

PLANTAS DE *Phaseolus vulgaris* L. CULTIVADAS SOB CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE ZINCO

Athos Odin Severo Dorneles¹, Aline Soares Pereira², Renata Diane Menegatti³, Luana Oliveira de Oliveira⁴, Debora Barwaldt Dutra⁵, Sidnei Deuner⁵

M.Sc. Agrobiologia –UFSM¹, M. Sc. Agrobiologia – UFSM², M. Sc. em Produção Vegetal - (UDESC)³, Licenciada em Ciências Biológicas - URCAMP ALEGRETE⁴, Licenciada em, Ciências Biológicas – UFPEL⁵

RESUMO: Objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito da aplicação de zinco na produção de biomassa, atividade enzimática antioxidante e danos celulares em plantas de feijão-comum. A semeadura foi realizada em vasos com areia, mantendo-se seis plantas por vaso, em casa de vegetação. Sete dias após a emergência, as plântulas foram regadas com solução nutritiva completa e submetidas a quatro concentrações de zinco (2, 25, 50 e 75 μM) adicionadas a solução nutritiva, sendo este aplicado em intervalos de dois dias, em delineamento experimental inteiramente casualizado e com quatro repetições. Aos 45 dias após a emergência, foram analisadas as seguintes variáveis: Massa seca e fresca total; atividade específica das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX); danos celulares pelos níveis de peroxidação de lipídios de membrana e a quantificação dos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O acúmulo de massa fresca e seca decresceram sob as concentrações mais altas de Zn quando comparadas ao controle. A atividade das enzimas antioxidantes não foram suficientes para conter essa produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando expostas a altas concentrações de zinco os teores de H_2O_2 foram maiores, tanto em parte aérea como raízes. Assim, o presente trabalho apresenta dados que evidenciam a suscetibilidade do feijoeiro a altas concentrações de Zn.

Palavras-chave: Feijão, micronutriente, toxidez.

Phaseolus vulgaris L. PLANTS CULTIVATED UNDER GROWING ZINC CONCENTRATIONS

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of zinc application on biomass production, antioxidant enzymatic activity and cellular damage in common bean plants. The sowing was done in pots with sand, keeping six plants per pot, in a greenhouse. Seven days after emergence, the seedlings were irrigated with complete nutrient solution and submitted to four zinc concentrations (2, 25, 50 and 75 μM) added to the nutrient solution, being applied at two-day intervals, in a completely randomized experimental design and with four replicates. At 45 days after emergence, the following variables were analyzed: Dry and fresh total mass; Specific activity of the antioxidant superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) enzymes; Cellular damage by peroxidation levels of membrane lipids and the quantification of hydrogen peroxide (H_2O_2) contents. The fresh and dry mass accumulation decreased under the highest concentrations of Zn when compared to the control. The activity of the antioxidant enzymes were not sufficient to contain this production of reactive oxygen species (ROS). When exposed to high concentrations of zinc the contents of H_2O_2 were higher, both in aerial part and roots. Thus, the present work presents data that show the susceptibility of common bean at high concentrations of Zn.

Keywords: Bean, micronutriente, toxicity.

INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura anual de grande importância alimentícia, pelo seu alto valor proteico, principalmente para a população mais carente e, deste modo, constitui-se a principal cultura agrícola de subsistência nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (FERREIRA et al., 2002). A demanda por essa cultura é crescente e atualmente cerca de 2.813.506 hectares de feijão são plantados anualmente no território brasileiro, sendo a sua maioria no estado do Mato Grosso/MT (FAO, 2016; IBGE, 2016).

A busca incessante pelo aumento de produtividade deste grão tem instigado à utilização de novas áreas, muitas delas impróprias ao cultivo agrícola, como as degradadas e de difícil revegetação. Entre as áreas prováveis de ocupação por culturas anuais como o feijão, estão àquelas que apresentam solos contaminados com metais pesados.

O zinco (Zn) pode ser considerado um dos principais metais pesados presentes no solo (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2011). Atualmente metais pesados são um dos principais problemas ambientais, visto que estes, ao atingirem o solo, depreciam e alteram a área em diversos aspectos, entre eles, na diversidade de fauna e flora (ALEXANDRE et al., 2012). O emprego desse elemento de forma indireta através da utilização contínua e sucessiva de fungicidas, fertilizantes e lodo de esgoto, podem elevar as concentrações a teores impróprios, tornando-o tóxico (MARSOLA et al., 2005; OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2011).

De acordo com Malavolta et al., (1997) os teores de Zn encontrados nas plantas são em torno de 3 a 150 mg kg⁻¹, valores acima são considerados tóxicos, por serem maiores do que a quantidade necessária para o desenvolvimento da planta. A solução nutritiva descrita por Hoagland e Arnon (1950), tradicionalmente utilizada em cultivos hidropônicos garantindo crescimento satisfatório para diferentes espécies, apresenta dois µM de Zn em sua composição. A presença de metais pesados como o Zn em quantidades, acima do requerido, causa efeitos variados na atividade enzimática, como a oxidação e desnaturação de proteínas e enzimas (LÖSCH, 2004). Altas concentrações de Zn, níveis tóxicos, origina o aparecimento de um pigmento pardo-avermelhado nas folhas, devido à dificuldade na ascensão da seiva bruta inibindo o desenvolvimento das plantas (MALAVOLTA et al., 1997).

Silva et al., (2014) em experimento avaliando o efeito da toxicidade do Zn no cultivo do milheto (*Pennisetum glaucum* L) concluíram que o uso de elevadas concentrações deste elemento afetavam de forma negativa o crescimento e a produção de matéria seca do milheto. Estudos envolvendo a aplicação de altas concentrações de Zn em culturas agrícolas anuais são

raros, e os poucos que retratam esta situação tiveram como resultado que este micronutriente afeta negativamente no desenvolvimento das plantas (LI et al., 2009; MARQUES e NASCIMENTO, 2014). Devido ao feijoeiro ser classificado como uma planta altamente sensível à deficiência de Zn (MARTENS e WESTERMANN, 1991), acredita-se que este possa ser tolerante a altas concentrações deste elemento. Teixeira et al. (2008), mostram que o feijoeiro responde positivamente à aplicação de Zn, embora não ocorra aumento na produção de grãos. Porém o referido ensaio visava avaliar o comportamento do feijoeiro sob baixas concentrações de Zn (0, 100, 200, 400 e 800 g ha⁻¹, aplicados via foliar). O referido trabalho indica, para o feijoeiro, a concentração de 2,1 mg dm⁻³ aplicado no solo.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de plantas de feijão comum cultivadas sob concentrações crescentes de Zn.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de plantas

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Nutrição de Plantas (LNP) e em casa de vegetação pertencentes ao Departamento de Botânica no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Para a implantação do experimento, sementes de feijão comum foram semeadas em vasos plásticos (oito sementes por vaso) com capacidade para 0,7 L preenchidos com areia lavada e acondicionados em casa de vegetação durante o período de 45 dias. Sete dias após a emergência foi realizado um desbaste mantendo-se seis plantas por vaso e iniciada a aplicação dos tratamentos, onde, as plantas foram submetidas a concentrações crescentes de Zn (2, 25, 50 e 75 µM) adicionadas a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), fornecidas em intervalos de dois dias intercalados com a aplicação de água (200 mL por vaso). Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento, sendo as unidades experimentais um vaso com seis plantas.

Determinação de parâmetros de crescimento

Após 45 dias de exposição aos diferentes tratamentos, três plantas de cada vaso foram coletadas para determinação da massa fresca e seca totais. A massa fresca total foi determinada com auxílio de balança digital de precisão e em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para a estufa a 65°C até atingirem a massa constante para determinação da massa seca total.

Parâmetros Bioquímicos

- Atividade Enzimática

A análise da atividade das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), Ascorbato peroxidase (APX) e Catalase (CAT) foi determinada a partir da maceração de 200 mg de tecido vegetal (folhas e raízes separadamente) na presença de 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado em 2,0 mL do tampão de extração composto por: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. Os macerados foram centrifugados a 12.000g por 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante coletado. O extrato obtido foi utilizado para a quantificação das proteínas em espectrofotômetro a 595 nm pelo método de Bradford (1976). Os dados de proteínas foram utilizados para determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes, como descrito a seguir.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977). A referida atividade consiste na quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições de ensaio. Os resultados desta análise são expressos em U mg⁻¹ proteína.

A atividade da APX foi determinada seguindo metodologia proposta por Nakano e Asada (1981), com monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. A determinação da atividade da APX resulta do decréscimo na absorbância observado no período de 1,5 minutos a partir do início da reação e os resultados são expressos em μmol ASA min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

A atividade da CAT foi determinada conforme protocolo proposto por Azevedo et al. (1998). O extrato enzimático foi analisado pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 1,5 minutos em meio de reação e os resultados expressos em μmol H₂O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

- Teores de Peróxido de Hidrogênio, Peroxidação Lipídica

A extração para a quantificação dos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica foi realizada a partir da maceração de aproximadamente 200 mg de massa fresca de folhas e raízes, utilizando 2,0 mL do tampão de extração composto por ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a 12.000g, durante 20 minutos e o sobrenadante obtido, transferido para tubos de eppendorf.

A quantificação do H_2O_2 seguiu metodologia descrita por Velikova et al. (2000) onde, a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 390 nm e a concentração de H_2O_2 expressa em $\mu\text{mol de } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ MF}$.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, segundo Cakmak e Horst (1991). As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 535nm e 600nm e os resultados expressos em $\mu\text{mol de MDA g}^{-1} \text{ MF}$.

Análise estatística

Para a análise estatística dos dados, foi verificada a normalidade da distribuição dos erros através do teste de Anderson-Darling e homogeneidade das variâncias dos erros através do teste de Bartlett (ESTATCAMP, 2012) para todas as variáveis do experimento. As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974), com 5% de significância, utilizando o aplicativo Sisvar (FERREIRA, 2011) e do aplicativo SigmaPlot.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Todas as concentrações acima de dois μM de Zn causaram inibição no acúmulo de massa fresca nas plantas de feijão utilizadas neste experimento. A produção de massa seca sofreu redução na menor e na maior concentração de Zn em comparação ao controle, indicando a ocorrência de estresse por excesso de Zn (Figura 1).

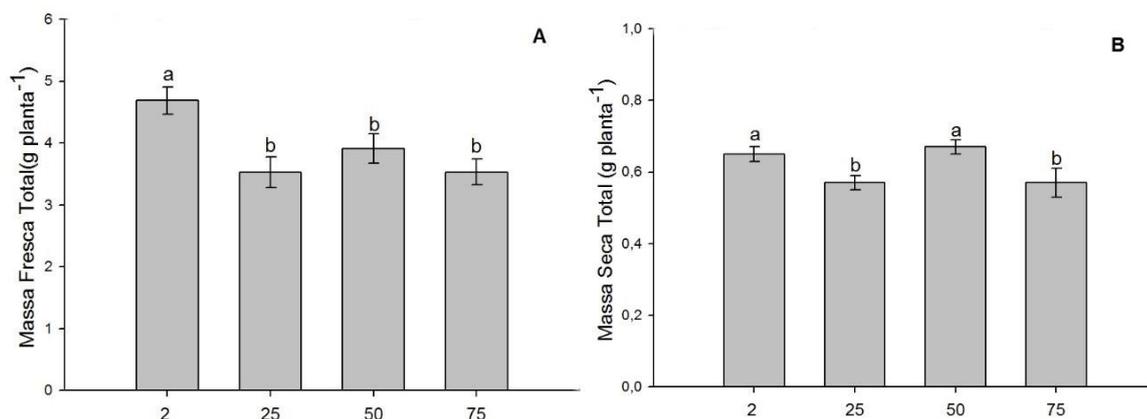


Figura 1 – Concentração de Zinco (2, 25, 50 e 75 µM) na biomassa fresca total (A) e seca total (B) em plantas de feijão comum *Phaseolus vulgaris* L. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott.

Alguns estudos tem indicado que o efeito de toxicidade do Zn depende da espécie vegetal e do estágio de crescimento da planta, e a inibição do crescimento e a redução da biomassa são respostas comuns das plantas ao excesso de Zn (LI et al., 2009; MARQUES & NASCIMENTO, 2014; ALONSO-BLÁZQUEZ et al., 2015; BERNARDY et al. 2016).

Esta redução no acúmulo de biomassa seca e fresca nas plantas de feijão, pode ser devido ao estresse oxidativo induzido pelo excesso de Zn. As plantas de feijão neste experimento, expostas às concentrações altas de Zn, apresentaram maior teor de MDA (produto da peroxidação lipídica), evidenciando os sintomas de estresse. Estes altos teores de MDA na presença de concentrações supra ótimas de Zn, foram observados tanto em folhas como em raízes (Figura 2).

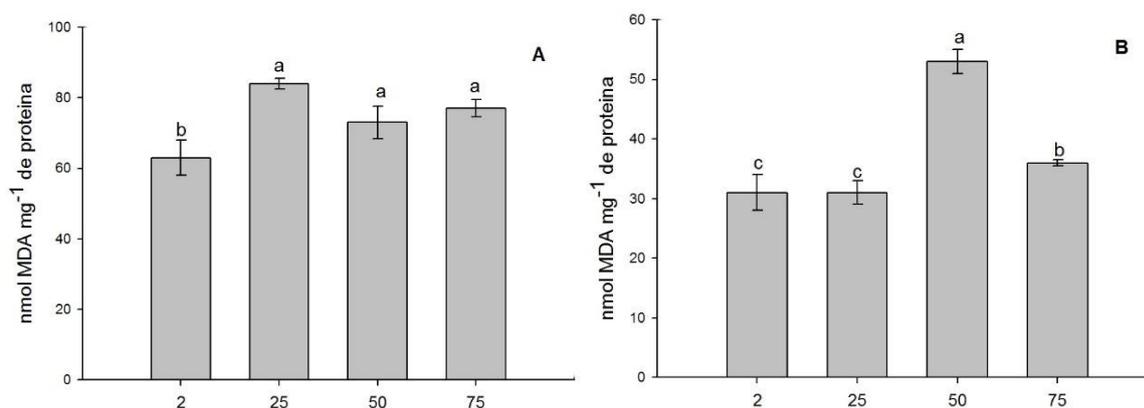


Figura 2 – Concentração de Zinco (2, 25, 50 e 75 µM) sobre o conteúdo de malondialdeído (MDA) de parte aérea (A) e raízes (B) de plantas de Feijão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott.

Este aumento nos teores de MDA nas plantas de feijão expostas a altas concentrações de Zn, podem ter ocorrido devido ao aumento no acúmulo de peróxido de hidrogênio (Figura 3), que também foram maiores em concentrações supra ótimas de Zn.

Em princípio o Zn não é um metal redox, e não promove reações de Haber-Weiss e Fenton, como outros metais ativos (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2005; MORINA et al., 2010; LIN & AARTS, 2012). No entanto, o excesso de Zn leva ao estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), isto é, superóxido (O^{-2}), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LIN & AARTS 2012; REMANS et al. 2012). Acredita-se que maiores concentrações de Zn podem alterar a atividade de enzimas do sistema antioxidante vegetal (MORINA et al. 2010; LIN & AARTS 2012).

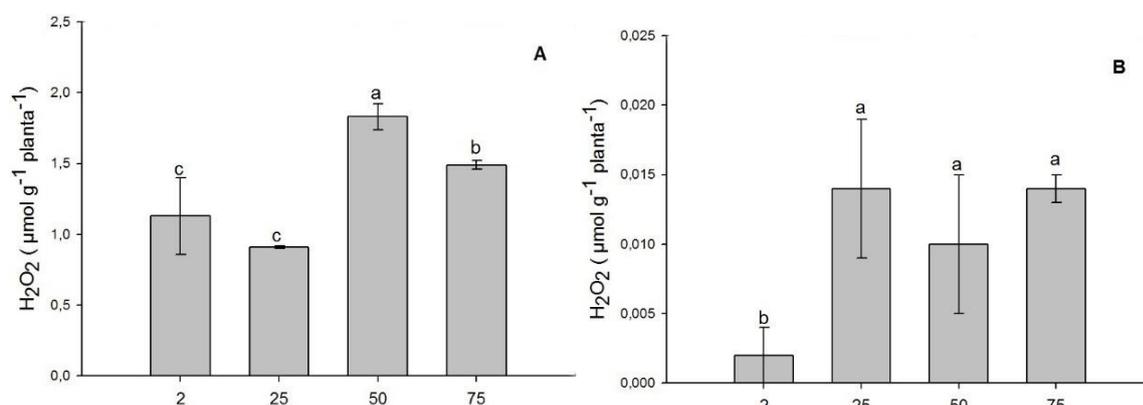


Figura 3 – Conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na parte aérea (A) e nas raízes (B), de plantas de feijão. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott.

O presente experimento demonstra que o Zn afetou a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante vegetal nas plantas de feijão (Tabela 1). Para parte aérea, houve aumento na atividade da SOD e APX até a concentração de 50 µM de Zn, ocorrendo inibição da atividade na maior concentração de Zn (75 µM). A atividade da SOD manteve-se inalterada nas raízes em todos os tratamentos, embora tenha ocorrido alterações na atividade das peroxidases avaliadas, o que sugere possível eficiência no controle dos teores do ânion superóxido. No entanto, o produto da reação da SOD é o H_2O_2 , que pode não estar sendo eliminado de maneira eficiente pela planta, o que pode explicar o aparente estresse das plantas nas maiores concentrações de Zn.

Tabela 1 - Concentração de Zinco (2, 25, 50 e 75 μM) sobre as atividades das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Ascorbato peroxidases (APX) e Catalase (CAT) em plantas de Feijão.

Órgão da Planta	Tratamento (μM)	SOD	APX	CAT
Parte aérea	2	700.86 \pm 75 B	10.94 \pm 1.63 B	1.08 \pm 0.03 B
	25	660.43 \pm 122 B	19.57 \pm 6.77 A	0.87 \pm 0.01 B
	50	1321.82 \pm 222 A	23.97 \pm 6.18 A	1.18 \pm 0.01 B
	75	1274.36 \pm 59 A	11.17 \pm 0.06 B	2.93 \pm 0.90 A
Raiz	2	272.85 \pm 25 A	58.30 \pm 10.0 B	14.00 \pm 6.46 B
	25	257.99 \pm 55 A	282.10 \pm 26.0 A	76.01 \pm 17.8 A
	50	281.90 \pm 12 A	26.01 \pm 10.0 B	8.28 \pm 2.40 B
	75	223.02 \pm 43 A	348.11 \pm 26.0 A	64.38 \pm 28.6 A

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott.

Estas alterações na atividade de enzimas do sistema antioxidante vegetal, tem sido reportadas em vários trabalhos com diferentes espécies vegetais (MADHAVA RAO & SRESTY, 2000; JAIN et al., 2010; CUI & ZHAO, 2011; KLECKEROVA et al., 2011; IVANOV et al., 2012; RAMAKRISHNA & RAO, 2015). Isto corrobora com os dados obtidos no presente trabalho, onde o Zn se mostrou altamente tóxico em concentrações altas de Zn.

CONCLUSÃO

As plantas de feijão utilizadas neste estudo são sensíveis ao excesso de Zn, evidenciando a necessidade de buscar alternativas para o cultivo desta espécie em condições de excesso deste elemento. Concentrações acima de dois μM de Zn, são suficientes para causar danos às plantas de feijão, que podem levar a prejuízo no crescimento. Com isso, pode-se afirmar que concentrações a partir de 25 μM de Zn são supra ótimas para plantas de feijão comum. Tendo em vista que atividades antrópicas tem aumentado a disponibilidade de metais pesados e/ou tóxicos nos solos brasileiros, torna-se evidente a necessidade de elucidar o comportamento das plantas diante de fatores estressantes.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, J.R.; OLIVEIRA, M.L.F.; SANTOS, T.C. et al. **Zinco e ferro: de micronutrientes a contaminantes do solo.** *Natureza on line*, v.10, n. 1, p. 23-28, 2012.

ALONSO-BLÁZQUEZ, N.; GARCÍA-GÓMEZ, C.; FERNÁNDEZ, M.D. **Influence of Zn-contaminated soils in the antioxidative defence system of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) at different exposure times: potential use as biomarkers.** *Ecotoxicology*, v.24, n.2, p.279-291, 2015.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J. et al. **Response from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation in leaves and roots of wild type and a catalase-deficient mutant of barley.** *Physiologia Plantarum*, v. 104, p. 280-292, 1998.

BERNARDY, K.; FARIAS, J.G.; DORNELES, A.O.S. et al. **Changes in root morphology and dry matter production in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen accessions in response to excessive zinc.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.18, n.2, supl. I, p.613-620, 2016.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72, p.48-254, 1976.

CAKMAK, I., HORST, W. J. **Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities on root tips of soybean (*Glycine max*).** *Physiologia Plantarum*, v.83, p.463-468, 1991.

CARNEIRO M.A.C.; SIQUEIRA J.O.; MOREIRA F.M.S. **Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, p.1629-1638, 2002.

CUI, J.X.; ZHOU, Y.H.; DING, J.G. et al. **Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber.** *Plant, Cell & Environment*, v.34, p.347-358, 2011.

ESTATCAMP. (2012). **Portal Action.** Disponível em: <http://www.portalaction.com.br>. Acesso em: 21 ago. 2016.

FAO. (2016). **FAOSTAT** database 2013. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 21 ago. 2016.

FERREIRA, C. M.; DEL PELOSO, M.J.; FARIA, L.C. **Feijão na economia nacional.** Santo Antônio e Goiás: *Embrapa Arroz e Feijão*, n. 135, p.47, 2002.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: a computer statistical analysis system.** *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. **Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings.** *Journal of Plant Physiology*, v.48, n.59, p.315-318, 1977.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. (1950). **The waterculture method for growing plants without soil.** Berkeley, CA: Agricultural Experiment Station, Univ. of California. p.347.

IBGE. **Lavoura Permanete.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sc&tema=lavourapermanente2014>. Acessado em: 20 de junho de 2016.

IVANOV, Y. V.; SAVOCHKIN, Y. V.; KUZNETSOV, V. V. **Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 2. Functioning of antioxidant enzymes in pine seedlings under chronic zinc action.** *Russian Journal of Plant Physiology*, v.59, n.1, p.50-58, 2012.

JAIN, R.; SRIVASTAVA, S.; SOLOMON, S. et al. **Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum spp.*).** *Acta Physiologiae Plantarum*, v.32, n.5, p.979-986, 2010.

KLECKEROVA, A.; SOBROVA, P.; KRYSTOFOVA, O. et al. **Cadmium (II) and zinc (II) ions effects on maize plants revealed by spectroscopy and electrochemistry.** *International Journal of Electrochemical Science*, v.6, n.12, p.6011-6031, 2011.

LASAT, M.M.; PENCE, N.S.; GARVIN, D.F. et al. **Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*.** *Journal of Experimental Botany*, v.51, p.71-79, 2000.

LI, T.; YANG, X.; LU, L. et al. **Effects of zinc and cadmium interactions on root morphology and metal translocation in a hyperaccumulating species under hydroponic conditions.** *Journal of hazardous materials*, v.169, n.1-3, p.734-741, 2009.

- LIN, Y.F.; AARTS, M.G.M. **The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 69, p.3187–3206, 2012.
- LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; ELLIS, D. R.; GRUSAK, M. A. **Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and *raz* mutant plants.** Plant Science, v.168, p.1015-1022, 2005.
- LÖSCH, R. **Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals.** In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems.** 2° ed. Springer, p.182- 200, 2004.
- MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. S. **Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon-pea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses.** Plant Science, v.157, p.113-128, 2000.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2° ed. Piracicaba: Potafós, 1997.
- MARQUES, M.C.; NASCIMENTO, C.W.A. **Tolerância de mamona a zinco avaliada por fluorescência de clorofila e nutrição das plantas.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v.38, n.3, p.850-857, 2014.
- MARSOLA, T.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. **Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 9, p. 92-98, 2005.
- MARTENS, D.C.; WESTERMANN, D.T. **Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies.** In: MORTVEDT, J.J. et al. (Ed.). **Micronutrients in agriculture.** 2 ed. Madison: Soil Science Society of America, p. 549-591, 1991.
- MORINA, F.; JOVANOVIĆ, L.; MOJOVIĆ, M. et al. **Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall.** Physiology Plant, v.140, p.209–224, 2010.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. **Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts.** Plant Cell Physiology, v. 22, p.867–880, 1981.
- OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C. **Metais pesados.** Revista Eletrônica Faculdade de Iporá, v.1, p. 59-86, 2011.
- RAMAKRISHNA, B.; RAO, S.S.R. **Foliar application of brassinosteroids alleviates adverse effects of zinc toxicity in radish (*Raphanus sativus* L.) plants.** Protoplasma, v. 252, p.665–677, 2015.
- REMANS, T.; OPDENAKKER, K.; GUISEZ, Y. et al. **Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature.** Environmental and Experimental Botany, v.84, p.61–71, 2012.
- SCOTT, R., KNOTT, M.A. **A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance.** Biometrics, v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- SILVA, DA J. DA R.; BEUTLER, A. N.; SILVA, V. N. et al. **Efeito de doses e fontes de Zn na germinação e potencial fisiológico de sementes de arroz.** Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 6, n. 2, 2014.
- TEIXEIRA, I. R.; BORÉM, A.; SILVA, A.G. et al. **Fontes e doses de zinco no feijoeiro cultivado em diferentes épocas de semeadura.** Acta Scientiarum Agronomy, v. 30, n. 2, p. 255-259, 2008.
- VELIKOVA, V., YORDANOV, I., EDREVA, A. **Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines.** Plant Science, v.151, p.59-66, 2000.