

# Alterações fisiológicas e ultraestruturais de plântulas de tomate induzidas por chumbo

Caroline Leivas Moraes<sup>1</sup>, Patrícia Marini<sup>2</sup>, Juliana Aparecida Fernando<sup>2</sup>, Dario Munt de Moraes<sup>2</sup>, Luis Antônio Suita de Castro<sup>3</sup> & Nei Fernandes Lopes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitotecnia, Caixa Postal 354, CEP 96010-970 - Capão do Leão, RS, Brasil.  
caroline.moraes@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas Departamento de Botânica, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil.  
marinipati@gmail.com; juli\_fernando@yahoo.com.br; moraesdm@ufpel.tche.br;

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado Rodovia BR 392, km 78, Caixa Postal 403, CEP 96010-971, Pelotas, RS. Brasil.  
luis.suita@cpact.embrapa.br

Recebido em 16.VII. 2013. Aceito em 10.IX.2014.

---

**RESUMO** – O objetivo do trabalho foi analisar alterações na germinação das sementes, no crescimento inicial, no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e mudanças na ultraestrutura anatômica de plântulas de *Lycopersicon esculentum* Mill. causadas pelo chumbo (Pb). Sementes de tomate foram submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75 mM). A porcentagem de germinação e emergência das plântulas reduziram na maior concentração de Pb. O comprimento e a massa seca da parte aérea e das raízes decresceram com o aumento da concentração do metal, sendo o efeito mais pronunciado no acúmulo de biomassa nas raízes. Os teores de clorofila, carotenoides e área foliar foram prejudicados pelo Pb. As análises ultraestruturais demonstraram alterações nos tilacoídes. Portanto, o Pb ocasiona redução na viabilidade das sementes, no crescimento inicial das plântulas e no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, como consequência de alterações nos cloroplastos, produzindo danos no crescimento de plantas de tomate.

Palavras-chave: acetato de chumbo, cloroplasto, crescimento, *Lycopersicon esculentum*

**ABSTRACT** – **Physiological and ultra-structural changes in tomato seedlings induced by lead.** The aim of this study was to verify the changes in seed viability, early growth, content of photosynthetic pigments and ultra-structural changes of *Lycopersicon esculentum* Mill seedlings caused by lead. Seeds were exposed to different concentrations of lead acetate (zero; 0.25; 0.5 and 0.75 mM). Percent germination and seedling emergence decreased as Pb concentration increased. In the same way, root length, dry mass and aerial parts also decreased as concentrations of Pb were increased, where the effect was strong on biomass accumulation in roots. Lead negatively affected chlorophyll contents, carotenoids and leaf area. Ultrastructural analyses demonstrated changes in the thylakoids. In conclusion, the increase in Pb concentration causes reduction in seed viability, early seedling growth, and in the photosynthetic pigment contents, as a consequence of changes in chloroplasts, damaging growth in tomato plants.

Index terms: chloroplast, growth, lead acetate, *Lycopersicon esculentum*

---

## INTRODUÇÃO

A contaminação do solo por chumbo (Pb), metal pesado de ampla distribuição que ocasiona problemas ao ambiente e a saúde humana (Cenkci *et al.* 2010), provém de atividades de mineração e fundição, resíduos industriais, gasolina e explosivos, bem como do descarte de lamas provenientes de esgotos municipais (Sharma & Dubey 2005).

A fitotoxicidade por Pb depende da concentração e período de exposição ao metal, da espécie, bem como do órgão e tecido da planta (Benavides *et al.* 2005), comprometendo o desenvolvimento vegetal (Sharma & Dubey 2005, Kabir *et al.* 2008, Ekmekc *et al.* 2009). Além disso, mesmo em pequenas concentrações o Pb é capaz de exercer efeito tóxico em organelas (Sharma & Dubey 2005). Estudos com metais pesados, evidenciaram distorções nos tilacoides dos cloroplastos, desorganização do grana (Djebali *et al.* 2005), diminuição dos espaços intercelulares (Sandalió *et al.* 2001) e das células do mesofilo (Gratão *et al.* 2009, Djebali *et al.* 2005) e aumento no número de plastoglóbulos e peroxissomos (Aravind & Prasad 2005, Gratão *et al.* 2009). Além dessas alterações, também é possível verificar que plantas expostas ao chumbo ocasionam significativo aumento na peroxidação de lipídeos de membranas causado pelo excesso de radicais livres, como por exemplo, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (Wang *et al.* 2008).

O chumbo quando presente no solo penetra através do sistema radical, sendo translocado predominantemente via apoplasto e, de forma radial, atravessa o córtex acumulando-se próximo à endoderme, a qual funciona como uma barreira parcial diminuindo seu transporte das raízes para a parte aérea (Sharma & Dubey 2005), fato que pode justificar maior acúmulo do metal nas raízes (Verma & Dubey 2003). Quando transportado para parte aérea, o acúmulo de chumbo depende da fenologia da planta, onde o maior conteúdo deste metal é encontrado em folhas senescentes (Godzik 1993). Pesquisas têm revelado que o chumbo, quando presente em folhas, se deposita nos espaços intercelulares, vacúolos e uma pequena parte nos cloroplastos, mitocôndrias e retículos endoplasmáticos (Wierzbicka & Antosiewicz 1993).

Apesar de o chumbo ser considerado um metal potencialmente tóxico, poucos trabalhos são encontrados na literatura que explorem a relação entre a germinação das sementes, o crescimento inicial das plântulas, as alterações da ultraestrutura

anatômica das plântulas causadas pelo seu efeito, bem como as modificações observadas no conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Estas análises são de grande relevância, visto que através da observação destes resultados é possível obter conclusões baseadas em uma visão mais ampla que permita demonstrar claramente a inter-relação entre as variáveis analisadas, de forma a caracterizar respostas relacionadas às alterações do vegetal submetido a tais condições de estresse.

Pelo fato do tomate ser uma espécie bioindicadora a uma variedade de estresses ambientais e considerada um modelo que permite a realização de análises fisiológicas e bioquímicas (Lima *et al.* 2004), o objetivo da pesquisa foi verificar as alterações na viabilidade das sementes, no crescimento inicial das plântulas de tomate, no conteúdo de pigmentos fotossintéticos e em mudanças na ultraestrutura anatômica causada pelo Pb.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no laboratório de Fisiologia de Sementes pertencente ao departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pelotas, RS. Para a realização das análises de alterações fisiológicas e na ultraestrutura as sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cv. Santa Clara foram adquiridas no comércio local. As sementes foram submetidas a diferentes concentrações de chumbo onde o composto químico utilizado foi o acetato de chumbo e os testes foram conduzidos conforme descritos a seguir:

O teste de germinação (G%) foi conduzido com 200 sementes (quatro subamostras de 50 sementes) para cada repetição, totalizando quatro repetições. As sementes foram semeadas em caixas plásticas transparentes (gerbox<sup>®</sup>), utilizando como substrato duas folhas de papel mata-borrão, os quais foram previamente umedecidos com 15 mL das diferentes concentrações de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75 mM). Após, as sementes foram mantidas em germinador a 25 °C. A avaliação foi realizada 14 dias após a semeadura e os resultados expressos em porcentagem de germinação (Brasil 2009).

Para a emergência de plântulas em casa de vegetação (E%) foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, semeadas em bandejas de isopor com 200 células perfuradas, contendo areia lavada com água destilada, como substrato. Logo após a semeadura e sete DAS foi realizada a irrigação utilizando um litro das diferentes concentrações

de acetato de chumbo (zero; 0,25; 0,5 e 0,75 mM). Durante os intervalos foi usada água destilada e aos 21 DAS foi efetuada a contagem final do número de plântulas normais emersas e o resultado expresso em porcentagem (Popinigis 1985).

O Índice de velocidade de emergência das plântulas (IVE), realizado em conjunto com o teste de emergência, foi determinado através da contagem do número de plântulas emersas efetuado diariamente e o resultado calculado de acordo com Maguirre (1962), utilizando a seguinte fórmula:  $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$ , onde: G1, G2, Gn = número de sementes com emissão da raiz primária, computadas na primeira contagem, na segunda e última contagem. N1, N2, Nn = número de dias de semeadura a primeira, segunda e última contagem.

O Comprimento da parte aérea (CPA) e raiz (CR) das plântulas foram obtidos pela média de 40 plântulas ao final do teste de emergência e expressos em mm.plântula<sup>-1</sup>.

Para a avaliação da Massa seca da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR) as mesmas plântulas utilizadas para a determinação do CPA e CR tiveram suas partes separadas e colocadas em sacos de papel para secar em estufa a  $70 \pm 1$  °C até obter peso constante e os resultados expressos em mg.plântula<sup>-1</sup>. A Área foliar (AF) foi determinada aos 21 dias após a instalação do teste de emergência, em medidor de área foliar da marca Li-Cor 3000 e os resultados expressos em mm<sup>2</sup>.plântula<sup>-1</sup>.

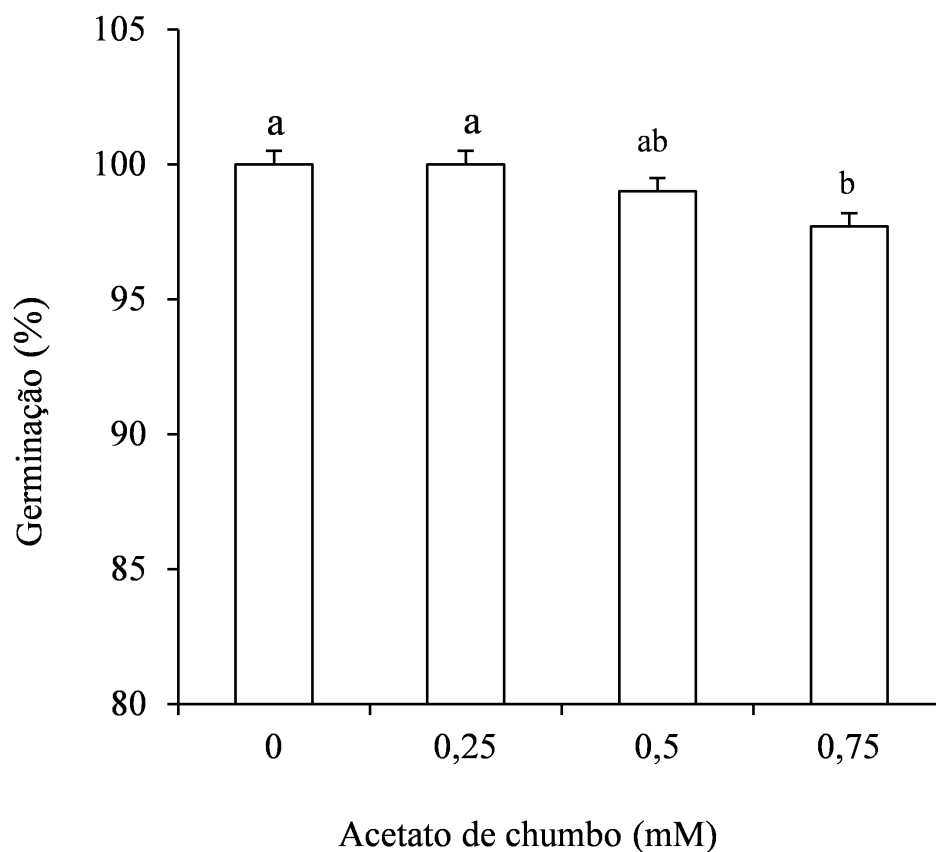
Para a determinação dos teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides, a extração dos pigmentos foi realizada de acordo com Arnon (1949) aos 21 DAS. Aproximadamente 500 mg das primeiras folhas foram maceradas em 10 mL de acetona 80% e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Após, o volume foi completado para 25 mL. A quantificação foi realizada conforme Lichtenthaler (1987), sendo os resultados expressos em mg de clorofila.g<sup>-1</sup> MF e mg de carotenoide.g<sup>-1</sup> MF.

Para a análise de microscopia eletrônica de transmissão, amostras de folhas foram coletadas

aos 21 DAS e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965), modificado com a utilização de tampão fosfato em 0,2 M pH 7.2, e pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1% por duas horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água tetradestilada, desidratadas em série etílica (30; 50; 70; 90 e 95%) seguidas de duas lavagens em acetona 100% e embebidas em resina Époxi e acetona 100% (1:1). A polimerização foi feita a 60 °C por 48 horas. As amostras foram seccionadas em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT). As secções ultrafinas (1000 nm) foram contrastadas por 20 minutos com acetato de uranila (7%) (Watson 1958) e com citrato de chumbo (3%) (Reynolds 1963). As avaliações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900 operado a 60 kV da Embrapa Clima Temperado. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados relativos às variáveis mensuradas foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de germinação (G%) das sementes de tomate apresentou pequeno decréscimo quando expostas à concentração de 0,75 mM de acetato de chumbo, diferindo significativamente quando comparada às concentrações de zero e 0,25 mM (Fig. 1). Sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) têm sua porcentagem e velocidade de germinação reduzida quando expostas ao chumbo, enquanto em espécies como pepino (*Cucumis sativus* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), não é observado efeito negativo significativo (Wierzbicka & Obidzinska 1998). Portanto, é provável que o efeito do chumbo na germinação dependa da estrutura da semente, bem como do grau de permeabilidade do tegumento ao metal pesado (Sharma & Dubey 2005).

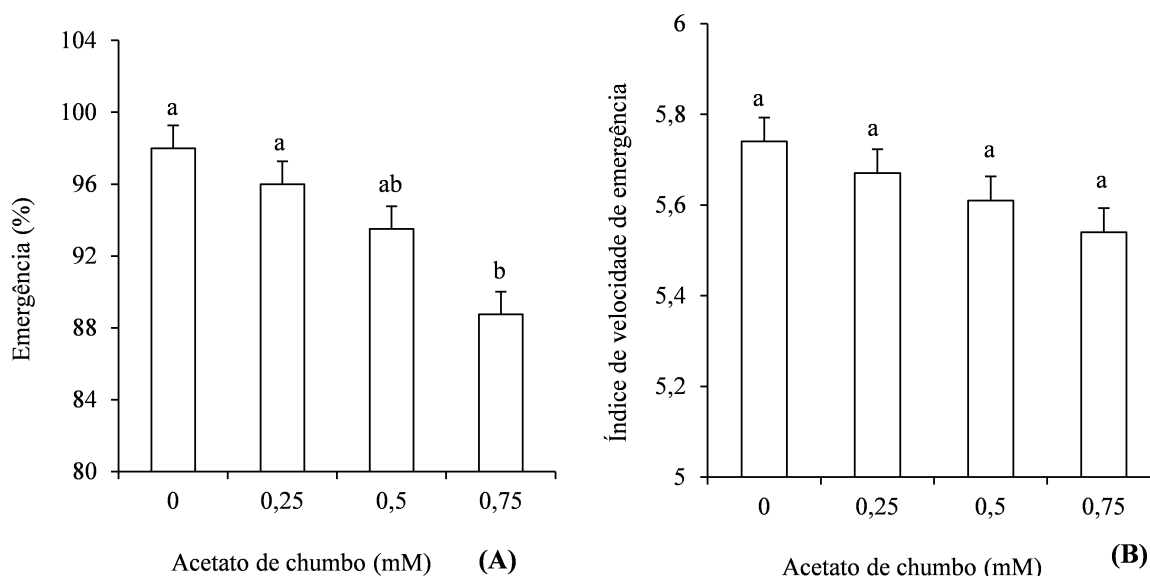


**Fig. 1.** Porcentagem de germinação de sementes de tomate, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

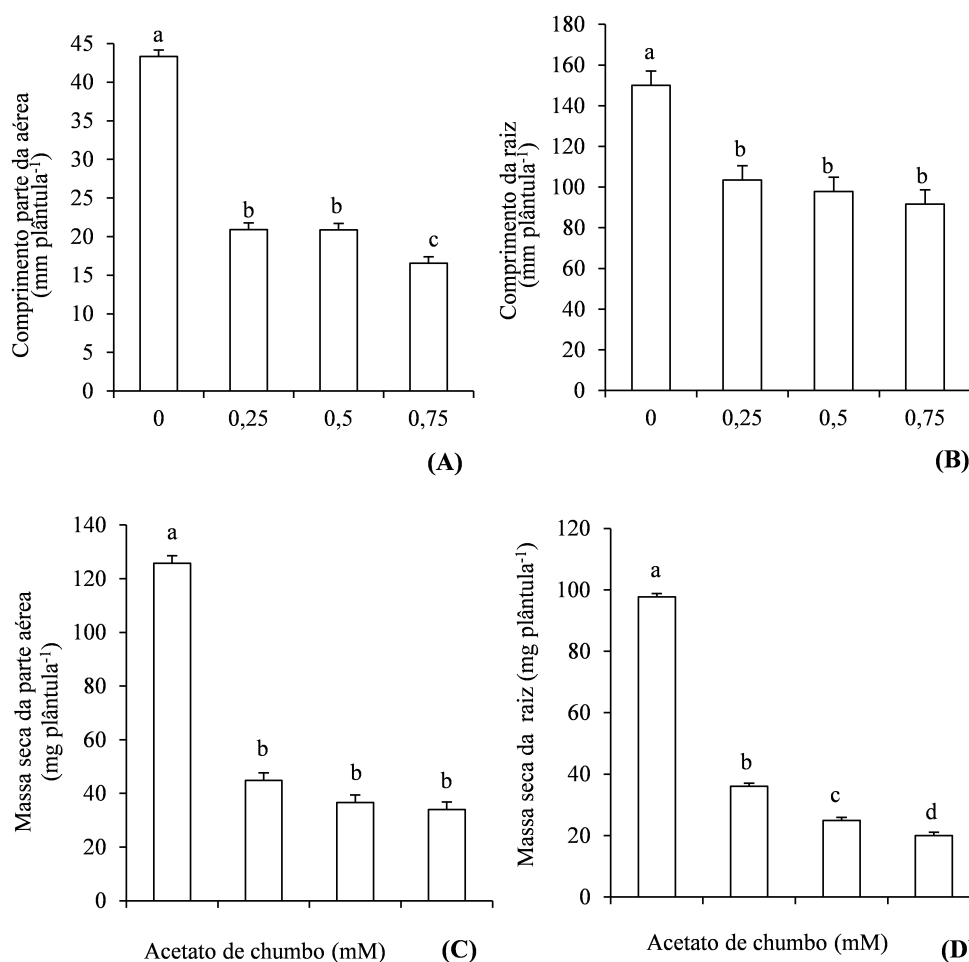
O chumbo também reduziu a porcentagem de emergência das plântulas em casa de vegetação (E%), a partir da concentração de 0,5 mM (Fig. 2A). Em contrapartida, o índice de velocidade de emergência das plântulas (IVE), não foi influenciado pelos diferentes tratamentos (Fig. 2B). Já o comprimento da parte aérea e das raízes de plântulas de tomate foi influenciado negativamente pela presença do metal (Fig. 3A,B). Da mesma forma, plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) mostraram diminuição do crescimento da parte aérea, sendo diretamente proporcional ao aumento da concentração de chumbo (Romeiro *et al.* 2007). Este decréscimo no crescimento também é observado

em plantas de tomate expostas ao nitrato de chumbo (Opeolu *et al.* 2010).

A massa seca da parte aérea e das raízes das plântulas de tomate foi altamente sensível a este metal, decrescendo, em torno de 64%, quando comparado ao controle (Fig. 3C,D, respectivamente), sendo que para a raiz houve decréscimo com o incremento da concentração de acetato de chumbo. Este decréscimo no conteúdo de massa seca pode ser consequência da redução dos teores de clorofila que comprometem os processos fotossintéticos (Fig. 5A-D), bem como pelas alterações ultraestruturais ocasionadas pelo chumbo nos cloroplastos, como evidenciado nas Figuras 6C,D.



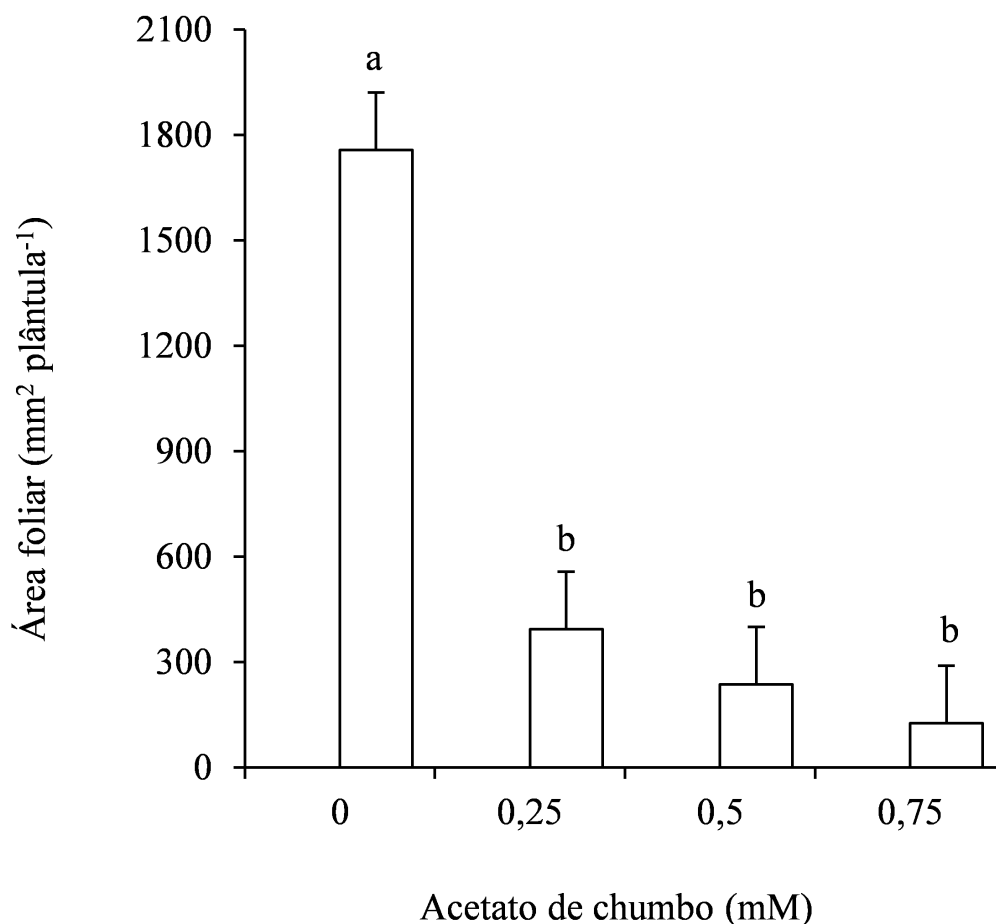
**Fig. 2A, B.** Plântulas de tomate submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). **A.** Porcentagem de emergência; **B.** Índice de velocidade de emergência. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.



**Fig. 3A-D.** Plântulas de tomate, aos 21 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). **A.** Comprimento da parte aérea; **B.** Comprimento de raiz; **C.** Massa seca da parte aérea; **D.** Massa seca da raiz. Médias seguidas por letra distinta diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

A área foliar também foi reduzida pela exposição ao metal (Fig. 4) e, a partir da concentração de 0,25 mM, ocorreu redução de 78% em relação ao controle. Em trabalho realizado por Akinci *et al.* (2010), é verificado redução na produção de biomassa da parte aérea e raízes, assim como decréscimo na área

foliar de plântulas de tomate expostas ao chumbo por um período de 30 dias. Resultados similares foram encontrados para plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) onde há redução na área foliar e na massa seca da parte aérea e das raízes, quando submetida à ação de chumbo (Romeiro *et al.* 2007).



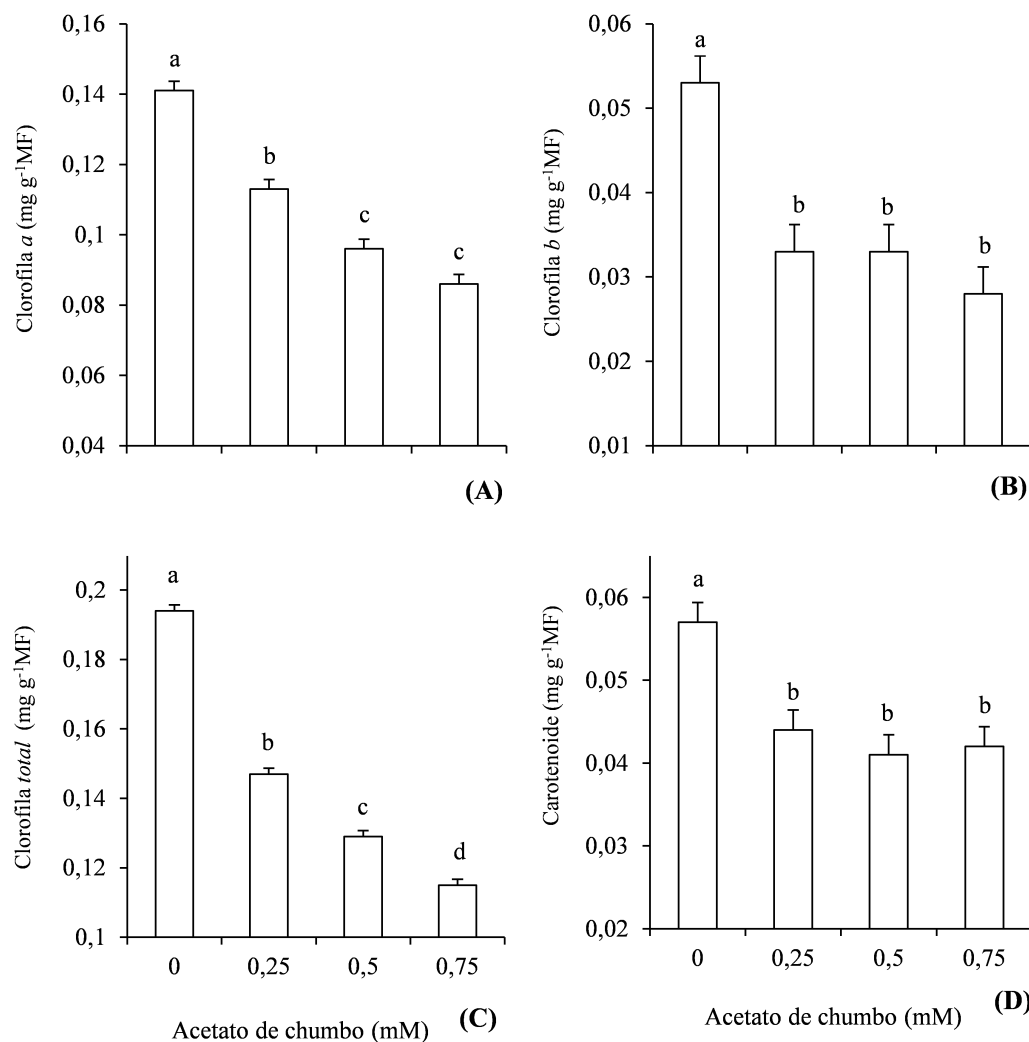
**Fig. 4.** Área foliar de plântulas de tomate, aos 21 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM). Médias seguidas por letra distinta diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

Os teores de pigmentos fotossintéticos nas folhas das plântulas de tomate, determinados aos 21 DAS, diminuíram significativamente, expressando rápida resposta para todos os níveis de acetato de chumbo, sendo esta uma indicação de toxicidade deste metal nos processos da fotossíntese (Fig. 5A,B). O mesmo foi verificado por Akinci e colaboradores (2010), onde, o chumbo afetou negativamente os conteúdos de clorofila *a*, *b* e total em plântulas de tomate. A toxicidade por chumbo pode inibir a síntese de clorofila, devido à redução na atividade de enzimas envolvidas nestes processos (Morsch *et*

*al.* 2002, Haider *et al.* 2006), induzir deficiência na absorção de elementos essenciais como o ferro e o magnésio (Burzynski & Globus 2004) e promover a degradação destas moléculas pelo aumento na síntese de clorofilases (Chongling *et al.* 1998). O chumbo aumenta os níveis do ácido  $\delta$ -aminolevulínico em plântulas de nabo forrageiro, devido à inibição da atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALA-D) (Cenki *et al.* 2010), ocasionando redução da biossíntese da clorofila, assim como observado em plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) (Gonçalves *et al.* 2009).

Também houve redução nos teores de carotenoides quando as plântulas foram expostas ao chumbo (Fig. 5D), Resposta semelhante é observada em plantas de tomate crescidas em solo contaminado por este

metal pesado (Nemati *et al.* 2013). Carotenoides são pigmentos acessórios que protegem as clorofilas da destruição foto-oxidativa, evitando danos no fotossistema II (Middleton & Teramura 1993) e,



**Fig. 5A-D.** Teores de pigmentos fotossintéticos em plântulas de tomate, aos 21 DAS, submetidas a diferentes concentrações de acetato de chumbo (mM): **A.** clorofila *a*; **B.** clorofila *b*; **C.** clorofila total; **D.** carotenoides. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Barras representam o erro padrão da média de quatro repetições.

portanto o decréscimo no conteúdo das clorofilas evidenciado neste trabalho pode estar diretamente relacionado à redução dos carotenoides.

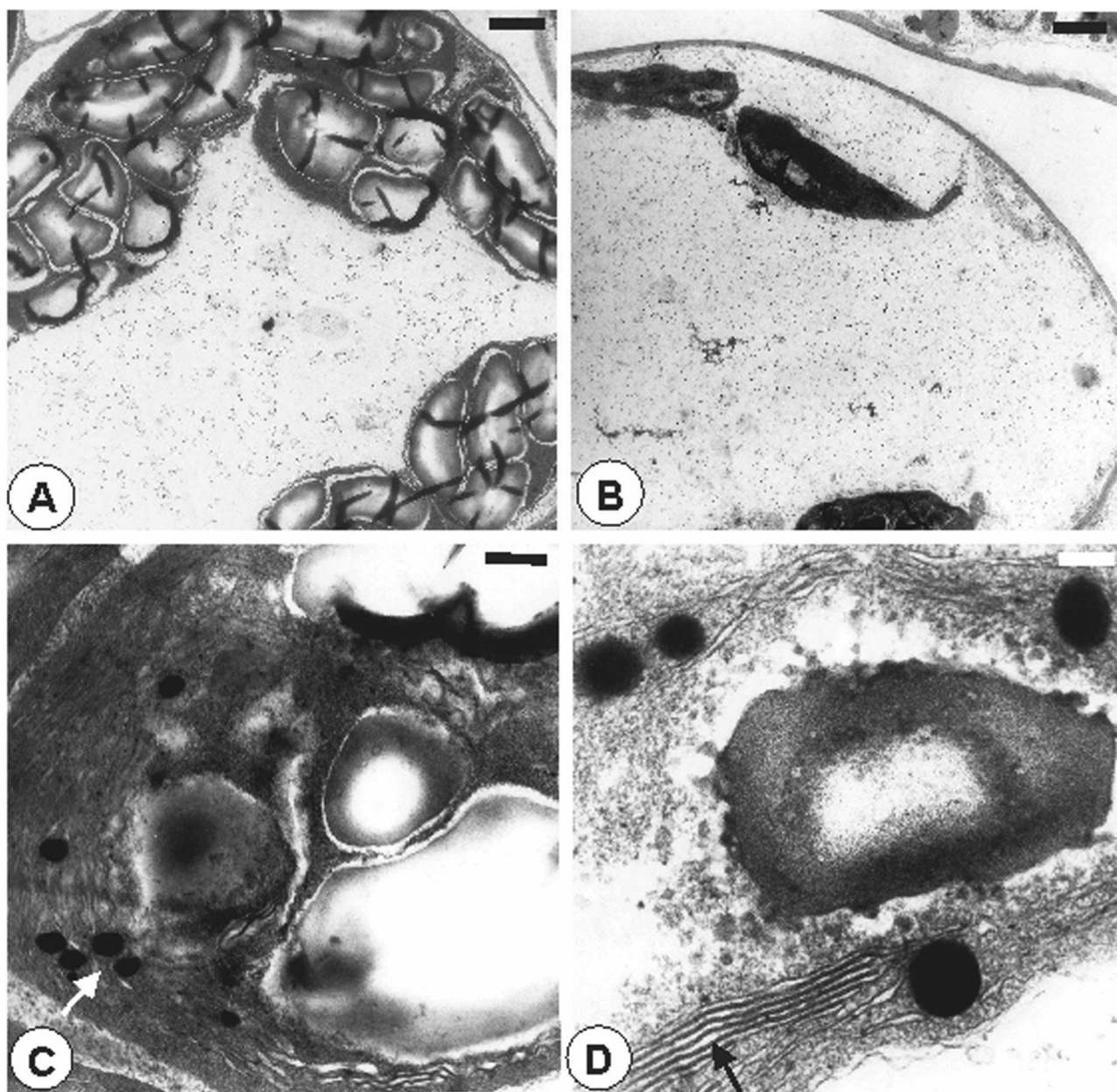
As análises da ultraestrutura anatômica das plântulas submetidas à maior concentração de acetato de chumbo (0,75 mM) mostraram diminuição na densidade de cloroplastos e grãos de amido nas células do mesofilo, quando comparadas ao controle (Figs. 6A–D). Resultado semelhante é verificado em plantas de tomates quando expostas a 100  $\mu$ M de  $\text{CdCl}_2$ , onde além da redução no número de

cloroplastos ocorre um decréscimo no seu tamanho (Djebali *et al.* 2005) Na mesma concentração (0,75 mM de acetato de chumbo), as membranas dos tilacoides apresentaram-se dilatadas evidenciando a desorganização dos cloroplastos (Figs. 6C,D), assim como relatado para *Taxithelium nepalense* (Schwagr.), onde 1mM de chumbo reduz o número de grãos de amido, altera a forma e causa distorções nas membranas dos tilacoides (Choudhury & Panda 2005). Estas alterações na estrutura dos cloroplastos podem ser devido ao aumento de espécies reativas de oxigênios (EROS) que em altas concentrações,

pode causar danos oxidativos severos nas células (Choudhury & Panda 2005). Além disso, a redução no conteúdo de grãos de amido em plantas expostas a estresses ambientais ocorre, provavelmente, pela diminuição na fixação de carbono (Devil *et al.* 2007).

Ainda na concentração mais alta do metal, os cloroplastos apresentaram maior quantidade de plastoglóbulos (Figs. 6 C,D) como verificado para plantas de tomate crescidas em 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , por um período de dez dias (Djebali *et al.* 2005). Em trabalho semelhante também foi verificado aumento

na densidade e no tamanho dos plastoglóbulos após exposição a 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  por 40 dias para esta mesma espécie (Gratão *et al.* 2009). O número e o tamanho dos plastoglóbulos nos cloroplastos podem aumentar após a exposição ao estresse por metal pesado, interferindo negativamente na biossíntese de corpos lipídicos que atuam na proteção do aparelho fotossintético contra radicais livres (Austin *et al.*, 2006; Olmos *et al.*, 2006). No seu interior ocorrem grandes quantidades de  $\alpha$ -tocoferol, que atuam evitando danos no fotossistema II (Vidi *et al.* 2006)



**Fig. 6A-D.** Elétron-micrografias de cloroplastos observados nas células do mesofilo de plântulas crescidas sob diferentes concentrações de acetato de chumbo. **A.** Tratamento controle evidenciando maior concentração de cloroplastos; **B.** Tratamento com 0,75 mM mostrando menor concentração de cloroplastos; **C.** detalhe do acúmulo de plastoglóbulos (seta); **D.** aumento nos espaços entre as membranas dos tilacóides (seta). Barras: A, B = 1,7  $\mu\text{m}$ ; C = 0,4  $\mu\text{m}$ ; D = 0,15  $\mu\text{m}$ .



e ésteres de ácidos graxos contendo fitil, porção hidrofóbica decorrente da degradação de clorofilas e considerada tóxica quando encontrada na sua forma livre (Ischebeck *et al.* 2006, Gaude *et al.* 2007). Portanto, o aumento desses glóbulos de lipoproteínas pode representar um mecanismo utilizado por esta espécie para evitar possíveis danos ao aparato fotossintético.

A determinação das alterações ultraestruturais causados por metais pesados nos cloroplastos, em conjunto com o decréscimo no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos comprometeu o crescimento das plântulas de tomate, devido a possíveis reduções na taxa fotossintética, visto que houve redução drástica nos parâmetros de crescimento aos 21DAS.

### CONCLUSÃO

Conclui-se que o chumbo ocasiona redução na viabilidade das sementes e no crescimento inicial das plântulas de tomate cv. Santa clara, assim como no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, como consequência de alterações nos cloroplastos, produzindo sérios danos no crescimento da planta, resultados estes que são relevantes visto que, permite uma melhor compreensão das modificações que ocorrem nos vegetais que são expostos a metais pesados.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro para a execução desta pesquisa e ao centro de pesquisa Agropecuária de Clima Temperado da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, por disponibilizar aparelhos e laboratórios para execução de parte deste trabalho.

### REFERÊNCIAS

- Akinci, I.E., Akinci, S. & Yilmas, K. 2010. Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research* 5: 416-423.
- Aravind, P. & Prasad, M.N.V. 2005. Cadmium-Zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Brazilian Journal Plant Physiology* 17: 3-5.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenol oxidases in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-14.
- Austin, J.R., Frost, E., Vidi, P.A., Kessler, F. & Staehelin, L.A. 2006. Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contains biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M. & Tomaro, M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology* 17: 21-34.
- Brasil. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília 395p.
- Burzyński, M. & Klobus, G. 2004. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica* 42: 505-510.
- Cenkci, S., Cigerci, I.H., Yildis, M., Ozay, C., Bozdog, A. & Terzi, H. 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany* 67: 467-473.
- Chongling, Y., Yetang, H., Shunzhen, F., Chonghua, F., Jixiang, L. & Qin, S. 1998. Effect of cd, pb stress on the activated oxygen scavenging system in tobacco leaves. *Chinese Journal Geochemistry* 17: 372-378.
- Choudhury, S. & Panda, S.K. 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, Soil Pollution* 167: 73-90.
- Devil, R., Munjral, N., Gupta, A.K. & Kaur, N. 2007. Cadmium induced changes in carbohydrate status and enzymes of carbohydrate metabolism, glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Environmental Experimental Botany* 61: 167-174.
- Djebali, W., Zarrouk, M., Brouquisse, R., EL kahoui, S., Limam, F., Ghorbel, H. & Chaib W. 2005. Ultrastructure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon sculentum*) chloroplast membranes. *Plant Biology* 7: 358-368.
- Ekmekci, I.Y., Tanyolac, D. & Ayhan, B. 2009. A crop tolerating oxidative stress induced by excess lead: maize. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 319-330.
- Gaude, N., Brehelin, C., Tischendorf, G., Kessler F. & Dormann P. 2007. Nitrogen deficiency in Arabidopsis affects galactolipid composition and gene expression and results in accumulation of fatty acid phytyl esters. *The Plant Journal* 49: 729-739.
- Godzik, B. 1993. Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area. *Polish Botanical Studies* 5: 113-132.
- Gonçalves, J.F., Becker, A.G., Pereira, L.B., Rocha, J.B.T., Cargnelutti, D., Tabaldi, A.L., Battisti, V., Farias, J.G., Fiorenza, A.M., Flores, E.M.M., Nicoloso, F.T. & Schetinger, M.R.C. 2009. Response of *Cucumis sativus* L. seedlings to Pb exposure. *Brazilian Journal Plant Physiology* 21: 175-186.
- Gratão, P.L., Monteiro, C.C., Rossi, M.L., Martinelli, A.P., Lázaro E.P.P., Medici, L.O., Lea, P.J. & Azevedo,

- R.A. 2009. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to Cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 67: 387-394.
- Haider, S., Kanwal, S., Uddin, F. & Azmat, R. 2006. Phytotoxicity of Pb II changes in chlorophyll absorption spectrum due to toxic metal Pb stress on *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Journal Biological Sciences* 9: 2062-2068.
- Ischebeck, T., Zbierzak, A. M., Kanwischer, M. & Dormann, P. 2006. A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. *Journal Biological Chemistry* 281: 2470-2477.
- Kabir, M.M., Iqbal, Z.M., Shafiq, Z.R. & Faroo, Q.I. 2008. Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L. caused by lead and cadmium treatments. *Pakistan Journal of Botany* 40: 2419-2426.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 27: 137-138.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lima, J.E., Carvalho, R.F., Tulmann Neto, A., Figueira, A. & Peres, L.E.P. 2004. Micro Msk: a tomato genotype miniature size, short life cycle and improved in vitro shoot regeneration. *Plant Science* 167: 753-757.
- Maguirre, J.D. 1962. Speed of germination and in selection and evaluation for seedlings emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Middleton, E.M. & Teramura, A.H. 1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from UV-B damage. *Plant Physiology* 103: 741-752.
- Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Martins, A.F. & Rocha, J.B.T. 2002. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. *Biology Plant* 45: 85-89.
- Nemati, H., Bostani, A.A. & Sharafi, Y. 2013. Effects of soil lead (Pb) concentration on some qualitative and quantitative characteristics of *Lycopersicon esculentum*. *International Journal of Agronomy and Plant Production* 4: 438-441.
- Olmos, E., Kiddle, G., Pellny, T.K., Kumar, S. & Foyer, C.H. 2006. Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 1645-1655.
- Opeolu, B. O., Adenuga, O. O., Ndakidemi, P. A. & Olujimi, O. O. 2010. Assessment of phytotoxicity potential of lead on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) planted on contaminated soils. *International Journal of Physical Sciences* 5: 068-073.
- Popinigis, F. 1985. *Fisiologia da semente*, Pax Editora Gráfica e Fotolito Ltda, Brasília. 289 p.
- Reynolds, E.S. 1963. Use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17(1): 208p.
- Romeiro, S., Lagôa, A.M.A., Furlani, P.R., Abreu, C.A. & Pereira, B.F.F. 2007. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação De *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia* 66: 327-334.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C. & Del Rio, L. A. 2001. Cadmium induced changes in growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal Experimental Botany* 52: 2115-2126.
- Sharma, P. & Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology* 17: 35-52.
- Verma, S. & Dubey, R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- Vidi, P.A., Kanwischer, M., Baginsky, S., Austin, J.R., Csucs, G., Dormann, P., Kessler, F. & Brehelin, C. 2006. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *Journal Biological Chemistry* 281: 11225-11234.
- Wang, C., Wang, X., Tian, Y., Xue, Y., Xu, X., Sui, Y. & Yu, H. 2008. Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 685-691.
- Watson, M.L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4: 475p.
- Wierzbicka, M. & Antosiewicz, D. 1993. How lead can easily enter the food chain – a study of plant root. *Science Total Environment* 134: 423-429.
- Wierzbicka, M. & Obidzin'ska, J. 1998. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Science* 137:155-171.