais
984 tratamentos, exceto pela eliminação de DPPH no cenário DAS-10, que apresentou um baixo
985 poder de eliminação, cerca de 8,79% maior que o controle do mesmo cenário, não diferindo
986 estatisticamente do tratamento com a menor concentração (0,5 mM) de NiSO₄. A maior
987 atividade de eliminação de DPPH foi verificada no tratamento com 1mM, cerca de 23,21%
988 maior que o grupo controle (Fig. 14-C). No cenário DAS-10, o grupo controle e o tratamento
989 com a menor dose NiSO₄ não diferiram entre si em relação atividade FRAP (Fig. 14-D).

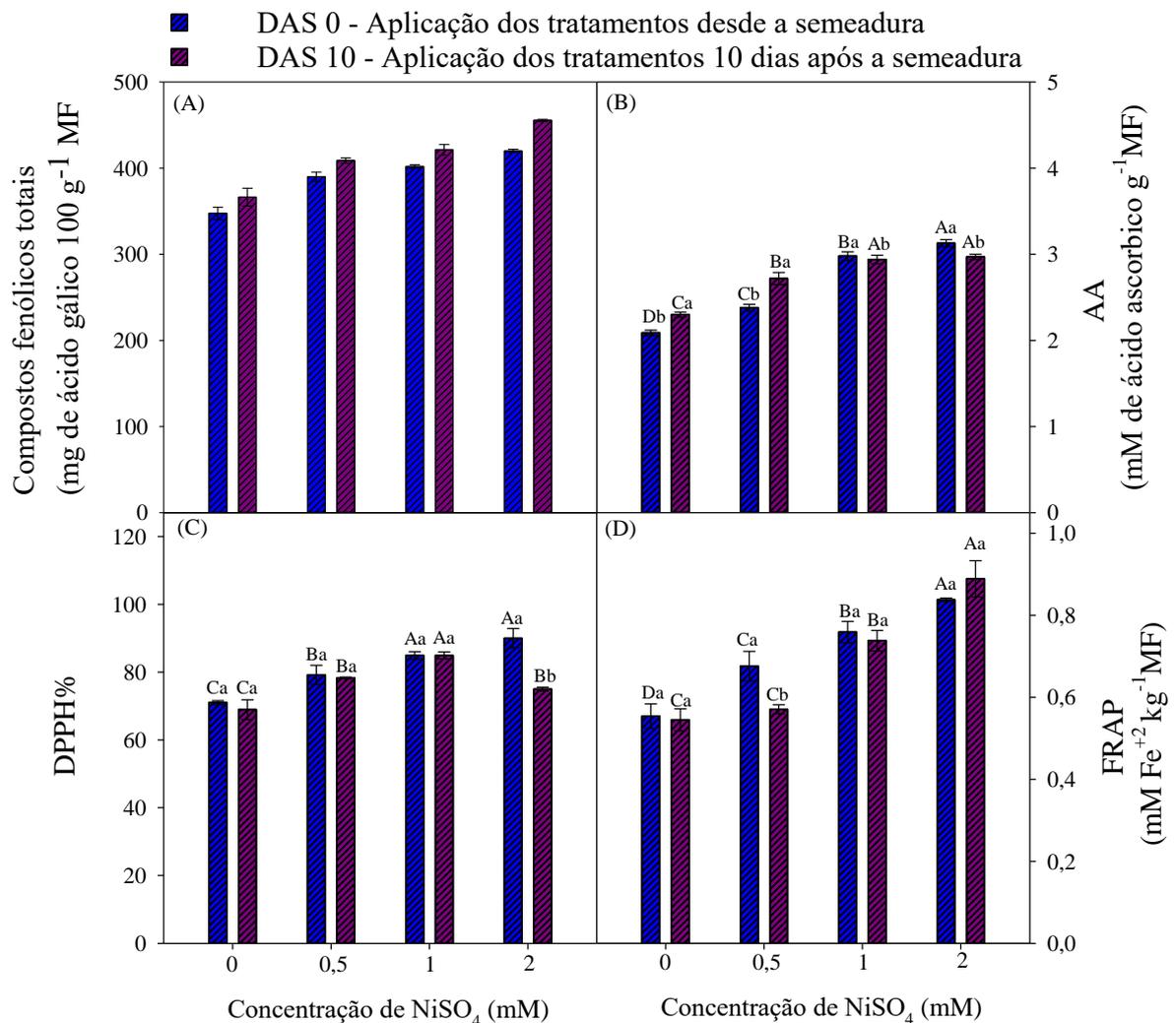


Figura 14. Atividade antioxidante quantificada por meio do teor de compostos fenólicos totais (A) e (B), ácido ascórbico (C), atividade sequestradora de (D) DPPH (%) e (E) FRAP em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise.

990 6.6 Atividade antioxidante enzimática e conteúdo de proteínas solúveis totais (TPS)

991 A capacidade antioxidante enzimática medida com base na atividade das enzimas catalase
 992 e ascorbato peroxidase foi detectada em todos os tratamentos (Fig.15-A e B). No cenário DAS-
 993 0, o aumento da concentração de NiSO₄ (0,5 mM, 1 mM e 2 mM) levou a um aumento
 994 considerável da atividade da CAT em 4,01, 4,72 e 6,30 vezes mais que o grupo controle,
 995 respectivamente, embora sem diferenças significativas para os tratamentos com doses de 0,5 e

996 1 mM. No entanto, no cenário DAS-10, o comportamento de atividade da CAT apresentou
 997 variações. Os maiores valores foram observados na concentração de 1 mM de NiSO₄, não
 998 havendo diferença significativa para o grupo controle e de maior dose de NiSO₄ (Fig. 15-A).

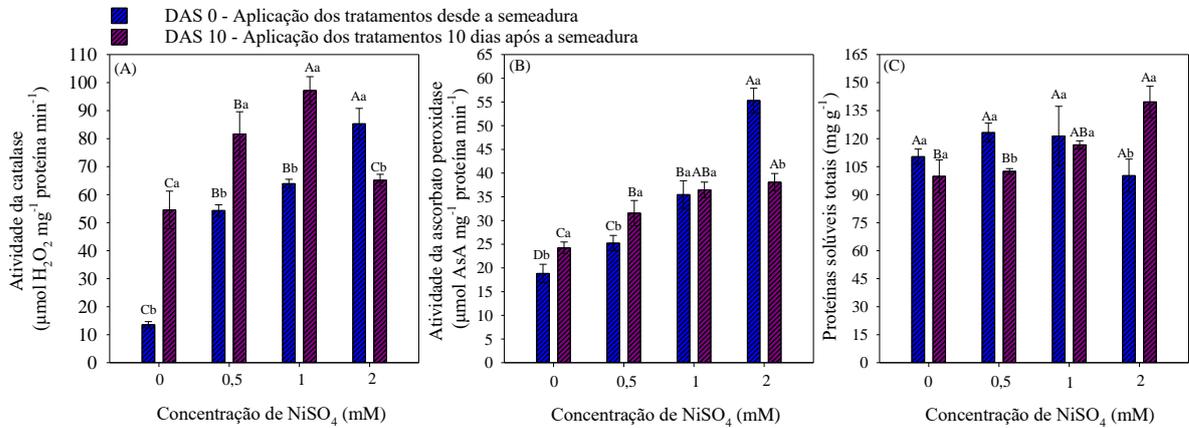


Figura 15. Atividade antioxidante das enzimas catalase (A), ascorbato peroxidase (B) e teor de proteínas solúveis totais (C) em folhas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetidas a concentrações crescentes de NiSO₄ (0 mM (controle), 0,5 mM, 1 mM e 2mM) durante 30 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). As letras diferentes indicam diferença significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As letras maiúsculas comparam os diferentes níveis de concentração de NiSO₄ e letras minúsculas comparam os tempos de análise.

999

1000 Em relação à proteção antioxidante da APX, a atividade foi significativamente aumentada
 1001 com o aumento das concentrações de NiSO₄ no cenário DAS-0, cerca de 1,34, 1,88 e 2,94 vezes
 1002 maior que o controle, para as concentrações de 0,5 mM, 1 mM e 2 mM, respectivamente. No
 1003 entanto, no cenário DAS-10, houve a tendência de aumento da atividade com o aumento das
 1004 doses, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos com a menor dose e dose
 1005 intermediária (Fig. 15-B). Comparado o fator tempo de aplicação, a maior atividade das
 1006 enzimas CAT e APX foram verificadas para o cenário DAS-10 nas concentrações de 0 mM 0,5
 1007 mM e 1 mM. Por outro lado, a atividade das enzimas em plantas submetidas a 2 mM de
 1008 NiSO₄ foi maior no cenário DAS-0.

1009 Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o conteúdo de proteínas
 1010 solúveis totais no cenário DAS-0 (p > 0,05). Entretanto, no cenário DAS-10 o tratamento com
 1011 a maior dose de NiSO₄ (2 mM) apresentou o maior conteúdo de TPS (139,65 ± 8,38), não
 1012 havendo diferenças significativas entre as concentrações de 0 mM (controle), 0,5 mM e 1 mM
 1013 (Fig. 15-C).

1014 **6.7 Associação das variáveis com a análise de componentes principais (PCA)**

1015

1016 Na análise de componentes principais que incluem a aplicação das doses crescentes de
1017 sulfato de níquel desde a semeadura (0 mM-DAS0; 0,5 mM-DAS0; 1 mM-DAS0 e 2 mM-
1018 DAS0) e 10 dias após a semeadura (0mM-DAS10; 0,5 mM-DAS10; 1 mM-DAS10 e 2 mM-
1019 DAS10), 81,64% da variação total dos dados foi explicada por duas componentes principais
1020 (PC1=54,97% e PC2= 26,64%) (Fig.16). Os tratamentos com as duas maiores doses de NiSO₄,
1021 quando aplicados desde a semeadura (1 mM-DAS0 e 2 mM-DAS0) foram positivamente
1022 correlacionados entre si e apresentaram correlação positiva com o conteúdo de Car, Chlb, Chl
1023 Total, TPS, TBARS, H₂O₂, DPPH, FRAP, APX, IDM, AA, APX e TPC. Os pesos positivos
1024 desse componente tiveram maior associação com 2 mM-DAS0. Estas mesmas variáveis (1 e 2
1025 mM-DAS0) se correlacionaram negativamente com o potencial hídrico foliar (Ψ_w), Chla, Teor
1026 de matéria seca da raiz (TMS-root), altura da planta (length), massa seca da raiz (DW-root),
1027 massa fresca da folha (FW- leaves) e espessura do caule (EC), que estavam positivamente
1028 correlacionadas com o grupo controle no cenário que recebeu os tratamentos 10 dias após a
1029 semeadura (0-DAS10). Por outro lado, os tratamentos com 1 mM e 2 mM-DAS10 foram
1030 positivamente correlacionados entre si e apresentaram correlação positiva com a massa seca
1031 dos nódulos (DW-nodules), Fv/Fm, NPQ, TSC e CAT (os pesos deste componente tiveram
1032 maior associação com 2mM-DAS10). Por fim, estas mesmas variáveis (1 mM e 2 mM-DAS10)
1033 se correlacionaram negativamente com os tratamentos de 0 mM e 0,5 mM-DAS0, os quais
1034 apresentaram correlação positiva com g_s , $\Delta F/F_m$, SLA, ETR, qp e Fo. Neste componente,
1035 apenas a variável g_s teve uma maior correlação com 0 mM-DAS10.

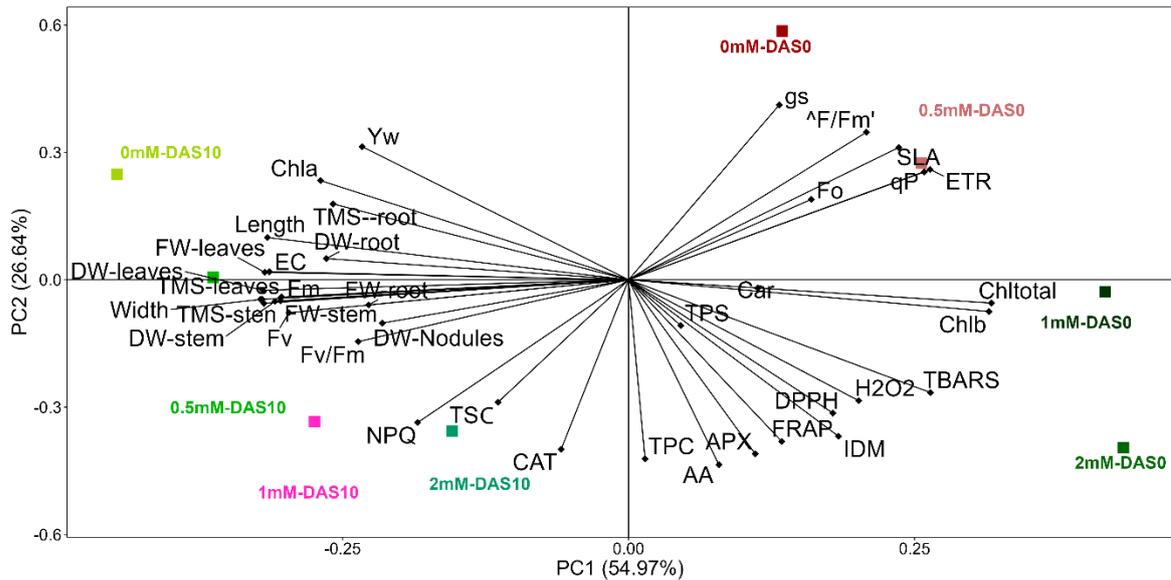


Figura 16. Análise de componentes principais (PCA) entre os parâmetros de crescimento da planta: comprimento (Length), largura (Width) e espessura do caule (EC); área foliar específica (SLA); massa fresca da folha (FW-leaves), caule (FW-stem) e raiz (FW-root), massa seca da folha (DW-leaves), caule (DW- stem) e raiz (DW- root), teor de matéria seca das folhas (TMS-leaves), caule (TMS-stem), raiz (TMS-root) e massa seca dos nódulos (DW-nodules). Parâmetros fotoquímicos inicial (Fo), máximo (Fm) e variável (Fv) de fluorescência; rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm); rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/Fm'$); quenching fotoquímico (qP); quenching não fotoquímico (NPQ); taxa relativa de transporte de elétrons (ETR, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Condutância estomática (gs); potencial hídrico foliar (Ψ_w); teor de clorofila (Chla), (Chlb) e (Chltotal) e carotenoides (Car); teor de carboidratos solúveis (TSC), ácido ascórbico (AA), compostos fenólicos totais (TPC), conteúdo de H₂O₂; peroxidação lipídica (TBARS) e índice de dano de membrana (IDM). Capacidade antioxidante não enzimática (FRAP) e (DPPH); Capacidade antioxidante enzimática (CAT) e (APX); conteúdo de proteínas solúveis totais (TPS).

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046 7. DISCUSSÃO

1047

1048 O presente estudo teve como principal escopo a busca de informações sobre o efeito
1049 fitotóxico do estresse ocasionado pelo níquel em seus parâmetros morfológicos, fisiológicos e
1050 bioquímicos, a fim de fornecer subsídios sobre o entendimento dos mecanismos de defesa de
1051 plantas de feijão-caupi quando expostas a esse metal desde a semente e dez dias após a
1052 semente. Os resultados apresentados indicam que as plantas de *Vigna unguiculata* foram
1053 severamente afetadas pelo sulfato de níquel, principalmente quando aplicados desde a fase
1054 inicial do seu desenvolvimento, no entanto, responderam de forma eficiente, ativando vários
1055 sistemas de defesa a fim de mitigar os danos causados.

1056 Em geral, os parâmetros morfométricos da parte aérea das plantas, foram
1057 significativamente afetados pela presença do sulfato de níquel (Fig.5). É importante destacar
1058 que a diferença no desenvolvimento do feijão-caupi entre os tratamentos pode estar
1059 intrinsecamente relacionada a uma determinada restrição do crescimento radicular (Fig. 7),
1060 onde é possível notar visualmente que as doses de níquel (principalmente as mais altas (1 e 2
1061 mM)) inibiram seu desenvolvimento, tornando-as menos desenvolvidas do que a do grupo
1062 controle. Consequentemente, é possível observar uma diminuição significativa no tamanho dos
1063 folíolos (Fig. 6). Resultados semelhantes foram encontrados por Helou et al. (2022) ao
1064 verificar o efeito tóxico da exposição do Ni (II) (na faixa de 250 e 500 mg/kg) em plantas de
1065 *Vicia faba*, na qual foi verificada uma inibição significativa do crescimento da parte aérea e das
1066 raízes, semelhante ao observado por Mujeeb et al. (2019) ao estudar a faixa de concentração de
1067 0,6 a 2,4 mM de sulfato de níquel em plantas de *Vigna unguiculata*. Odjegba e Fasidi (2004)
1068 ao estudar o efeito tóxico do níquel (0,3 mM) em plantas de *Pistia stratiotes* destacaram a
1069 inibição do desenvolvimento da raiz e diminuição gradual da área foliar.

1070 A redução de alocação de biomassa para raízes é uma das principais causas das alterações
1071 negativas das relações hídricas das plantas causadas pela exposição à metais tóxicos, uma vez
1072 que essa desempenha função importante na absorção de água e nutrientes (VATS et al., 2021).
1073 Neste estudo, a análise do acúmulo de biomassa mostrou efeitos tóxicos pela sua diminuição
1074 nas plantas de feijão-caupi em função das concentrações de NiSO₄ estudadas (Fig.7).
1075 Resultados semelhantes foram constatados por Hammami et al. (2022) que avaliaram o
1076 comportamento do Ni (II) em relação à sua influência na simbiose do *Phaseolus vulgaris*
1077 (feijoeiro) e observaram uma diminuição significativa da massa seca da raiz e parte aérea sob

1078 doses de 0,6 a 2,4 mM de NiCl₂. Kováčik et al. (2019) ao estudarem o efeito tóxico do níquel
1079 (0,03 mM) em plantas de *Taraxacum* verificaram a depleção da biomassa da raiz. O mesmo foi
1080 verificado por Ker e Charest (2010), no qual concentrações de 0,4 e 0,8 mM de Ni (II)
1081 diminuíram a massa total de plantas de *Helianthus annuus* L e da razão raiz/parte aérea.
1082 Resumidamente, a toxicidade do Ni tem impactos negativos na germinação das sementes e
1083 subsequente crescimento das plantas devido à redução nos processos metabólicos, elasticidade
1084 da parede celular, divisões celulares e assim reduzindo a absorção e transporte de água e
1085 minerais pelo vegetal (HASSAN et al., 2019; BHALERAO; SHARMA; POOJARI, 2015).

1086 Poluentes ambientais, como os metais tóxicos, podem causar danos ao crescimento de
1087 rizóbios e suas leguminosas hospedeiras, no entanto, quando estabelecem simbiose, os metais
1088 tóxicos são acumulados preferencialmente nos nódulos, diminuindo assim a toxicidade dos
1089 metais para a planta hospedeira (STAMBULSKA; BAYLIAK; LUSHCHAK, 2018). Deste
1090 modo, analisando os resultados encontrados neste trabalho, é pertinente relacionar que os danos
1091 menos acentuados encontrados no grupo de plantas do cenário DAS-10 pode também estar
1092 associada a sua maior massa seca de nódulos, nos quais proporcionaram uma minimização do
1093 estresse ocasionado pelo Ni (II), considerando também que, esse grupo de plantas possuía um
1094 sistema radicular já desenvolvido quando começaram a receber os tratamentos. Um trabalho
1095 realizado por Sujkowska-Rybkowska et al., (2020) identificou pela primeira vez que os nódulos
1096 de *Lotus corniculatus* são habitados por rizobactérias benéficas tolerantes a metais, promotoras
1097 de crescimento, com o potencial de melhorar o crescimento das plantas e aliviar o estresse de
1098 Ni. A diminuição da massa seca dos nódulos observado nos tratamentos com NiSO₄ nesse
1099 mesmo cenário (DAS-10) também sugerem o seu efeito tóxico. O mesmo foi observado no
1100 trabalho realizado por Hammami et al., (2022) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus*
1101 *vulgaris*), no qual foram observadas a diminuição das características (quantidade, diâmetro e
1102 massa seca) dos nódulos com o aumento das concentrações de Ni.

1103 A medida de abertura dos estômatos verificada a partir da condutância estomática (*gs*) é
1104 um dos fatores mais eficazes nas trocas gasosas, fotossíntese, transpiração, absorção de água e
1105 resfriamento das plantas (ASHRAF; HARRIS, 2013). Foi verificado que a *gs* respondeu de
1106 forma eficiente para as condições climáticas do ambiente nos grupos controle, no entanto, a
1107 toxicidade induzida pelas doses mais altas de sulfato de níquel reduziu significativamente a *gs*
1108 nas folhas de feijão-caupi (Fig. 9). De forma semelhante, estudos mostram que o estresse por
1109 Ni induziu o fechamento dos estômatos reduzindo significativamente a condutância estomática

1110 em plantas de *Gossypium hirsutum* L (KHALIQ et al., 2016), *Brassica juncea* (ZAID et al.,
1111 2019), *Solanum lycopersicum* (JAHAN et al., 2020) e *Glycine max* (SADEGHIPOUR, 2021).
1112 Esses resultados podem ser atribuídos a uma diminuição da área foliar e ao teor de água na
1113 folha, bem como ao nível de ácido abscísico (ABA), hormônio que ajusta vários aspectos da
1114 fisiologia da planta e pode regular o desenvolvimento da epiderme na parte aérea, inibindo o
1115 desenvolvimento estomático (AMEEN et al., 2019; BROOKBANK et al., 2021).

1116 A toxicidade de metais como o níquel reduzem substancialmente o movimento da água
1117 das raízes para a parte aérea, o que acaba ocasionando a sua desidratação (CHEN; LI; SHEN,
1118 2004), podendo inclusive causar danos às aquaporinas, o que dificulta o transporte de água
1119 através das membranas biológicas (BAHMANI-BABANARI et al., 2021). Neste trabalho, o
1120 estresse induzido pelo Ni perturbou as relações hídricas das plantas de forma severa em
1121 concentrações elevadas (1 mM e 2 mM) levando a diminuição do potencial hídrico foliar (Ψ_w)
1122 (Fig. 10). Esses resultados concordam com a pesquisa realizada por Jagetiya, Soni e Yadav
1123 (2013) onde foi observado que concentrações inibidoras de crescimento de Ni (II) (10, 100 e
1124 1.000 μ M) diminuíram significativamente o Ψ_w em plantas de *Vigna radiata*.

1125 A fluorescência da clorofila *a* pode refletir a capacidade da regulação fotossintética das
1126 plantas e a eficiência fotoquímica pode ser usada para avaliar as respostas fisiológicas das
1127 plantas a agente estressores (RASCHER; LIEBIG; LÜTTGE, 2000). Os altos valores de
1128 fluorescência do quenching não fotoquímico (NPQ) encontrados neste trabalho para a maior
1129 dose de níquel indica que a dissipação excessiva de calor no fotossistema II se refletem como
1130 uma ação fotoprotetora das plantas (JARDIM et al., 2021). Esse fato pode estar relacionado
1131 com a redução dos valores encontrados para a condutância estomática, no qual o fechamento
1132 estomático dificulta substancialmente as trocas gasosas na superfície da folha, diminuindo
1133 assim a taxa de fotossíntese, aumentando a temperatura da superfície foliar. Esses resultados
1134 correspondem com o estudo feito por Yong et al. (2019) em microalgas tropicais (*Scenedesmus*
1135 *quadricauda*), onde foi identificado que o aumento de NQP quando exposto a maior
1136 concentração de níquel (10 ppm) pode indicar o início do processo de dissipação térmica como
1137 mecanismo de autoproteção contra a toxicidade do Ni(II). Hassan et al. (2019) destacam que a
1138 redução da eficiência fotossintética ocasionada pela toxicidade do Ni(II) pode estar relacionada
1139 a vários fatores, desde a perturbação do transporte de elétrons durante a reação de luz no
1140 fotossistema II, quanto a redução nas atividades de enzimas envolvidas na fotossíntese e síntese
1141 do conteúdo de clorofila.

1142 Os parâmetros analisando a partir da fluorescência da clorofila a (Fo, Fm, Fv e Fv/Fm),
1143 são comumente utilizados como indicadores de sensibilidade nas plantas, como exemplo, em
1144 condições normais, o rendimento quântico máximo do fotossistema (Fv/Fm) é superior 0,80,
1145 no entanto, valores inferiores indicam a presença de estresse na planta (MAXWELL;
1146 JOHNSON, 2000). Deste modo, analisando os resultados obtidos neste trabalho, é possível
1147 afirmar que não houve dano fotoquímico nas plantas de feijão-caupi em ambas condições
1148 analisadas.

1149 Efeitos adversos foram observados sob os tratamentos com doses crescentes de sulfato de
1150 níquel no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Os resultados desta pesquisa indicaram que o
1151 teor de Chla reduziu significativamente com o aumento das doses de Ni(II) (Fig. 13-A). É bem
1152 demonstrado na literatura que a toxicidade do Ni(II) perturba a estrutura de cloroplastos e reduz
1153 a biossíntese de clorofilas (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2006). Esses achados são
1154 semelhantes com os resultados encontrados no ensaio de toxidez com o Ni(II) em plantas de
1155 *Phaseolus vulgaris* (ZENGIN, 2013; HAMMAMI et al., 2022;), *Hordeum vulgare* (DOGRU;
1156 ALTUNDAG; DÖNDAR, 2021), *Vicia faba* (HELAOUI et al., 2022) e *Vigna unguiculata*
1157 (MUJEEB et al., 2019). No entanto, de forma contrária, os resultados desse estudo mostraram
1158 que o teor de clorofilas *b* aumentou consideravelmente com as maiores concentrações de NiSO₄
1159 (Fig. 13-B). Esse acréscimo pode ter se dado pela regulação negativa da atividade da enzima
1160 clorofila *a* oxigenase, que é responsável pela transformação da clorofila *b* em clorofila *a*
1161 (STREIT et al., 2005). Foi observado também que os teores de carotenoides em plantas que
1162 receberam as doses de níquel 10 dias após a semeadura foi menor no grupo controle (Fig. 13-
1163 D). Os carotenoides possuem importante função como antioxidantes contra os radicais livres e
1164 danos fotoquímicos, sendo assim, o seu maior conteúdo pode representar seu papel de suporte
1165 contra o estresse oxidativo (SENGAR et al., 2008).

1166 Metais tóxicos como o níquel degradam a permeabilidade da membrana devido a perda
1167 de osmólitos, e o seu excesso no meio de cultivo, resulta na formação de espécies reativas de
1168 oxigênio (EROs), sendo eles o íon superóxido (O²⁻), radical hidroxila (OH⁻) e peróxido de
1169 hidrogênio (H₂O₂), causados pelo desequilíbrio entre a desintoxicação e geração de EROs,
1170 principalmente através da desativação de componentes enzimáticos e não enzimáticos do
1171 sistema de defesa antioxidante (HASSAN et al., 2019). Neste estudo, observamos um aumento
1172 constante nos teores de H₂O₂ nas folhas de feijão-caupi submetidas aos tratamentos desde a
1173 semeadura (Fig.14-D), o que corrobora com os achados da toxidez do chumbo em *Vigna radiate*

1174 (CHEN et al., 2022) e do níquel na soja (MIR et al., 2018). Esse acúmulo de EROs observados
1175 nesse trabalho também correspondeu ao conteúdo do produto da peroxidação lipídica (medida
1176 por MDA) (Fig. 14-C), sugerindo alto nível de estresse oxidativo mediado por Ni em feijão-
1177 caupi, além de contribuir significativamente para o extravasamento de eletrólitos (Fig. 14-A)
1178 (YANG et al., 2020).

1179 Segundo dados de uma revisão recente, o acúmulo de carboidratos solúveis em condições
1180 ambientais adversas (incluindo poluentes metálicos) não está completamente claro
1181 (KOFROŇOVÁ; MAŠKOVÁ; LIPAVSKÁ, 2018). No entanto, estudos relatam que os
1182 carboidratos além de agirem como fontes de carbono e energia, são importantes antioxidantes
1183 que contribuem para a extinção de EROs, representando parte integrante do sistema de defesa
1184 antioxidante das plantas (MATROS et al., 2015). Nos achados deste estudo observou-se um
1185 acúmulo significativo do TSC com o aumento das concentrações de NiSO₄ para o cenário
1186 experimental no qual as plantas receberam as doses de Ni desde a sementeira (Fig. 14-E),
1187 sugerindo potencial defesa desse grupo de plantas contra estresses oxidativos. Esses resultados
1188 corroboram com a pesquisa realizada por Jha e Dubey (2005), os quais estudaram o impacto do
1189 arsênio nos eixos embrionários das sementes em germinação de arroz e relataram níveis
1190 crescentes carboidratos solúveis com o aumento da concentração de arsênio no meio de cultura,
1191 porém, no endosperma, observaram diminuição de seus níveis, sugerindo que o metabolismo
1192 de carboidratos é influenciado durante o crescimento e desenvolvimento das plantas.

1193 Por outro lado, o aumento na concentração de metais tóxicos leva à diminuição do
1194 conteúdo total de clorofila, diminuindo conseqüentemente o teor de carboidratos solúveis
1195 (KÜPPER; KÜPPER; SPILLER, 1998). Os resultados deste estudo mostram que as plantas do
1196 grupo controle no cenário no qual receberam as doses de Ni(II) 10 dias após a sementeira
1197 apresentaram maior acúmulo de carboidratos. Esse mesmo grupo de plantas apresentou maior
1198 teor de clorofilas *a*, sugerindo que a diminuição do TSC em plantas expostas ao NiSO₄ está
1199 relacionada com a inibição da biossíntese de clorofila. Esses resultados são semelhantes aos
1200 achados por El-Khatib et al. (2020), que investigaram o potencial de tolerância de cádmio,
1201 chumbo e cobre em *Eucalyptus globulus* e *Ficus nitida* e identificaram que teor de carboidratos
1202 solúveis nas folhas diminuiu significativamente com a diminuição do teor de clorofila, que no
1203 que lhe concerne, diminuiu com o aumento das concentrações de metais pesados.

1204 Neste trabalho o aprimoramento do sistema de defesa antioxidante não enzimático das
1205 plantas de feijão-caupi foi verificado a partir do conteúdo de compostos fenólicos totais (TPC)

1206 e ácido ascórbico (AA), além dos métodos de captura do radical DPPH (2, 2-difenil-1-
1207 picrilhidrazil) e poder de redução do ferro (FRAP). Os compostos fenólicos são uma classe de
1208 fitoquímicos que contêm sequestrantes de radicais livres e por tanto desempenham papel
1209 importante na prevenção ao estresse oxidativo (UNUIGBE et al., 2019; FRANCIK et al., 2020).
1210 Sua capacidade antioxidante tem sido atribuída por atuarem como agentes doadores de elétrons,
1211 ou por formar complexos insolúveis com os cátions metálicos, reduzindo suas concentrações
1212 celulares (LAVID et al., 2001; SALINITRO et al., 2020). A esse respeito, nossos resultados
1213 mostram o acúmulo de TPC nas folhas de feijão-caupi induzida pela aplicação das
1214 concentrações crescentes de NiSO₄ (Fig. 15 A), sugerindo o fortalecimento da defesa
1215 antioxidante da planta. Esses achados concordam com os estudos da toxidez do Ni em *Eclipta*
1216 *prostrata* (100 mg/kg) (CHANDRASEKHAR; RAY, 2018) *Vigna unguiculata* (0,6-2,4 mM)
1217 (MUJEEB et al., 2019) e no dente-de-leão comum (30 μM) (KOVÁČIK et al., 2019).

1218 O ácido ascórbico (AA) desempenha importante papel nas vias biossintéticas, de
1219 desintoxicação, bioquímicas antioxidantes e homeostase redox, ajudando assim a combater o
1220 estresse oxidativo (SHA et al., 2020). No geral, nossos estudos demonstram que o conteúdo de
1221 AA serviu como componente importante no mecanismo de defesa antioxidante em folhas de
1222 feijão-caupi, uma vez que níveis crescentes de AA foram acompanhados pelo aumento das
1223 concentrações de NiSO₄ (Fig. 15-C). Esses resultados foram conscientes aos achados por
1224 Zengin (2013) em mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) submetidos a concentrações de 0,1-0,5
1225 mM de Ni e em tomate (*Solanum lycopersicum*), com concentração de 100 mg/kg.

1226 De modo geral, a eliminação dos radicais pelo método DPPH e o poder de redução do
1227 ferro (FRAP) aumentaram significativamente com o aumento das concentrações de NiSO₄ (Fig.
1228 15-D e E), podendo então indicar maior capacidade de proteção oxidativa para as plantas de
1229 feijão-caupi. Resultados semelhantes foram encontrados em *Phaseolus vulgaris*, onde a maior
1230 eliminação de DPPH (%) foi observada na presença das maiores concentrações de Ni
1231 (HAMMAMI et al., 2022) e um aumento dos níveis de FRAP foram identificados no solo
1232 serpentinizado (com excesso desequilibrado de Ca²⁺/Mg²⁺ e Ni²⁺) em plantas de *Punica*
1233 *granatum* (CHATZISTATHIS et al., 2019). Esse padrão comportamental do aumento de DPPH
1234 e FRAP, concordava com o ter de compostos fenólicos. É importante destacar que a relação do
1235 TPC e capacidade antioxidante como resultado do DPPH, FRAP, bem como AA, tem sido
1236 frequentemente observados e considerados efeitos aditivos e sinérgicos de todos os potenciais
1237 antioxidantes contra o estresse oxidativo (FLOEGEL et al., 2011).

1238 A catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX) constituem os mecanismos enzimáticos
1239 de eliminação de EROs. A CAT atua na desintoxicação do H₂O₂, converto-o em água e
1240 oxigênio, já a APX também elimina o H₂O₂ (HAMMAMI et al., 2022), porém, requer um
1241 sistema de regeneração de ascorbato e GSH (glutationa), o ciclo ascorbato-glutationa (APEL;
1242 HIRT, 2004). Diante dos resultados desse estudo, verificou-se um aumento bastante
1243 significativo das atividades de defesa antioxidante da CAT e APX (Fig. 16-A e B),
1244 principalmente do cenário DAS-0. De forma semelhante aos resultados desse estudo, a
1245 atividade da CAT e APX apresentaram aumento nas altas concentrações de níquel em *Eclipta*
1246 *prostrata* (CHANDRASEKHAR; RAY, 2018), *Glycine max* (SADEGHIPOUR, 2021) e
1247 *Phaseolus vulgaris* (HAMMAMI et al., 2022).

1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269

1270 8. CONCLUSÃO

1271

1272 Nossos resultados indicam que a presença de sulfato de níquel (NiSO_4) casou toxicidade
1273 em plantas de feijão-caupi, levando a inibição sistêmica de seu desenvolvimento pela
1274 diminuição dos fatores morfológicos analisados, restrição do desenvolvimento de nódulos,
1275 bem como a redução do acúmulo de biomassa, restrição na biossíntese da clorofila *a* e alterações
1276 na clorofila *b* e carotenoides, contudo, não houve dano na eficiência fotoquímica da planta. O
1277 potencial hídrico, condutância estomática e conseqüentemente a taxa transpiração, mostraram
1278 uma relação negativa com as concentrações de Ni(II), já que esses parâmetros foram reduzidos
1279 pelo excesso desse sal. Danos oxidativos foram observados pelo aumento do extravasamento
1280 de eletrólitos, acúmulo de H_2O_2 e MDA. O conteúdo de carboidratos solúveis foi afetado de
1281 forma diferente mediante as fases de desenvolvimento do feijão-caupi. Além disso, o conteúdo
1282 de TPC, AA, porcentagem de eliminação de DPPH, FRAP e atividades das enzimas CAT e
1283 APX foram melhoradas na presença do NiSO_4 , principalmente no cenário DAS-0.

1284 De modo geral, foi observado que as plantas submetidas as concentrações crescentes de
1285 níquel após 10 dias da sementeira (fase em que as plantas estavam com as folhas primárias
1286 totalmente expandidas) apresentaram danos ligeiramente menores quando comparadas as que
1287 receberam desde a sementeira (fase de germinação). Esse fato pode ser observado mediante a
1288 análise de componentes principais (PCA) onde é possível observar que a maioria das análises
1289 de marcadores de estresse estão associados com o cenário de aplicação desde a sementeira.
1290 Desse modo, esses resultados sugerem que uma alternativa para implantação de feijão-caupi
1291 em solos contaminados seria o trasplante da cultura após o desenvolvimento das folhas
1292 primárias, pelo menos, a fim de garantir um melhor desenvolvimento da cultura. Entretanto,
1293 mais estudos seriam necessários com o objetivo de verificar o acúmulo de Ni (II) nas plantas
1294 de feijão-caupi, tanto na parte aérea como na raiz, buscando informações sobre sua capacidade
1295 de fitorremediar solos contaminados e evitar a biomagnificação a longo prazo.

1296

1297

1298

1299

1300

1301

1302

REFERÊNCIAS

- 1303 ADHIKARI, Tapan *et al.* Phytoaccumulation and Tolerance of *Riccinus Communis* L. to
1304 Nickel. **International Journal Of Phytoremediation**, v. 14, n. 5, p. 481-492.
- 1305 ALVARES, C.A *et al.* Koppen's climate classification map of Brazil. **Meteorologische**
1306 **Zeitschrift**, Germany, V. 22, n. 6, p. 711-728, 2014.
- 1307 AMARI, Taoufik *et al.* Why Does the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* Better
1308 Tolerate Ni Toxicity than *Brassica juncea*: implication of antioxidant defense systems. **Plants**,
1309 v. 9, n. 3, p. 312, 2020.
- 1310 AMEEN, N. *et al.* Biogeochemical behavior of nickel under different abiotic stresses: toxicity
1311 and detoxification mechanisms in plants. **Environmental Science and Pollution Research**,
1312 v. 26, n. 11, p. 10496–10514, 2019.
- 1313 AMN - Anuário Mineral Brasileiro: principais substâncias metálicas / Agência Nacional de
1314 Mineração, 2020.
- 1315 ANDRADE JÚNIOR, A. D. *et al.* Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp).
1316 Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 2002.
- 1317 ANDRADE JUNIOR, A. S *et al.* Evapotranspiração e coeficiente de cultura do feijão-caupi sob
1318 sistema de cultivo convencional e plantio direto. **Agrometeoros**, Passo Fundo, v.26, n.1, p.191-
1319 199, 2018.
- 1320 APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal
1321 transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- 1322 ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview.
1323 **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163–190, 2013.
- 1324 ATICI, Ö.; AĞAR, G.; BATTAL, P. Changes in phytohormone contents in chickpea seeds
1325 germinating under lead or zinc stress. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 2, p. 215–222, 2005.
- 1326 BAHMANI-BABANARI, Leila *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizal fungus, *Funneliformis*
1327 *fasciculatum*, on detoxification of Nickel and expression of TIP genes in *Lolium perenne* L.
1328 **Biologia**, v. 76, n. 6, p. 1675-1683, 2021.
- 1329 BEHURA R, *et al.* Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Methods in molecular biology**,
1330 2015.
- 1331 BHALERAO, S. A.; SHARMA, A. S.; POOJARI, A. C. Toxicity of Nickel in Plants.
1332 **International Journal of Pure and Applied Bioscience**, v. 3, n. 2, p. 345–355, 2015.
- 1333 BOUKAR, Ousmane *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata*): genetics, genomics and breeding.
1334 **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 415-424, 2018.

- 1335 BRADFORD, M. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254, 1976.
- 1336 BROOKBANK, B. P. et al. Role of basal aba in plant growth and development. **Genes**, v. 12,
1337 n. 12, 2021.
- 1338 CHANDRASEKHAR, C.; RAY, J. G. Soil and Sediment Contamination: An International
1339 Nickel accumulation, localisation and the biochemical responses in *Eclipta prostrata* (L .) L
1340 **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 00, n. 00, p. 1–20, 2018.
- 1341 CHANEY, Rufus L. *et al.* Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in
1342 *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. **Plant And Soil**, v. 311, n. 1-2, p.
1343 131-140, 2008.
- 1344 CHATZISTATHIS, T. et al. South African Journal of Botany Imbalanced Ca / Mg and Ni
1345 excess effects on the growth, nutrient uptake , photosynthesis and antioxidant response of
1346 *Punica granatum* (cv . Granada) plants. **South African Journal of Botany**, v. 127, p. 188–
1347 194, 2019.
- 1348 CHEN, F. et al. Mitigation of lead toxicity in *Vigna radiata* genotypes by silver nanoparticles.
1349 **Environmental Pollution**, v. 308, n. June, p. 119606, 2022.
- 1350 CHEN, Y.; LI, X.; SHEN, Z. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of
1351 plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. **Chemosphere**, v. 57, n. 3, p. 187–
1352 196, 2004.
- 1353 COELHO JÚNIOR, L. F. et al. Darkening, damage and oxidative protection are stimulated in
1354 tissues closer to the yam cut, attenuated or not by the environment. **Journal of the Science of**
1355 **Food and Agriculture**, v. 99, n. 1, p. 334–342, 15 jan. 2019.
- 1356 CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2022). Disponível em:
1357 [https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4777-pernambuco-safra-de-feijao-de-vera-crescer-](https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4777-pernambuco-safra-de-feijao-de-vera-crescer-13-em-producao-e-productividade)
1358 [13-em-producao-e-productividade](https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4777-pernambuco-safra-de-feijao-de-vera-crescer-13-em-producao-e-productividade). Data de acesso: 14/03/2023.
- 1359 CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2022). Disponível em:
1360 [https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/46568_78e4181129ec0019865a4171](https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/46568_78e4181129ec0019865a41719e63be70)
1361 [9e63be70](https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/46568_78e4181129ec0019865a41719e63be70). Data de acesso: 14/03/2023.
- 1362 CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente - RESOLUÇÃO Nº 420, DE 28 DE
1363 DEZEMBRO DE 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo
1364 quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento
1365 ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades
1366 antrópicas. Disponível em:
1367 <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/CONAMA/REA0420-281209.PDF>. Data de
1368 acesso: 23/11/2022.
- 1369 DA SILVA, R. J. A. B. et al. Influence of parent material on soil chemical characteristics in a
1370 semi-arid tropical region of Northeast Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**,

- 1371 v. 194, n. 5, 2022.
- 1372 DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical**
1373 **Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 35–56, 2002
- 1374 DOGRU, A.; ALTUNDAG, H.; DÖNDAR, M. The effect of nickel phytotoxicity on
1375 photosystem II activity and antioxidant enzymes in barley. **Acta Biologica Szegediensis**, v.
1376 65, n. 1, p. 1–9, 2021.
- 1377 DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.
1378 **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- 1379 EL-KHATIB, A. A. et al. Responses of Eucalyptus globulus and Ficus nitida to different
1380 potential of heavy metal air pollution. **International Journal of Phytoremediation**, v. 22, n.
1381 10, p. 986–999, 2020.
- 1382 EUGÊNIO, D. DA S. et al. Phosphate Fertilization as a Modulator of Enzymatic Browning in
1383 Minimally Processed Cassava. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 35, p.
1384 10058–10068, 8 set. 2021.
- 1385 FABIANO, Caio C. et al. Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. **Frontiers In**
1386 **Plant Science**, v. 6, 2015.
- 1387 FAO and UNEP. 2021. Global Assessment of Soil Pollution: Report. Rome. Disponível em:
1388 <<<http://www.fao.org/3/cb4894en/online/cb4894en.html>>>
- 1389 FLOEGEL, A. et al. Journal of Food Composition and Analysis Comparison of ABTS /
1390 DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods §.
1391 **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043–1048, 2011.
- 1392 FOURATI, Emna et al. Nickel tolerance and toxicity mechanisms in the halophyte *Sesuvium*
1393 *portulacastrum* L. as revealed by Ni localization and ligand environment studies.
1394 **Environmental Science And Pollution Research**, v. 27, n. 19, p. 23402-23410, 2019.
- 1395 FOURATI, Emna et al. Nickel tolerance, accumulation and subcellular distribution in the
1396 halophytes *Sesuvium portulacastrum* and *Cakile maritima*. **Plant Physiology And**
1397 **Biochemistry**, v. 108, p. 295-303, 2016.
- 1398 FOURATI, Emna et al. Physiological response and mineral elements accumulation pattern in
1399 *Sesuvium portulacastrum* L. subjected in vitro to nickel. **Chemosphere**, v. 219, p. 463-471,
1400 2019b.
- 1401 FRANCIK, S. et al. Identification of Phenolic Compounds and Determination of Antioxidant
1402 Activity in Extracts and Infusions of Salvia Leaves. p. 1–15, 2020.
- 1403 GE, Jun et al. Nickel tolerance, translocation and accumulation in a Cd/Zn co-
1404 hyperaccumulator plant *Sedum alfredii*. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 398, p.
1405 123074, 2020.

- 1406 GIANAZZA, E. et al. Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets
1407 exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 179–187,
1408 2007.
- 1409 HAMMAMI, H. et al. The behavior of heavy metals in relation to their influence on the
1410 common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbiosis. **Environmental and Experimental Botany**, v.
1411 193, n. September 2021, p. 104670, 2022.
- 1412 HARGREAVES, G. H.; SAMANI, Z. A. Estimating potential evapotranspiration. **Journal of**
1413 **Irrigation and Drainage Engineering**, v. 108, p. 225-230, 1982.
- 1414 HASSAN, M. U. et al. Nickel toxicity in plants: Reasons, toxic effects, tolerance
1415 mechanisms, and remediation possibilities—a review. **Environmental Science and Pollution**
1416 **Research**, v. 26, n. 13, p. 12673–12688, 2019.
- 1417 HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple
1418 Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**. v.84, p.450-455. 1987.
- 1419 HELAOUI, S. et al. The Effect of Nickel Exposure on Oxidative Stress of *Vicia faba* Plants.
1420 **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 108, n. 6, p. 1074–1080,
1421 2022.
- 1422 HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without**
1423 **soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.
- 1424 JAGETIYA, B.; SONI, A.; YADAV, S. Effect of nickel on plant water relations and growth
1425 in green gram. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 4, p. 372–376, 2013.
- 1426 JAHAN, M. S. et al. Melatonin alleviates nickel phytotoxicity by improving photosynthesis,
1427 secondary metabolism and oxidative stress tolerance in tomato seedlings. **Ecotoxicology and**
1428 **Environmental Safety**, v. 197, n. March, p. 110593, 2020.
- 1429 JARDIM, A. M. DA R. F. et al. Genotypic differences relative photochemical activity,
1430 inorganic and organic solutes and yield performance in clones of the forage cactus under
1431 semi-arid environment. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, n. November 2020, p.
1432 421–430, 2021.
- 1433 JHA, A. B.; DUBEY, R. S. Effect of arsenic on behaviour of enzymes of sugar metabolism in
1434 germinating rice seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 341–347, 2005.
- 1435 JUNIOR, A. S DE A, et al. Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). - Teresina:
1436 Embrapa Meio-Norte, 2002.
- 1437 KASNAK, C.; PALAMUTOGLU, R. Effect of Yogurt Serum on Enzymatic and Oxidative
1438 Activity in Fresh-Cut Potatoes. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 10, p. 1842–1848,
1439 nov. 2021.
- 1440 KER, K.; CHAREST, C. Nickel remediation by AM-colonized sunflower. **Mycorrhiza**, v.

- 1441 20, n. 6, p. 399–406, 2010.
- 1442 KHALIQ, A. et al. Silicon alleviates nickel toxicity in cotton seedlings through enhancing
1443 growth, photosynthesis, and suppressing Ni uptake and oxidative stress. **Archives of**
1444 **Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 5, p. 633–647, 2016.
- 1445 KOFROŇOVÁ, M.; MAŠKOVÁ, P.; LIPAVSKÁ, H. Two facets of world arsenic problem
1446 solution : crop poisoning restriction and enforcement of phytoremediation. **Planta**, v. 248, n.
1447 1, p. 19–35, 2018.
- 1448 KOVÁČIK, J. et al. Dandelion is more tolerant to cadmium than to nickel excess.
1449 **Chemosphere**, v. 224, p. 884–891, 2019.
- 1450 KRAMER, U. et al. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by
1451 *thlaspi goesingense halacsy*. **Plant Physiology**, v. 115, n. 4, p. 1641-1650, 1997.
- 1452 KUMAR, A. et al. Nickel in terrestrial biota: Comprehensive review on contamination,
1453 toxicity, tolerance and its remediation approaches. **Chemosphere**, v. 275, p. 129996, 2021.
- 1454 KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. In situ detection of heavy metal substituted
1455 chlorophylls in water plants. **Photosynthesis Research**, v. 58, n. 2, p. 123–133, 1998.
- 1456 KÜPPER, Hendrik *et al.* Nickel in the Environment and Its Role in the Metabolism of Plants
1457 and Cyanobacteria. **Nickel And Its Surprising Impact In Nature**, p. 31-62, 9, 2007.
- 1458 KURIAKOSE, S. V.; PRASAD, M. N. V. Cadmium stress affects seed germination and
1459 seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing
1460 enzymes. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 2, p. 143–156, 2008.
- 1461 LAVID, N. et al. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal
1462 accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). 2001.
- 1463 MAKONYA, G. M. et al. Chlorophyll fluorescence and carbohydrate concentration as field
1464 selection traits for heat tolerant chickpea genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.
1465 141, n. March, p. 172–182, 2019.
- 1466 MATROS, A. et al. Sugars as hydroxyl radical scavengers: Proof-of-concept by studying the
1467 fate of sucralose in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 82, n. 5, p. 822–839, 2015.
- 1468 MAXWELL, Kate; JOHNSON, Giles N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **Journal**
1469 **Of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.
- 1470 MEDEIROS, Salomão de Souza; et al. Manejo de irrigação utilizando o modelo de Hargreaves
1471 & Samani. **Cartilha - Instituto Nacional do Semiárido (INSA)**, 2013.
- 1472 MIR, M. A. et al. Jasmonic Acid Improves Growth Performance of Soybean Under Nickel
1473 Toxicity By Regulating Nickel Uptake, Redox Balance, and Oxidative Stress Metabolism.
1474 **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 4, p. 1195–1209, 2018.

- 1475 MOOSAVI, S. A. et al. Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination Characteristics
1476 of Canola (*Barassica napus*), Wheat (*Triticum aestivum*) and Safflower (*Carthamus*
1477 *tinctorious*) to Evaluate Phytoremediation Potential of These Crops. **Journal of Agricultural**
1478 **Science**, v. 4, n. 9, p. 11–19, 2012.
- 1479 MUJEEB, A. et al. Effects of Nickel Toxicity on Seedling Growth, Photosynthetic Pigments,
1480 Carotenoids and Phenols Contents of Cowpea *Vigna unguiculata* (L.). **International Journal**
1481 **of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 341–348, 2019.
- 1482 NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase
1483 in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**. v.22, p. 867-880, 1981.
- 1484 NEVES, A. C. et al. Cultivo do feijão-caupi em sistema agrícola familiar. Embrapa Meio-Norte-
1485 Circular Técnica (INFOTECA-E), 2011.
- 1486 ODJEGBA, V. J. et al. Accumulation of Trace Elements by *Pistia stratiotes*: implications for
1487 phytoremediation. **Ecotoxicology**, v. 13, n. 7, p. 637-646, 2004.
- 1488 PAPAZOGLU, E.G. *et al.* Responses of *Cynara cardunculus* L. to single and combined
1489 cadmium and nickel treatment conditions. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 74,
1490 n. 2, p. 195-202, 2011.
- 1491 PAPAZOGLU, Eleni G. et al. Preliminary studies on the growth, tolerance and
1492 phytoremediation ability of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) grown on heavy metal contaminated
1493 soil. **Industrial Crops And Products**, v. 107, p. 463-471, 2017.
- 1494 PERALTA-VIDEA, J.R. et al. Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of
1495 alfalfa plants. **Advances In Environmental Research**, v. 8, n. 3-4, p. 679-685, 2004.
- 1496 PÉREZ-HARGUINDEGUY, N. et al. New handbook for standardised measurement of plant
1497 functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 61, n. 3, p. 167–234, 2013.
- 1498 RAI, Krishna Kumar et al. Biotechnological strategies for enhancing heavy metal tolerance in
1499 neglected and underutilized legume crops: a comprehensive review. **Ecotoxicology And**
1500 **Environmental Safety**, v. 208, p. 111750, 2021.
- 1501 RASCHER, U.; LIEBIG, M.; LÜTTGE, U. Evaluation of instant light-response curves of
1502 chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll fluorometer on site
1503 in the field. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 12, p. 1397–1405, 2000.
- 1504 RIVASTAVA, R. K. et al. Cadmium and lead interactive effects on oxidative stress and
1505 antioxidative responses in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 251, n. 5, p. 1047–1065, 2014.
- 1506 SADEGHIPOUR, O. Chitosan Application Improves Nickel Toxicity Tolerance in Soybean.
1507 **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 2096–2104, 2021.
- 1508 SALINITRO, M. et al. Production of Antioxidant Molecules in *Polygonum aviculare* (L .)
1509 and *Senecio vulgaris* (L .) under Metal Stress : A Possible Tool in the Evaluation of Plant

- 1510 Metal Tolerance. 2020.
- 1511 SÁNCHEZ-RANGEL, J. C. et al. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its
1512 specificity for total phenolic content determination. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 5990–
1513 5999, 2013.
- 1514 SENEVIRATNE, M. et al. Heavy metal-induced oxidative stress on seed germination and
1515 seedling development: a critical review. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, n.
1516 4, p. 1813–1831, 2019.
- 1517 SENGAR, R. S. et al. Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants.
1518 **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 196, p. 73–93, 2008.
- 1519 SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Physiological role of nickel and its toxic effects
1520 on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, n. 2, p. 257–277, 2006.
- 1521 SHA, S. et al. Chemosphere Metabolic modifications to Ni excess in *L. minor*: Role of
1522 organic-, amino- and fatty acid profiles. v. 251, 2020.
- 1523 SILVA, E. C. et al. Comportamento estomático e potencial da água da folha em três espécies
1524 lenhosas cultivadas sob estresse hídrico. *Acta Botanica Brasilica*, v. 17, n. 2, p. 231–246,
1525 2003.
- 1526 SINGH K.; PANDEY S.N. Effect of nickel-stresses on uptake, pigments and antioxidative
1527 responses of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n. 3,
1528 p.391 – 394. 2011.
- 1529 SINGH, A.; KUMAR, J.; KUMAR, P. Effects of plant growth regulators and sucrose on post
1530 harvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. **Plant Growth**
1531 **Regulation**, v. 55, n. 3, p. 221–229, 2008.
- 1532 SPEROTTO, R. A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia
1533 agroalimentar e de saúde humana. Lajeado : **Editora da Univates**, 2014.
- 1534 STAMBULSKA, U. Y.; BAYLIAK, M. M.; LUSHCHAK, V. I. Chromium(VI) toxicity in
1535 legume plants: Modulation effects of rhizobial symbiosis. **BioMed Research International**,
1536 v. 2018, n. Table 1, 2018.
- 1537 STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.
- 1538 STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 748–755, 2005.
- 1539 SUJKOWSKA-RYBKOWSKA, M. et al. Lotus corniculatus-rhizobia symbiosis under Ni, Co
1540 and Cr stress on ultramafic soil. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1–2, p. 459–484, 2020
- 1541 UNUIGBE, C; ENAHORO, J; ERHARUYI, O; OKERI, H. Phytochemical analysis and
1542 Antioxidant Evaluation of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus* DC .) Stapf Leaves, v23i2.4.
1543 2019.

- 1544 USGS - U.S. Geological Survey. Mineral commodity summaries 2022: U.S. Geological
1545 Survey, p.202.
- 1546 VATS, Sanskriti et al. Targeting aquaporins to alleviate hazardous metal(loid)s imposed
1547 stress in plants. **Journal Of Hazardous Materials**, v. 408, p. 124910, 2021.
- 1548 WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Effect of metal tolerant plant growth promoting
1549 Bradyrhizobium sp. (vigna) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by greengram
1550 plants. **Chemosphere**, v. 70, n. 1, p. 36–45, 2007b.
- 1551 WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Impact of heavy metal toxicity on plant growth,
1552 symbiosis, seed yield and nitrogen and metal uptake in chickpea. **Australian Journal of**
1553 **Experimental Agriculture**, v. 47, n. 6, p. 712–720, 2007a.
- 1554 WOOD, B.W. *et al.* FIELD DEFICIENCY OF NICKEL IN TREES: symptoms and
1555 causes. **Acta Horticulturae**, n. 721, p. 83-98, 2006.
- 1556 YANG, Y. et al. Effects of lead on growth, osmotic adjustment, antioxidant activity and
1557 photosynthetic responses in Phoebe chekiangensis seedlings. **Notulae Botanicae Horti**
1558 **Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 48, n. 3, p. 1637–1648, 2020.
- 1559 YONG, W. K. et al. Physiological and metabolic responses of Scenedesmus quadricauda
1560 (Chlorophyceae) to nickel toxicity and warming. **3 Biotech**, v. 9, n. 8, p. 1–11, 2019.
- 1561 YUSUF, M. *et al.* Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. **Bulletin**
1562 **Of Environmental Contamination And Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 1-17, 2010.
- 1563 ZAID, A. et al. Salicylic acid enhances nickel stress tolerance by up-regulating antioxidant
1564 defense and glyoxalase systems in mustard plants. **Ecotoxicology and Environmental**
1565 **Safety**, v. 180, n. May, p. 575–587, 2019.
- 1566 ZENGIN, F. Physiological behavior of bean (phaseolus vulgaris l.) Seedlings under metal
1567 stress. **Biological Research**, v. 46, n. 1, p. 79–85, 2013.
- 1568 ZHANG, Hong et al. Comparative study on the bioaccumulation of lead, cadmium and nickel
1569 and their toxic effects on the growth and enzyme defence strategies of a heavy metal
1570 accumulator, Hydrilla verticillata (L.f.) Royle. **Environmental Science And Pollution**
1571 **Research**, v. 27, n. 9, p. 9853-9865, 2020.
- 1572 ZHENG, H. et al. Effects of melatonin treatment on the enzymatic browning and nutritional
1573 quality of fresh-cut pear fruit. **Food chemistry**, v. 299, nov. 2019.
- 1574 ZIMMERMANN, P.; HEINLEIN, C.; ORENDI, G.; ZENTGRAF, U. Senescence-specific
1575 regulation of catalases in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Plant Cell and Environment*,
1576 29:1049-1060, 2006.