

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E
BIOLOGIA MOLECULAR



EXPRESSÃO GÊNICA, RESPOSTAS MORFO-FISIOLÓGICAS E
MORTE CELULAR INDUZIDAS POR CÁDMIO EM *Genipa americana*
L. (RUBIACEAE)

VÂNIA LIMA SOUZA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL
ABRIL de 2007

VÂNIA LIMA SOUZA

**EXPRESSÃO GÊNICA, RESPOSTAS MORFO-FISIOLÓGICAS E MORTE
CELULAR INDUZIDAS POR CÁDMIO EM *Genipa americana* L. (RUBIACEAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

ABRIL de 2007

VÂNIA LIMA SOUZA

EXPRESSÃO GÊNICA, RESPOSTAS MORFO-FISIOLÓGICAS E MORTE
CELULAR INDUZIDAS POR CÁDMIO EM *Genipa americana* L. (RUBIACEAE)

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Santa Cruz,
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 10 de abril de 2007

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida Prof. Dr. Júlio César de Mattos Cascardo
(UESC – Orientador) (UESC)

Prof. Dr. Abelmon da Silva Gesteira
(UESC)

Prof^a. Dr^a. Janette Palma Fett
(UFRGS)

DEDICATÓRIA

À minha mãe pelo amor incondicional e por
sempre ter me apoiado na concretização
de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me fortaleceu quando me encontrava fraca.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo financiamento de parte do projeto.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pelo apoio logístico.

Ao Service Central d'Analises, Lion, França, que por intermédio do professor Dr. Pedro Mangabeira, viabilizou suporte técnico e disponibilizou a estrutura física para realização das análises de composição química.

À professora Delmira da Costa Silva, outrora orientadora durante minha iniciação científica e hoje amiga, pela colaboração, confiança e pelos conselhos.

Ao meu orientador, professor Alex-Alan Furtado de Almeida, pela confiança, aprendizado, atenção e preocupação sempre constantes.

Ao co-orientador professor Júlio César de Mattos Cascardo, pela orientação e colaboração.

Ao professor Abelmon Gesteira, pela orientação, auxílio e aprendizado, principalmente durante a construção da biblioteca de cDNA.

Ao professor Carlos Priminho Pirovani pela grande colaboração nas análises bioquímicas e pelos ensinamentos.

Aos professores Fábio Pinto, Eduardo Gross, Margarete Magalhães, Leandro Loguércio, pelo auxílio e sugestões.

Aos amigos: Alberto, Bruna, Eileen, Fabiana, Joyce, Kaline, Polyana e Rosângela por sempre me ajudarem e apoiarem nos momentos difíceis dessa caminhada.

Ao Bráz que em tão pouco tempo de convivência demonstrou ser um grande amigo, agradeço pela ajuda imprescindível e indispensável nas técnicas de Biologia Molecular, pelos conselhos, incentivos, feriados e alegria contagiante.

Ao Cristiano pelas dicas e sugestões nos momentos de dúvida.

À Joci e Stênio pelo auxílio nas técnicas de Biologia Molecular.

Ao Robson e Pelé pelos ensinamentos, predisposição e auxílio nos minipreps e sequenciamento.

As colegas de turma Heliana, Nadja e Tharcilla pelos bons momentos de convivência e pela amizade.

À Vanderly pela paciência e boa vontade em ceder seu precioso tempo para fotografar as lâminas da reação TUNEL.

Aos bolsistas de iniciação científica Stella, Abel, Ciro e Tiago Rosa (agora mestrando) pela contribuição para realização deste trabalho.

À professora Cristina Caribé pela convivência e ajuda sempre quando solicitei.

À Geruza que mesmo distante sempre sanou minhas dúvidas.

À minha mãe e minha família pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos.

EXTRATO

SOUZA, Vânia Lima, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, abril de 2007. **Expressão gênica, respostas morfo-fisiológicas e morte celular induzidas por cádmio em *Genipa americana* L. (Rubiaceae).** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-orientador: Júlio César de Mattos Cascardo. Colaborador: Delmira da Costa Silva.

O cádmio (Cd) proveniente de deposições atmosféricas, do uso de fertilizantes orgânicos e, ou da aplicação de fertilizantes fosfatados não é considerado elemento essencial e, ou benéfico aos seres vivos. Nas células vegetais o Cd dispara uma sequência de reações que pode levar a morte celular. Algumas plantas, no entanto, têm desenvolvido mecanismos de tolerância, permitindo-as sobreviver em ambientes contaminados por metais pesados, como a síntese de fitoquelatinas, metalotioneínas, dentre outros. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a expressão gênica, as possíveis alterações morfo-fisiológicas e a morte celular, promovida por Cd em *Genipa americana* L. cultivada em solução nutritiva, para subsidiar estudos futuros de sua utilização como planta tolerante e, ou fitorremediadora desse elemento metálico. Para isso, plantas de *G. americana* foram submetidas a concentrações crescentes de Cd (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 mg L⁻¹), juntamente com o controle, em solução nutritiva. Após a aplicação dos tratamentos, foram realizadas coletas dos órgãos vegetativos para confecção de biblioteca de cDNA, detecção de morte celular programada, atividade de peroxidases e análise da composição química. Em um segundo experimento foram medidas as trocas gasosas e a emissão de fluorescência da clorofila *a*, em nível foliar com um medidor portátil de fotossíntese. Dos 165 ESTs gerados com a construção da biblioteca de cDNA, 81 apresentaram homologia a genes identificados e depositados no banco de dados do NCBI, 67 não tiveram similaridade com nenhum gene disponível e 17 ESTs demonstraram homologia a genes desconhecidos. Dentre os cDNAs mais abundantes, 16 ESTs foram similares às metalotioneínas. A reação TUNEL demonstrou alterações morfológicas no núcleo, em secções foliares após tratamento com Cd, típicas de células que passam por apoptose. Observou-se núcleos com esferas de cromatina condensada, deslocados para a periferia e com formato elíptico e a presença de micronúcleos e de células vazias com núcleos completamente fragmentados. O ensaio enzimático para peroxidases (POD) revelou um decréscimo na atividade destas enzimas nas primeiras 12 h de exposição ao Cd para todas as concentrações de metal, com uma recuperação posterior para as concentrações 2, 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹. As alterações anatômicas induzidas por Cd restringiram-se às raízes e as folhas. Na raiz e na nervura central da folha verificou-

se aumento da lignificação na parede celular com o incremento da concentração de Cd em solução nutritiva. Além disso, os núcleos celulares da raiz tornaram-se condensados e deformados, ao passo que no mesofilo foliar houve ampliação dos espaços intercelulares. O Cd promoveu diminuições na taxa fotossintética líquida (A), na condutância estomática (g_s) e na transpiração (E), enquanto que o rendimento quântico do PSII (F_v/F_m) não foi afetado. Na análise química, observou-se que o Cd acumulou preferencialmente no sistema radicular, com baixa translocação para a parte aérea. Os teores de Ca, Mg e Zn também apresentaram um incremento diretamente proporcional ao aumento da concentração de Cd nas raízes. Por outro lado, observou-se um decréscimo nos teores de Fe e K, com variação inversamente proporcional ao incremento da concentração de Cd nas folhas. A hiperacumulação de Cd nas raízes de plântulas de *G. americana* demonstrou a capacidade fitorremediadora desta espécie lenhosa, principalmente como rizofiltradora de Cd em ambientes contaminados.

Palavras-chave: apoptose, biblioteca cDNA, fluorescência da clorofila, metal pesado, peroxidases, trocas gasosas foliares

ABSTRACT

SOUZA, Vânia Lima, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, April 2007. **Gene expression, morpho-physiological responses and cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae).** Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-advisors: Júlio César de Mattos Cascardo and Delmira da Costa Silva.

Cadmium (Cd) originated from atmospheric deposition, organic fertilizer use and from phosphate fertilizers is not considered an essential element or benefic to living beings. Within plant cells, Cd triggers a sequence of reactions that can lead to cell death. Therefore, some plants had evolved mechanisms of tolerance that allow them to survive in environments contaminated with heavy metals, such as: phytochelatin and metallothioneins synthesis. The main objectives of this work were to evaluate gene expression, possible morpho-physiological responses and cell death, triggered by Cd in *Genipa americana* L. grown in nutrient solution, aiming to subsidize future studies of this species as a tolerant plant and it's use on bioremediation of Cd. For that, plants of *Genipa americana* L. were submitted to crescent doses of Cd (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 mg L⁻¹), together with control plants, in nutrient solutions. After the treatment, the organs and tissues were harvested for cDNA synthesis, TUNEL analyses (PCD), peroxidase activity and chemical composition determination. A second experiment was carried out in order to measure the gas exchange and fluorescence emission from chlorophyll *a* at the leaf level, using a portable photosynthesis measurement apparatus. From 165 ESTs sequenced from the cDNA library, 81 showed homology with identified genes in NCBI, 67 presented no hits and 17 ESTs found hits with hypothetical genes. Among most abundant cDNAs, 16 coded for metallothioneins. TUNEL experiments of leaf sections treated with Cd revealed apoptotic nuclei with altered morphology, typical of cells undergoing PCD. It was observed the presence of nuclei presenting spheres of condensed chromatin, shifted to the periphery with elliptical shape and the presence of micronuclei and empty cells with totally fragmented nuclei. Peroxidase enzymatic assays (POD) revealed a decrease in the activity of this enzyme after 12 hours of Cd exposure, for all concentrations tested, with a subsequent recove, for the concentrations of 2, 4, 8, and 16 mg Cd L⁻¹. Anatomical alterations induced by Cd were restricted to roots and leaves. In the root and leaf main vein an increase on cell wall lignification accompanying the incremental Cd doses in the nutrient solution was detected. Moreover, root nuclei became condensed and deformed, with increased intercellular spaces in the leaf mesophyll. Cd promoted decrease in net photosynthetic rate (*A*), stomatal conductance (*g_s*) and transpiration (*E*), while effective quantum yield of PS-II (*F_v/F_m*) was not affected. Chemical analyses revealed a preferential accumulation in Cd roots, with low translocation to shoots. The levels of Ca, Mg and Zn increased

directly Cd root concentrations. Conversely, decreasing levels of Fe and K were observed with the increasing levels of leaf Cd. The hyperaccumulation of Cd in roots of *G. Americana* seedlings showed the ability of this wood species to act as a phytoremediator, especially as a rhizofilter of Cd for contaminated environments.

Keywords: apoptosis, cDNA, chlorophyll fluorescence, heavy metal, peroxidase, leaf gas exchange.

ÍNDICE

EXTRATO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Cádmio (Cd).....	3
2.1.1. Características químicas e influência na cadeia alimentar.....	3
2.1.2. Interferência de cádmio no metabolismo vegetal.....	5
2.1.3. Mecanismos de Tolerância ao Cd em plantas.....	8
2.1.3.1. Fitoquelatinas (FQs).....	10
2.1.3.2. Metalotioneínas (MTs).....	11
2.1.4. Biblioteca de cDNA.....	13
2.2. Fitorremediação.....	15
2.3. Fitorremediação com o uso de plantas lenhosas.....	17
2. 4. <i>Genipa americana</i>	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Experimento I.....	20
3.1.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	20
3.1.2. Extração de RNA e construção da biblioteca de cDNA.....	21
3.1.3 Extração de DNA plasmidial e sequenciamento dos clones de cDNA.....	22
3.1.4. Teste para Peroxidases (PODs) E.C 1.11.1-.....	23
3.1.5. Análises anatômicas e histoquímicas.....	24
3.1.6. Análise de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick and labelling).....	25

3.1.7. Composição química.....	26
3.1.8. Análise estatística.....	26
3.2. Experimento II.....	27
3.2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	27
3.2.2. Medições de trocas gasosas foliares.....	27
3.2.3. Medições de fluorescência da clorofila <i>a</i>	28
3.2.4. Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Análise da biblioteca de cDNA e identificação de prováveis genes relacionados ao estresse por Cd.....	30
4.2. Análise TUNEL.....	36
4.3. Atividade de Peroxidases (PODs).....	43
4.4. Análises anatômicas e histoquímicas.....	46
4.5. Trocas gasosas foliares e emissão da fluorescência da clorofila <i>a</i>	52
4.6. Composição química.....	58
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação da qualidade de RNA total em raiz de plântulas de <i>G. americana</i> submetida a 16 mg Cd L ⁻¹ , em gel de agarose a 1%. (A) RNA total, (B) RNA após tratamento com DNase.....	30
Figura 2 - Síntese da segunda fita de cDNA observada em gel de agarose a 1%. Seta indica cDNAs mais abundantes.....	32
Figura 3 – Fracionamento por tamanho de cDNA selecionando fragmentos acima de 400 pb em CHROMA SPIN -400 Column (Clontech) em gel de agarose 1,1%. F4-F12 = frações.....	32
Figura 4 – PCR de colônias, amplificação com primers M13 <i>forward</i> e <i>reverse</i> , observada em gel de agarose a 1%.....	32
Figura 5 – Secção transversal da nervura foliar, em detalhe a medula, submetida às diferentes concentrações de Cd. Reação TUNEL: controle (A,E,I), 4 (B,F,J), 8 (C, G, K) e 16 mg Cd L ⁻¹ (D,H,L). Setas indicam núcleos TUNEL positivos deslocados para a periferia da célula.....	40
Figura 6 – Secção transversal da nervura foliar de <i>G. americana</i> , em detalhe colênquima e epiderme adaxial e abaxial, submetida a diferentes concentrações de Cd. Reação TUNEL face adaxial: controle (A), 4 (B), 8 (C) e 16 mg Cd L ⁻¹ (D). Reação TUNEL face abaxial: controle (E), 4 (F), 8 (G) e 16 mg Cd L ⁻¹ (H). Setas indicam núcleos TUNEL positivos deslocados para a periferia da célula e pontas de seta evidenciam os cloroplastos. Abreviaturas: (<i>ep</i>) epiderme, (<i>co</i>) colênquima, (<i>mn</i>) micronúcleos. Escala: 20 µm.....	41

- Figura 7**– Secção transversal da nervura central da folha de *G. americana* submetida as diferentes concentrações de Cd. Detalhe dos núcleos do córtex e epiderme abaxial. Reação TUNEL: controle (A e D), 4 (B, E e F), 8 mg Cd L⁻¹ (C e G). Setas indicam núcleos TUNEL positivos em diferentes fases apoptóticas para as concentrações 4 e 8 mg L⁻¹. Pontas de seta evidenciam os cloroplastos. Abreviaturas: (ne) núcleo formato elíptico, (nf) núcleo fragmentado, (mn) micronúcleos, (nc) núcleo com esferas de cromatina condensada ou apenas com cromatina condensada. Escala: 10 µm..... 42
- Figura 8** – Atividade de peroxidases (PODs) em folhas de plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante os períodos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h. (A) 0,5, (B) 1, (C) 2, (D) 4, (E) 8, (F) 16 mg Cd L⁻¹. $P \leq 0,05$ pelo teste de Tukey, $n=4$, \pm EP..... 45
- Figura 9** – Secção transversal da raiz de *G. americana* tratada com Cd. Detalhe do cilindro vascular e endoderme (A, C, E), epiderme e exoderme (B, D, F). (A e B) Controle com núcleos normais, (setas). Núcleos com cromatina condensada são indicados pelas setas para o tratamento 1 mg L⁻¹ (C e D). Nas raízes tratadas com 16 mg L⁻¹ Cd observa-se medula com células esclerificadas (E), células da epiderme com parede lignificada e deformação do núcleo das células da exoderme (F). Abreviaturas: (en) endoderme, (m) medula, (ep) epiderme, (ex) exoderme, (fl) floema, (x) xilema. Escala: 10 µm. 48
- Figura 10** – Secção transversal da nervura central foliar submetida as diferentes concentrações de Cd. (A) Controle, (B) 0,5 e (C) 2 mg Cd L⁻¹ já observa-se intensificação da lignificação (detalhe I), (D-F) 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ respectivamente, verifica-se a formação de fibras (detalhe J-L) nos raios parênquimáticos. Setas indicam fibras e ponta de setas elementos de vaso do xilema. Abreviaturas: (c) colênquima, (pc) parênquima cortical, (fl) floema, (x) xilema, (m) medula, (mf) mesofilo, (fb) fibras, (rp) raios parênquimáticos. (A-F) azul de astra e safranina a 1%, (G-L) floroglucina acidificada. Escala: (A-F) 170 µm, (G-L) 30 µm..... 49

- Figura 11** – Secção transversal do mesofilo foliar submetido as diferentes concentrações de Cd em solução nutritiva. Verificou-se compactação dos parênquimas paliçádico e lacunoso do tratamento 0,5 mg L⁻¹ (B) quando comparado ao controle (A), sendo que para as concentrações 2 (C), 4 (D), 8 (E) e 16 (F) mg L⁻¹ ocorreu ampliação dos espaços intercelulares nestes tecidos. Setas indicam parênquima lacunoso e ponta de seta parênquima paliçádico. Abreviaturas: (pp) parênquima paliçádico, (pl) parênquima lacunoso, (ad) epiderme adaxial, (ab) epiderme abaxial. Escala: 30 µm..... 50
- Figura 12** – Secção transversal da nervura central da folha tratada com Cd. Teste histoquímico com lugol. Grãos com cor negra no interior das células representam o amido e são indicados pelas setas. (A) Controle, (B-F) tratamentos 1, 2, 4, 8 e 16 mg L⁻¹ respectivamente. Abreviaturas: (pc) parênquima cortical, (en) endoderme, (fl) floema, (x) xilema, (m) medula. Escala: 60 µm..... 51
- Figura 13** – Mudanças na taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar, *A*; condutância estomática ao vapor de água, *gs*; e transpiração foliar, *E*; em folhas de plântulas de *G. americana* submetidas às concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ juntamente com o controle, em solução nutritiva durante 72 h, *n*= 4, ± EP (*P* ≤ 0,01 pelo teste *t*). As medições foram efetuadas fixando-se a irradiância em 800 µmol m⁻² s⁻¹..... 53
- Figura 14** – Relação entre a taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar (*A*) e a condutância estomática ao vapor de água (*gs*) em plântulas de *G. americana* submetidas as concentrações de 2 (Δ), 4 (▲), 8 (●) e 16 (○) mg Cd L⁻¹, juntamente com o controle (■), em solução nutritiva durante 72 h, *n*= 4, ± EP. As medições foram efetuadas fixando-se a irradiância em 800 µmol m⁻² s⁻¹..... 54
- Figura 15** – Mudanças na razão entre a concentração intercelular (*C_i*) e a atmosférica (*C_a*) de CO₂, *C_i/C_a*; eficiência intrínseca do uso de água, *A/gs*; e eficiência instantânea do uso de água, *WUE*; em folhas de plântulas de *G. americana* submetidas às concentrações de 2, 4, 8 e

16 mg Cd L ⁻¹ , juntamente com o controle, em solução nutritiva durante 72 h, n= 4, ± EP (P ≤ 0,01 pelo teste t). As medições foram efetuadas fixando-se a irradiância em 800 μmol m ⁻² s ⁻¹	55
Figura 16 – Fluorescência inicial (<i>F_o</i>), máxima (<i>F_m</i>) e rendimento quântico máximo do PS-II (<i>F_v/F_m</i>) em plântulas de <i>G. americana</i> submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 72 h.	57
Figura 17 – Variação do teor de Cd em raízes (●), caules (○) e folhas (Δ) de plântulas de <i>G. americana</i> submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 120 h, n= 3, ± EP (** P ≤ 0,01 pelo teste t).....	59
Figura 18 – Variações dos teores de P, K e Ca em raízes (●), caules (○) e folhas (Δ) de plântulas de <i>G. americana</i> submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 120 h, n= 3, ± EP (** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05 pelo teste t).....	62
Figura 19 – Variações dos teores de Fe, Mg e Zn em raízes (●), caules (○) e folhas (Δ) de plântulas de <i>G. americana</i> submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 120 h, n= 3, ± EP (** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05 pelo teste t).....	63
Figura 20 – Amostras de folhas de plântulas de <i>G. americana</i> após 120 h de exposição ao Cd em solução nutritiva. Na sequência da esquerda para a direita se refere a folha do tratamento controle e das concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 mg Cd L ⁻¹ , respectivamente, sem sintomas visuais de toxicidade por Cd (A), e com clorose e necrose intensa (B).....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Identificações prováveis dos ESTs gerados e agrupados em 9 classes funcionais.....	34
Tabela 2 – Identificações prováveis das seqüências mais abundantes na biblioteca de cDNA induzida por Cd.....	35

1. INTRODUÇÃO

Ações antrópicas vêm promovendo um aumento da concentração de metais pesados na Biosfera, que, ao contrário da maioria dos poluentes, não são biodegradáveis e persistem no ambiente (PRASAD; FREITAS, 2003). Dentre estes, o cádmio (Cd) se destaca por ser um elemento extremamente móvel, de alta toxicidade e com funções fisiológicas desconhecidas tanto em plantas como em animais (MA et al., 2003).

O Cd, quando em excesso, pode estimular nos vegetais a formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio, resultando em severo estresse oxidativo. Esse distúrbio do controle redox da célula desencadeia uma sequência de reações, levando a inibição do crescimento, ao estímulo do metabolismo secundário, a lignificação e a morte celular (SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002). Morte celular induzida por Cd pode apresentar aspectos apoptóticos, como condensação da cromatina, clivagem do DNA nuclear em oligonucleossomos e formação de corpos apoptóticos. Normalmente, quando plantas são expostas a altas concentrações de Cd, é disparado um processo necrótico (BEHBOODI; SAMADI, 2004). Além disso, diversos estudos têm demonstrado em plantas que o Cd causa diminuições da transpiração e da fotossíntese em nível foliar, interfere na absorção de nutrientes minerais essenciais ao desenvolvimento da planta, promove clorose e necrose das folhas, inibe o crescimento de raízes e da parte aérea (SANITÁ di TOPPI; GABBRIELLI, 1999), dentre outros. Algumas plantas, no entanto, têm desenvolvido mecanismos de tolerância, permitindo-as sobreviver em ambientes contaminados por metais pesados, como a síntese de fitoquelatinas e de metalotioneínas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). O Cd é um forte indutor da formação de fitoquelatinas, que se liga a esse elemento metálico, transporta-o para o vacúolo e regula a sua disponibilidade na célula vegetal (ZENK, 1996). Atualmente, tem-se

pouco conhecimento em relação à função das metalotioneínas na tolerância de plantas ao estresse ocasionado por Cd. Geralmente, estão associadas à proteção contra estresse induzido por Cu (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

Neste contexto, a seleção de espécies arbóreas, com capacidade hiperacumuladora de metais pesados, para serem utilizadas como fitorremediadoras, é uma prática ecológica e economicamente viável para a despoluição de ambientes contaminados por metais pesados. Estas plantas devem apresentar, principalmente, crescimento rápido, grande produção de biomassa, sistema radicular profundo, para explorar um maior volume de solo e, capacidade para crescer em solos pobres em nutrientes (PILON-SMITS, 2005).

Genipa americana L., uma espécie arbórea e frutífera da família Rubiaceae, apresenta ampla dispersão nas florestas neotropicais e intensa regeneração em áreas de elevada atividade antrópica. Seus frutos são muito apreciados e a madeira é de boa qualidade. Além disso, é considerada uma espécie tolerante ao alagamento, indicada para a recomposição de matas ciliares (MIELKE et al., 2003) e apresenta potencialidades fitorremediadoras, como rizofiltradora e fitoestabilizadora de cromo (BARBOSA, 2005).

O presente trabalho teve como objetivos (i) avaliar as potencialidades de *G. americana* como espécie lenhosa fitoextratora e hiperacumuladora de Cd, para recomposição de matas ciliares associadas às bacias hidrográficas com altos índices de contaminação por esse elemento metálico, (ii) identificar genes envolvidos no processo de morte celular programada e de tolerância ao Cd pela análise da biblioteca de cDNA induzida por Cd, (iii) analisar indicadores de alterações celulares característicos de morte celular programada induzida por Cd e (iv) estudar os efeitos de Cd sobre a atividade de peroxidases, as trocas gasosas foliares, a emissão de fluorescência da clorofila *a* e a composição química em plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cádmio (Cd)

2.1.1. Características químicas e influência na cadeia alimentar

Os metais pesados são todos aqueles com densidade maior que $5,0 \text{ g cm}^{-3}$, podendo ocorrer naturalmente na crosta terrestre ou serem liberados no ambiente por meio de atividades industriais, mineração, uso de fertilizantes e pesticidas. São considerados como o principal grupo de poluentes inorgânicos e causam sérios problemas aos seres vivos, quando presentes em concentrações elevadas na atmosfera, no solo e na água (YANG et al., 2005; SANITÁ di TOPPI; GABRIELLI, 1999). Dos 90 elementos metálicos que ocorrem naturalmente, 53 são metais pesados (GARDEA-TORRESDEY et al., 2005).

O Cd é um metal pesado classificado como um elemento de "toxicidade intermediária" que ocorre na crosta terrestre em baixas concentrações, associado geralmente ao zinco, na forma de depósito de sulfeto. O Cd apresenta peso molecular 112,41g, número atômico 48 e densidade $8,64 \text{ g cm}^{-3}$. Os pontos de fusão e ebulição do Cd são aproximadamente 321°C e 765°C , respectivamente, sendo liberado como vapor por refinarias de metais ou operações industriais que exijam altas temperaturas, ou mesmo quando em temperaturas inferiores ao seu ponto de ebulição e no estado sólido (ROMANI et al., 2002; SANITÁ di TOPPI; GABRIELLI, 1999; PRASAD, 1995; MALAVOLTA, 1994).

O Cd é utilizado industrialmente principalmente quando se requer alta estabilidade e resistência ao calor, ao frio e a luz. Por isso, é abundantemente usado em revestimentos à prova de corrosão, em ligas metálicas, formulação de pigmentos, fabricação de baterias, fertilizantes fosfatados, estabilizantes para

plásticos de polivinil, indústrias automotivas, vidros, dentre outros (SANITÁ di TOPPI; GABRIELLI, 1999; PRASAD, 1995; MALAVOLTA, 1994). Além disso, em áreas com baixa atividade antropogênica pode ser liberado como resultado de processos de mineralização de rochas (SANITÁ di TOPPI; GABRIELLI, 1999). No ambiente, tende a concentrar-se nos solos e nos sedimentos de sistemas aquáticos, tornando-se potencialmente disponível ao sistema radicular de plantas e aos animais (PRASAD, 1995).

Estima-se que cerca de 30.000 toneladas de Cd sejam descarregadas anualmente no ambiente, provenientes de atividades antropogênicas. Os solos com concentrações de Cd variando entre 0,32 a 1 μM são classificados como moderadamente poluídos (SANITÁ di TOPPI; GABRIELLI, 1999). A água destinada ao abastecimento para consumo humano, à atividade de pesca e a irrigação de hortaliças e frutíferas arbóreas pode apresentar até 0,001 mg Cd L⁻¹ (CONAMA, 2005).

Alguns metais pesados, particularmente Cu e Zn, embora sejam altamente tóxicos em concentrações elevadas, são micronutrientes essenciais para vários processos fisiológicos, como constituintes de várias enzimas e proteínas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; HALL, 2002). O Cd, ao contrário, não é considerado elemento essencial e, ou benéfico ao homem. Não se conhece, até o momento, as necessidades fisiológicas humanas deste metal, bem como o nível regulador para mantê-lo em segurança constante no organismo humano (CETEC, 1990).

A aplicação de fertilizantes fosfatados e o uso de resíduos de esgotos na agricultura, assim como as indústrias, são considerados as principais causas de dispersão de Cd em gêneros alimentícios e no ambiente. Além disso, outros fatores também podem contribuir para o aumento da concentração deste metal no ambiente terrestre, como a sua emissão natural e a sua bioacumulação em plantas, mamíferos, crustáceos e moluscos. As plantas tendem a ser menos susceptíveis aos efeitos tóxicos de Cd, porém o acúmulo deste metal em seus tecidos aumenta o risco de transferência, por meio da cadeia alimentar, para seres humanos e animais (DICKINSON; PULFORD, 2005). As principais fontes alimentares de Cd na população humana são cereais (arroz e trigo), batatas, vísceras, particularmente rim e fígado, crustáceos e moluscos. Os peixes acumulam apenas pequenas quantidades, não constituindo uma fonte primária deste metal na dieta humana (SATARUG et al., 2003).

As principais vias de contaminação por Cd, em humanos, são a inalação e a ingestão. A exposição ao Cd pode ser classificada como ocupacional ou não ocupacional. Na exposição ocupacional, os trabalhadores de indústrias estão sujeitos a inalar o Cd ou retê-lo quando em contato com a pele. Exposições não ocupacionais podem ocorrer por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. Também, o hábito de fumar é uma importante fonte de contaminação para o homem, pelo fato de algumas espécies pertencentes ao gênero *Nicotiana* serem acumuladoras deste elemento metálico. A vida média de Cd no corpo humano varia de 10-30 anos, cerca de 50 a 75% de Cd, é absorvido e depositado nos rins, fígado e ossos, impedindo que estes órgãos desempenhem adequadamente suas funções metabólicas (IL'YASOVA; SCHWARTZ, 2005; BERNARD; LAUWERYYS, 1984).

A exposição de seres humanos ao Cd tem sido ligada a numerosos efeitos adversos à saúde, com mudanças patológicas distintas em uma variedade de tecidos e órgãos, incluindo: o desenvolvimento ou a progressão de complicações renais, o surgimento de doenças como a diabetes, a hipertensão, a osteoporose, a leucemia, a infertilidade e o câncer em vários órgãos como rins, pâncreas, pulmão, bexiga, mama e próstata (IL'YASOVA; SCHWARTZ, 2005; JÄRUP; ALFVÉN, 2004; SATARUG et al., 2003).

2.1.2. Interferência de cádmio no metabolismo de plantas

A exposição de plantas a concentrações elevadas de Cd promove a diminuição nas atividades de enzimas relacionadas com a remoção de ânions superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ocasionando subsequente o acúmulo destas moléculas em nível celular que induz o estresse oxidativo. Essas espécies reativas de oxigênio (ERO) na ausência de mecanismos de proteção podem promover a oxidação de proteínas e lipídios de membranas celulares, ou ainda, danificar o DNA (CHAOUÏ; EL FERJANI, 2005; CHO; SEO, 2005).

Os efeitos deletérios resultantes do estado oxidativo da célula podem ser aliviados por pequenos metabolitos reduzidos, tais como o ascorbato (ASC), a glutatona (GSH), o α -tocoferol, os carotenóides, os flavonóides, o ácido úrico e as enzimas antioxidativas, tais como: dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT),

e as enzimas do ciclo ASC-GSH [peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodeidroascorbato (MDHAR), redutase do deidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathione (GR)] (CHAOUI; EL FERJANI, 2005). A SOD constitui o passo primário no sistema de defesa, pois esta enzima dismuta o O_2^- a H_2O_2 e O_2 . O acúmulo de H_2O_2 é restringido por meio da ação de catalases ou pelo ciclo ASC-GSH, onde a APX reduz o H_2O_2 a H_2O . Finalmente, a redutase da glutathione catalisa a redução dependente de NADPH de GSSG oxidado a GSH reduzido (NOCTOR et al., 2002).

O Cd também pode estimular algumas enzimas que limitam o crescimento da célula e aceleram o envelhecimento do tecido. Este processo é mediado principalmente pela atividade de peroxidases (POD), ligadas covalentemente ou ionicamente a parede celular, que estão envolvidas na polimerização de monômeros de fenólicos de suberina, no metabolismo de distensão e de lignificação. O acúmulo de fenóis insolúveis, como lignina, na parede secundária de células vegetais expostas ao Cd, pode estar relacionado ao aumento na atividade destas peroxidases (CHAOUI; EL FERJANI, 2005). Todavia, a atividade de peroxidases demonstra, ainda, uma estreita relação com as mudanças nos processos fisiológicos tais como respiração, fotossíntese e transpiração, assim estas enzimas apresentam potencialidades para atuar como indicadoras de sensibilidade da atividade metabólica comprometida (MACFARLANE; BURCHETT, 2001).

A capacidade das plantas aumentarem a proteção antioxidativa combatendo as consequências negativas do estresse por metais pesados, parece ser limitada, pois a exposição das plantas a elevadas concentrações de metais, em alguns casos, resulta em decréscimo e não em aumento nas atividades de enzimas antioxidativas (SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002). De acordo com as propriedades físico-químicas do metal, diferentes mecanismos de toxicidade podem ser distinguidos: (i) produção de EROs por autooxidação e reação Fenton; (ii) bloqueio de grupos funcionais essenciais em biomoléculas; (iii) substituição de íons metálicos essenciais por outro em biomoléculas (SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002).

O Cd é um metal que não pertence ao grupo de metais de transição, sendo incapaz de catalisar reações do tipo Fenton, conseqüentemente não interfere diretamente no metabolismo de oxigênio celular. Dessa maneira, ERO pode acumular indiretamente pela operação ineficiente, induzida pelo Cd, do ciclo ASC-GSH, provocando o acúmulo de H_2O_2 (CHO; SEO, 2005). Logo, a capacidade da espécie vegetal de sintetizar GSH parece ser crucial para proteger a célula do

estresse oxidativo ocasionado por Cd. Assim, Schützendübel e Polle (2002) sugeriram que o Cd induz uma perda transiente na capacidade antioxidativa, talvez acompanhada por um estímulo de enzimas que produz oxidantes, o que resulta no acúmulo de H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio, por sua vez, atua como uma molécula sinalizadora, disparando o sistema de defesa secundário que causará a lignificação da parede celular, diminuindo a viabilidade da célula e finalmente induzindo morte celular. As células que passam por morte celular demonstram um padrão distinto de fragmentação de DNA típica de morte celular programada (MCP) (BEHBOODI; SAMADI, 2004).

O Cd também atua diretamente no processo fotossintético. De acordo, com Mobin e Khan (2006), os níveis excessivos de ERO podem danificar os cloroplastos, restringindo a atividade de enzimas envolvidas no ciclo de Calvin, interferindo na assimilação de carbono e, dessa forma, diminuindo as taxas fotossintéticas com o aumento da concentração de Cd em solução nutritiva e com o tempo de exposição. No entanto, para Chugh e Sawhney (1999) o declínio no teor de clorofila constitui uma das possíveis causas do decréscimo nas atividades dos fotossistemas I (PS-I) e II (PS-II) em plantas expostas ao Cd, pois diminui a eficiência na captação de luz.

Associado ao declínio na fotossíntese, há também um decréscimo na respiração e na transpiração foliar, ocasionando diminuição no acúmulo de biomassa nos diferentes órgãos da planta. Em algumas espécies, o Cd, pode promover decréscimos de até 50% na produção de biomassa seca (PAGE et al. 1972). Além disso, é facilmente absorvido e translocado para diferentes partes da planta (FLORIJJN et al., 1993). Adicionalmente, a presença de Cd no substrato de crescimento das plantas pode influenciar a concentração de outros elementos minerais nos tecidos vegetais (RODECAP et al., 1994), demonstrando sua influência na absorção de elementos essenciais. O Cd pode influenciar a absorção de Cu, Fe, Zn e Mn pela competição por sítios ou processos compartilhados por esses cátions (CATALDO et al., 1983). Dessa maneira, os sintomas visuais de toxidez mais comumente observados em espécies vegetais são clorose internerval, necrose, murchamento e conseqüente senescência foliar. Além disso, o excesso de Cd pode promover o escurecimento acentuado, a inibição do crescimento e o engrossamento de raízes, e induzir morte de gemas apicais e diminuição na emissão de novas raízes e folhas (OLIVEIRA et al., 2001; SOARES et al., 2005).

2.1.3. Mecanismos de Tolerância ao Cd em plantas

Fatores fisiológicos e genéticos determinam quais espécies podem ou não evoluir tolerância (BAKER; PROCTOR, 1990). Existem evidências genéticas para múltiplas origens evolucionárias independentes de populações tolerantes a metais pesados (VEKEMANS; LEFÈBVRE, 1997). As populações desenvolvem tolerância somente para diferentes metais presentes em altas concentrações em seu solo de origem, sugerindo que os genes para diferentes tipos de tolerância são diferentes e que a seleção age para aumentar a frequência de genes que dão tolerância a um metal em particular, presente em um determinado local (MACNAIR, 1993). Há também informações acerca de co-tolerância, onde a tolerância a um metal confere, de alguma forma, tolerância a outros metais que não estão presentes em concentrações tóxicas no solo no qual as plantas estão crescendo (SCHAT; VOOIJS, 1997).

As plantas apresentam vários mecanismos potenciais em nível celular que podem estar envolvidos na destoxificação e tolerância ao estresse ocasionado por metais pesados. Deste modo, existe pouca evidência de que espécies ou ecótipos tolerantes demonstram um aumento na defesa oxidativa. Ao contrário, plantas tolerantes revelam um aumento nos mecanismos homeostáticos que contribuem para evitar a translocação do metal ou mantê-lo em uma forma estável. As estratégias para evitar a translocação de metais pesados são diversas. Dentre estas se destacam: restrição do movimento do metal para as raízes por micorrizas; ligação do metal à parede celular; redução do influxo através da membrana plasmática; efluxo ativo para o apoplasto; agentes quelantes de metais no citosol (ácidos orgânicos, aminoácidos e peptídeos); reparo e proteção da membrana plasmática; transporte do complexo fitoquelatina-Cd para o vacúolo; transporte e acúmulo de metais no vacúolo (HALL, 2002).

Diferentes mecanismos de tolerância podem atuar em combinação para inibir os efeitos fitotóxicos de Cd. O efluxo de íons pela membrana plasmática ou transporte para o vacúolo são duas vias que podem diminuir os níveis tóxicos de metais no citosol. Assim, análises de sistemas de transporte para o tonoplasto têm adicionado suporte para um mecanismo vacuolar de tolerância (HALL, 2002). Em folhas de *Thlaspi caerulescens*, o acúmulo de Cd no vacúolo é considerado importante para o seqüestro de Cd em células epidérmicas, pois foi observado que

as células maiores da epiderme apresentaram as maiores concentrações de Cd, em relação às células dos demais tecidos foliares. Acúmulo de Cd na parede celular também foi constatado como um possível mecanismo de tolerância nesta espécie (COSIO et al., 2005).

Proteínas de choque térmico (HSPs, *heat shock proteins*) tem sua expressão aumentada em resposta as elevações repentinas de temperatura. Estas proteínas podem ser encontradas em todos os grupos de organismos e são classificadas de acordo com o tamanho molecular, sendo expressas em resposta a uma variedade de condições estressantes, incluindo metais pesados; agem como chaperonas moleculares protegendo e reparando proteínas maldobradas sob determinadas condições de estresse (HALL, 2002). Em cultura de células de *Lycopersicon peruvianum*, uma grande quantidade de HSP (HSP70) foi expressa quando as células foram submetidas ao tratamento com Cd (NEUMANN et al., 1994). A localização do anticorpo demonstrou que a HSP70 estava presente no núcleo, citoplasma e membrana plasmática, sugerindo que esta proteína poderá estar envolvida na proteção de membranas durante o estresse induzido por Cd.

Outros mecanismos de tolerância ao Cd igualmente importantes consistem no acúmulo deste metal em células especializadas da epiderme, os tricomas, e a co-cristalização de Cd com Ca formando cristais no interior do vacúolo. Em folhas de *Arabidopsis halleri* foi constatado que tricomas acumulam Cd e Zn (KÜPPER et al., 2000). O seqüestro de Cd também foi observado em tricomas glandulares de *Nymphaea* (LAVID et al., 2001) e de *Brassica juncea* (SALT et al., 1995). A associação de Cd com Ca para formar cristais foi constatada em *Nymphaea* (LAVID et al., 2001) e *Eichhornia crassipes* (MAZEN; EL MAGHRABY, 1997).

A formação de quelatos com metais pesados no citosol, por agentes quelantes de alta afinidade, é um dos mecanismos mais estudados de tolerância a metais. Os agentes quelantes incluem aminoácidos, ácidos orgânicos e duas classes de peptídeos as fitoquelatinas (FQs) e as metalotióneínas (MTs). As MTs são peptídeos, com baixo peso molecular, ricos em cisteínas encodado por uma família de genes. Em constraste, as FQs são peptídeos ricos em cisteínas sintetizados enzimaticamente no citoplasma. (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

2.1.3.1. Fitoquelatinas (FQs)

As FQs já foram identificadas em uma variedade de espécies vegetais, em alguns microorganismos, invertebrados e fungos. As FQs formam uma família de peptídeos com múltiplas repetições do dipeptídeo γ -GluCys seguido por uma Gly terminal, que tem uma estrutura geral $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ onde $n = 2-11$. Porém, variantes estruturais têm sido identificados em algumas espécies vegetais, por exemplo, $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Ser}$ e $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Glu}$. As FQs são estruturalmente relacionadas à glutathiona (GSH; $\gamma\text{-GluCysGly}$), e numerosos estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos tem confirmado que GSH (ou, em alguns casos compostos relacionados) é o substrato para a síntese de FQ (ZENK, 1996; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

A sintase de FQ, que catalisa a síntese de FQs utilizando GSH como substrato, foi caracterizada por Grill et al. em 1989 e a clonagem de seus genes só foi descrita em 1999. Os genes foram isolados simultaneamente por três grupos de pesquisadores usando diferentes abordagens. Dois grupos usaram a expressão de bibliotecas de cDNA de *Arabidopsis* e trigo em *S. cerevisiae* para identificar genes que conferem resistência ao Cd [*AtPC1* e *TaPCS1*, respectivamente]. O terceiro grupo identificou *AtPC1* por meio de clonagem posicional do gene *CAD1* de *Arabidopsis* (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

Tanto em plantas como em leveduras os complexos FQ-Cd são seqüestrados no vacúolo. Devido ao pH ácido do vacúolo o metal é liberado do complexo e se liga aos ácidos orgânicos deste orgânulo celular, enquanto que a molécula de FQ é subsequenteemente degradada e os aminoácidos individuais retornam ao citoplasma (ZENK, 1996). Este acúmulo parece ser mediado por um transportador Cd/H^+ do tipo antiporte e por um do tipo cassete ligadores de ATP (ABC) localizados no tonoplasto, que são codificados pelo gene *Hmt1* (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; HALL, 2002).

As FQs têm sido amplamente estudadas, particularmente, em relação à tolerância ao Cd (ZENK, 1996; de KNECHT et al., 1994). Alguns estudos têm demonstrado que espécies sensíveis ao Cd geralmente não sintetizam FQs, como comprovado pela análise de células cultivadas de *Vigna angularis*, que são

hipersensíveis ao Cd, deficientes em FQ e não apresentam atividade da sintase da FQ (INOUE et al., 2000).

2.1.3.2. Metalotioneínas (MTs)

Após a descoberta das MTs há mais de 40 anos, como proteínas que se ligam ao Cd, os genes e os produtos de tradução têm sido encontrados nos reinos animal e vegetal, assim como no procarioto *Synechococcus*. O grande número de resíduos de cisteínas nas MTs liga-se a uma variedade de metais por meio de ligações mercaptídeo. As MTs tipicamente contêm dois domínios ricos em cisteínas que se ligam ao metal e são classificadas de acordo com a organização destes resíduos (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

A primeira MT identificada em planta foi isolada do trigo (LANE et al., 1987) e, após esta descoberta, uma variedade de genes de MT já foram isoladas em vegetais. Vários sistemas têm sido propostos para classificar as MTs, um deles divide as MTs em três grupos. As MTs classe I que possuem 20 resíduos de cisteínas altamente conservados, categorização baseada nas MTs de mamíferos, e são amplamente distribuídas nos vertebrados. As MTs sem uma organização exata de cisteínas são referidas como MTs classe II e incluem todas aquelas presentes em plantas, fungos e invertebrados. Neste sistema de classificação, FQs são confusamente descritas como MTs classe III (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; MA et al., 2003). Contudo, um sistema apresentado por Cobbett e Goldsbrough (2002) é capaz de representar quase todos os genes de MTs vegetais conhecidos em quatro categorias com base na sequência de aminoácidos:

- MT tipo 1 possui um total de seis motivos Cys-Xaa-Cys que estão distribuídos igualmente em dois domínios. Na maioria, os dois domínios são separados por aproximadamente 40 aminoácidos, que incluem aminoácidos aromáticos. Esta grande região espaçadora é um aspecto comum de MTs vegetais e contrasta com muitas outras MTs, nas quais os domínios ricos em cisteínas são separados por uma região com menos de 10 aminoácidos sem resíduos aromáticos.

- MT tipo 2 também possui dois domínios ricos em cisteínas separados por uma região espaçadora de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, sendo que este espaçador é variável entre as espécies. No entanto, o primeiro par de cisteínas é apresentado como um motivo Cys-Cys, nas posições 3 e 4 dos

aminoácidos destas proteínas. Um motivo Cys-Gly-Gly-Cys está presente no domínio N-terminal rico em cisteína. As seqüências do domínio N-terminal são altamente conservadas. O domínio C-terminal apresenta três motivos Cys-Xaa-Cys.

- MT tipo 3 apresenta apenas quatro resíduos de Cys no domínio N-terminal. A seqüência consenso para as três primeiras é Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys. A quarta Cys está contida dentro de um motivo altamente conservado, Gln-Cys-Xaa-Lys-Lys-Gly. Os seis resíduos de Cys no domínio C-terminal são organizados como motivos Cys-Xaa-Cys. Como a maioria das MTs vegetais dos tipos 1 e 2, os dois domínios são separados por aproximadamente 40 aminoácidos.

- MT tipo 4 difere das outras MTs por apresentar três domínios ricos em Cys, cada um contendo 5 ou 6 resíduos de Cys, os quais são separados por 10 a 15 aminoácidos. Muitas das Cys são apresentadas como motivos Cys-Xaa-Cys. A expressão da MT 4, assim como a MT Ec de trigo, é restrita a sementes em desenvolvimento.

A expressão de genes de MT tipo 1 tende a ser maior em raízes do que na parte aérea, por outro lado, o inverso é observado para MT tipo 2. As MTs tipo 3 são altamente expressadas nos frutos durante o seu amadurecimento, e também expressada em folhas de plantas que não produzem frutos carnosos como *Arabidopsis* (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

Apesar de haver confirmação da presença de MTs em várias plantas, suas funções ainda são incertas. As funções das MTs parecem ser bastante diversificadas. Existem relatos de que a expressão de genes de MTs pode ser induzida no desenvolvimento de frutos de *Actínia deliciosa* var. *deliciosa*; na senescência foliar em *Brassica* e *Arabidopsis*; durante infecção viral em *Nicotiana*; no estresse por calor e na privação de glicose em arroz; na privação de glicose e diferenciação de tecido em milho; e no estresse por metal, principalmente em resposta ao Cu em *Arabidopsis*, *Silene vulgaris*, *Brassica napus* e *Festuca rubra* (MA et al., 2003). Ainda, MTs são expressas em respostas hipersensíveis a patógenos em *Arabidopsis* (BUTT et al., 1998).

2.1.4. Biblioteca de cDNA

As técnicas de Biologia Molecular, em especial o desenvolvimento de projetos cujo objetivo é o sequenciamento de genomas completos, mudaram o paradigma fundamental da biologia. Antes, observada a função buscava-se a proteína. Hoje, conhecida a sequência primária da proteína, busca-se a sua função. Muitas funções celulares são executadas de forma redundante na célula e a função de uma determinada proteína depende do “contexto funcional” onde está inserida. Diante disso, as abordagens experimentais que analisam o conjunto de proteínas, cuja expressão se modifica em uma condição funcional específica, permitem identificar o conjunto de proteínas que passa a se expressar mais ou a se expressar menos, ou mesmo que deixa de se expressar em situações específicas (REBOUÇAS; GOMES, 1999).

Para situações de estresse em plantas, ocasionados por fatores abióticos, em que se deseja identificar os genes expressos nesta condição, uma biblioteca de cDNA é de grande utilidade. O primeiro passo para catalogar e categorizar geneticamente respostas de estresse abiótico é a descoberta de genes por sequenciamento parcial em grande escala de clones de cDNA ou ESTs (*Expressed Sequence Tags*), pois constitui um método rápido para o isolamento de genes quando comparado ao sequenciamento genômico. Dessa maneira, a descoberta de genes em muitas plantas é primariamente baseada no sequenciamento de ESTs, que são sequências curtas obtidas a partir das extremidades de cDNAs (ZHANG et al., 2001; CUNHMAN; BOHNERT, 2000).

O fato de que, relativamente, apenas determinados genes possam ser expressos pode ser utilizado na preparação da biblioteca de cDNA. Dessa forma, apenas aqueles genes que tiverem sendo expressos são transcritos em mRNA. O mRNA, então, pode ser convertido em DNA pela síntese do DNA complementar (cDNA) com o uso da enzima transcriptase reversa, que sintetiza uma fita polinucleotídica de DNA complementar a uma fita de RNA existente. Uma vez que a fita de cDNA tenha sido sintetizada, o membro RNA da molécula híbrida pode ser parcialmente degradado, por tratamento com RNase. Os fragmentos remanescentes de RNA servem, então, como iniciadores para a DNA-polimerase I, a qual sintetiza a segunda fita de cDNA, resultando em um fragmento de DNA de fita dupla que pode

ser ligado a um vetor e clonado. Os clones de cDNA resultantes são representativos do mRNA presente na preparação original (BROWN, 2003).

Os ESTs gerados por esse procedimento podem ser comparados a genes identificados disponíveis no *Genbank*. Os resultados das comparações são usados como um guia para determinar prováveis funções para os clones de cDNAs. Por meio das prováveis identificações dos ESTs, genes específicos podem ser selecionados para um estudo completo. Uma proteína ou ácido nucléico obtido experimentalmente também pode ser comparado com ESTs, disponíveis em banco de dados, para verificar se o cDNA para o gene já foi clonado. Estes métodos têm levado a uma rápida identificação de genes em muitos organismos e acelerado a pesquisa, pois fornece material genético para investigações mais aprofundadas (COVITZ et al., 1998).

Na área da bioinformática, avanços significativos têm sido obtidos para comparações de seqüências, como a disponibilização de novos softwares adequados para a manipulação de dados genômicos. Assim, a ferramenta mais popular para pesquisa de seqüência em banco de dados é o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que executa comparações de seqüências em pares, buscando regiões de similaridade local. O BLAST pode executar centenas ou milhares de comparações de seqüências em minutos. Originalmente, o BLAST procurava apenas alinhamentos sem *gaps*, porém houve novas inclusões no pacote do software, que realizam a procura por alinhamentos com *gaps*. Também foi adicionado ao programa BLAST original o PSI-BLAST (*Position Specific Iterative BLAST*) que aumenta a especificidade das pesquisas de bancos de dados (ALTSCHUL et al., 1997). Existem duas implementações do algoritmo BLAST, o NCBI BLAST e WU-BLAST, que podem ser usados como serviços da *Web* e como pacotes de software para *download*.

2.2. Fitorremediação

O termo fitorremediação (“fito” significa planta e o sufixo latino “remedium” significa restaurar ou remediar) tem sido utilizado para designar um conjunto de tecnologias que faz uso de processos, que ocorrem naturalmente, pelos quais as plantas e a flora microbiana em sua rizosfera degradam e seqüestram poluentes orgânicos e inorgânicos de solos e águas contaminadas (PRASAD; FREITAS, 2003; PILON-SMITS, 2005).

O conhecimento sobre a capacidade de plantas acumularem metais em seus tecidos surgiu inicialmente de observações de espécies vegetais denominadas “metalófitas”, que apresentavam alterações morfológicas em solos com altas concentrações de metais. Esse conhecimento, utilizado empiricamente na Ásia e na África desde tempos remotos, só foi sistematizado na segunda metade do século XX (PORTO, 1989). Baumann, no século XIX, identificou plantas capazes de acumular altas concentrações de Zn. Minguzzi e Vergano, no século XX, verificaram que determinadas espécies vegetais acumulavam até 1% de Ni em sua parte aérea (YANG et al. 2005). Apesar disso, a idéia de usar plantas para hiperacumular metal de solos contaminados só foi introduzida em 1983, sendo apresentada à opinião pública apenas em 1990 (CHANEY et al., 1997). Desde então, vários estudos vêm sendo conduzidos com o propósito de elucidar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos das plantas que acumulam tanto metais como outros poluentes em seus tecidos.

Os poluentes orgânicos são resultantes de atividades antrópicas e xenobióticos aos organismos, sendo liberados no ambiente via derramamentos (solventes e combustíveis), atividades militares (explosivos e armas químicas), agricultura (pesticidas e herbicidas), indústrias (química e petroquímica) e tratamento de madeira. Os poluentes inorgânicos ocorrem como elementos naturais na crosta terrestre ou atmosfera, dentre estes estão os macro e micronutrientes minerais e, também, podem ser provenientes de atividades antrópicas tais como mineração, indústria e agricultura (PILON-SMITS, 2005).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para descontaminação de poluentes tóxicos no ambiente, porém são difíceis de serem implementados e apresentam um alto custo efetivo (DICKINSON, 2000). A fitorremediação tem alcançado popularidade em agências governamentais e indústrias que dispõem de orçamentos

limitados, principalmente pelos baixos custos quando comparada aos outros métodos de remediação (CHANEY et al., 1997; PILON-SMITS, 2005). Além disso, é um processo sustentável, ecológico e oferece a possibilidade de recuperação de elementos metálicos (YANG et al. 2005). Contudo, esta tecnologia tem suas limitações, pois as espécies vegetais utilizadas devem possuir a capacidade de agir sobre o poluente. Além disso, o nível de toxicidade e o clima deverão permitir o desenvolvimento da espécie. Portanto, tecnologias de remediação não biológicas, biorremediação e fitorremediação não são mutuamente exclusivas. Às vezes é necessária a combinação destes diferentes métodos para que a localidade seja totalmente descontaminada (PILON-SMITS, 2005). A fitorremediação, por sua vez, pode ser usada para substratos sólidos, líquidos e gasosos e consiste em cinco principais tecnologias: fitoextração, rizofiltração, fitoestabilização, fitovolatilização e fitodegradação.

A fitoextração é um processo pelo qual as plantas absorvem poluentes do solo transportando-os para a parte aérea, onde são acumulados. A parte aérea pode ser coletada, incinerada e disposta em aterro sanitário. No caso de espécies lenhosas, a madeira poderá ser aproveitada, por exemplo, em marcenarias e indústrias de papel (PILON-SMITS, 2005). Ainda, metais valiosos como Au e Ag podem ser recuperados dos tecidos vegetais, processo chamado de fitomineração (GARDEA-TORRESDEY et al., 2005). A fitoextração é adequada para remediação a longo prazo. O tempo requerido depende dos níveis de contaminação do local, mas normalmente alcança de 1 a 20 anos (KUMAR et al., 1995).

Denomina-se rizofiltração a capacidade das raízes de espécies vegetais de absorverem, concentrarem e precipitarem poluentes de águas contaminadas. É indicada no tratamento de grandes volumes de água com baixo nível de contaminação. As plantas usadas para rizofiltração não devem ser eficientes na translocação do poluente para a parte aérea (DUSHENKOV et al., 1995). Comumente, as espécies aquáticas são recomendadas para tal processo, porém as espécies terrestres, tanto herbáceas como arbóreas, avaliadas em sistemas hidropônicos, têm demonstrando potencial para remoção de poluentes aquáticos (SALT et al., 1995; BARBOSA, 2005; PILON-SMITS, 2005).

Na fitoestabilização as plantas reduzem a mobilidade e a disponibilidade do poluente no solo pela conversão a uma forma menos biodisponível ou pela precipitação na rizosfera. As espécies vegetais selecionadas devem apresentar

baixa translocação do poluente para os tecidos que podem ser consumidos por humanos e animais e apresentarem parte aérea e sistema radicular denso. Para a fitoestabilização é mais adequado o uso de espécies arbóreas. (PRASAD; FREITAS, 2003; PULFORD; WATSON, 2003).

Por meio da fitovolatilização as plantas absorvem o poluente do solo, convertem-no em sua forma gasosa, liberando-o na atmosfera em suas formas menos tóxicas. É uma tecnologia aplicável para metais que ocorrem em sua forma gasosa no ambiente como As, Se e Hg (PRASAD; FREITAS, 2003). Por outro lado, a fitodegradação consiste na biodegradação de poluentes orgânicos na rizosfera ou diretamente via atividade enzimática (PILON-SMITS, 2005).

2.3. Fitorremediação com o uso de plantas lenhosas

A escolha da espécie é de importância primária para que as estratégias de fitorremediação obtenham sucesso. Assim, as espécies vegetais ideais para a fitorremediação devem apresentar crescimento rápido, sistema radicular profundo, produzir elevada quantidade de biomassa, serem capazes de desenvolver-se em solos com deficiências nutricionais, tolerar e acumular o contaminante de interesse (PILON-SMITS, 2005; YANG et al., 2005).

Existem cerca de aproximadamente 400 espécies hiperacumuladoras de metais, pertencentes às famílias Asteraceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Cyperaceae, Cunouniaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Lamiaceae, Poaceae, Violaceae e Euphorbiaceae, porém a maioria destas espécies apresenta crescimento lento, baixa produção de biomassa e sistema radicular superficial (PRASAD; FREITAS, 2003). Como consequência o interesse no uso potencial de árvores para fitorremediação tem aumentado, por serem grandes produtoras de biomassa e, certas espécies, terem uma ampla variabilidade genética (PULFORD; WATSON, 2003; DICKINSON; PULFORD, 2005).

A grande variabilidade genética e a tolerância facultativa das espécies arbóreas, tal como a redistribuição de raízes para zonas menos contaminadas do solo, permitem que espécies não selecionadas para tolerância consigam sobreviver em ambientes poluídos. Todavia, a característica fundamental que torna o uso de espécies arbóreas adequada para fitorremediação é a grande biomassa do caule e da raiz. A compartimentalização do metal dentro destes órgãos pode variar entre as

espécies. O lenho e a casca são importantes depósitos para o poluente, com tecido adicional sendo formado a cada estação de crescimento. As raízes podem atuar na estabilização direta do poluente no solo. Em adição, a cobertura vegetal diminui o risco de erosão do solo pelos ventos e pela água evitando o espalhamento do contaminante (PULFORD; WATSON, 2003).

Estudos de campo têm demonstrado que árvores podem permanecer saudáveis e produtivas na presença de níveis extremamente elevados de contaminação por metais (DICKINSON, 2000). Dessa forma, diferentes espécies pertencentes aos gêneros *Alnus*, *Betula*, *Crataegus*, *Eucalyptus*, *Salix*, *Quercus*, dentre outros, têm sido avaliadas em solos contaminados por metais pesados e, também, em solução nutritiva que possibilita uma análise rápida e mais aprofundada dos processos metabólicos envolvidos no estabelecimento e tolerância destas espécies (DICKINSON; PULFORD, 2005; SOARES et al., 2005; DICKINSON, 2000; PRASAD; FREITAS, 2000).

2. 4. *Genipa americana*

Genipa americana L. é uma espécie arbórea da família Rubiaceae, semidecídua, com caule reto, copa arredondada, ramos numerosos, folhas opostas subcoriáceas e glabras, fruto uma baga subglobosa de 8-10 cm de comprimento e 6-7 de diâmetro (CORRÊA, 1969). Inicia a sua frutificação aos seis anos de idade, podendo atingir 25 m de altura e 90 cm de DAP (CARVALHO, 1994).

A espécie *G. americana* é cultivada em todo país e conhecida popularmente como “jenipapo”, “jenipá”, “jenipapinho” ou “janipapa” (LORENZI, 2002). Prefere o litoral e as margens dos rios, mas ocorre também no interior do país, até no alto Amazonas, em terras elevadas, desde que estejam sujeitas a inundação periódica. A sua distribuição estende-se também a outros países desde o México até Argentina (CORRÊA, 1969; CARVALHO, 1994).

O lenho é fácil de ser trabalhado sendo, dessa forma, utilizado na construção civil, marcenaria, carpintaria e xilografia. As raízes e as folhas são usadas na medicina popular no tratamento de enfermidades como gonorréia, diarreia e sífilis. Os frutos são consumidos *in natura* e também utilizados na confecção de sucos, doces, licores e compotas. Além disso, aos frutos são atribuídas propriedades medicinais contra a anemia e icterícia por serem ricos em Fe. A casca e os frutos

contêm substância corante e do tronco pode ser extraído óleo essencial conhecido como “jenipapina” (CORRÊA, 1969; CARVALHO, 1994).

Trata-se de uma espécie secundária tardia, apresenta intensa regeneração em áreas de elevada atividade antrópica, sendo freqüente nas matas ciliares e não tolera frio. Além disso, é uma espécie rústica e pouco exigente em relação ao tipo de solo. Desenvolve-se em solos permeáveis, superficiais a moderadamente profundos e ácidos. Ademais, prefere terrenos úmidos, encharcados ou inundáveis, à margem de rios (CARVALHO, 1994).

Salvador (1986), após estudar a taxa de sobrevivência de *G. americana* em condições de alagamento, constatou que esta espécie tolera 174 dias alagada até quando se encontra totalmente submersa. Andrade et al. (1999) destacam que, após 90 dias sob condições de alagamento, as plântulas apresentaram sobrevivência de 100% sem nenhum sintoma visível de sensibilidade. Adicionalmente, Mielke et al. (2003), utilizando em suas análises parâmetros fisiológicos como trocas gasosas foliares, fluorescência da clorofila e taxa de crescimento, observaram que esta espécie pode sobreviver e crescer por um período de dois meses sob alagamento.

Devido a sua capacidade de tolerar condições de alagamento, *G. americana* é recomendada para reflorestamento de áreas próximas às margens de rios e em locais com inundações periódicas (CARVALHO, 1994; LORENZI, 2002). Aliado a isto, esta espécie também apresenta potencialidades fitorremediadoras, como rizofiltradora e fitoestabilizadora de Cr (BARBOSA, 2005).

3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento I

3.1.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

As plântulas de *G. americana* utilizadas na montagem do experimento foram doadas pelo Instituto Biofábrica do Cacau (IBC), distrito Banco do Pedro, Ilhéus, BA. As sementes, obtidas de árvores subespontâneas no referido distrito, foram semeadas em 18/03/2003 em tubetes plásticos pretos com capacidade de 288 cm³, tendo como substrato artificial [Plantmax[®] (casca de *Pinus* e turfa) + fibra de coco triturada (1:1), enriquecido com Osmocote[®] (19-06-20) e PGmix[®] (14-16-18)] na proporção de 300g de cada produto para 120dm³ do substrato. Os tubetes foram colocados em bandejas plásticas perfuradas, utilizadas como suporte, com capacidade para 54 unidades e mantidos em condições de viveiro, com 50% de irradiância e com irrigação intermitente por microaspersão por 30 s a intervalos regulares de 5 min., no IBC.

Em 02/11/2005 as plântulas (2,8 anos) foram transferidas para a casa de vegetação da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e transplantadas para bandejas plásticas (8 plântulas/bandeja), com capacidade para 30 L, contendo solução nutritiva de 1/4 de força iônica, preparada segundo Hoagland e Arnon (1950), onde permaneceram por um período de 70 dias para aclimação. A solução foi trocada a cada 30 dias e o seu nível diário foi mantido pela reposição diária do volume com água desmineralizada e mantida sob aeração constante. Posteriormente, após a troca da solução nutritiva em 11/01/2006, foram implementados os tratamentos com concentrações crescentes de Cd (0,5, 1, 2, 4, 8

e 16 mg L^{-1}), juntamente com o controle (sem Cd), sob a forma de $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma). As soluções foram monitoradas quanto ao pH e ajustadas para 5,9 utilizando-se NaOH ou HCl.

3.1.2. Extração de RNA e construção da biblioteca de cDNA

Foram realizadas coletas de raízes após 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h de exposição aos tratamentos para as diferentes concentrações de Cd em solução nutritiva. As amostras foram armazenadas a -80°C após fixação em nitrogênio líquido. O RNA total das raízes para a concentração 16 mg Cd L^{-1} dos diferentes tempos de coleta foi extraído de acordo com o protocolo de Gesteira et al. (2003) com algumas modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido usando cadinhos e pistilos autoclavados. O macerado foi colocado até cerca de 1/4 de um tubo de 2 mL (0,3 mL), onde se adicionou 1,5 mL de tampão de extração (ácido bórico 0,2 M, EDTA 10 mM, pH 7,6 ajustado com Tris base), 30 μL de β -mercaptoetanol 13,4 M e 30 μL de SDS a 25%. Em seguida, foi homogeneizado em um vórtex e centrifugado por 10 min. a $17.530 \times g$ em temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada (cerca de 0,9 mL), transferida para um novo tubo e então adicionou-se igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), que foi homogeneizado com a fase aquosa e centrifugado por 10 min. a $17.530 \times g$. Logo após, foi recuperado o sobrenadante (cerca de 1 mL) e adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), que em seguida foi homogeneizado, centrifugado por 5 min. a $17.530 \times g$, e cerca de 700 μL de sobrenadante transferido para um novo tubo. A precipitação do RNA foi realizada com adição de 1/10 de acetato de sódio (3M, pH 4,5), isopropanol a 4°C 1:1 (sobrenadante + acetato de sódio: isopropanol) e manutenção no gelo por 20 min. Após este período o extrato foi centrifugado por 10 min. a 4°C , descartou-se a fase aquosa e o precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% gelado, seco à temperatura ambiente por 10 min. e ressuspendido com 20 μL de água DEPC a 0,1%. Para verificação da qualidade do RNA, procedeu-se eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. O gel foi posteriormente visualizado em transluminador UV (Vilber Loumart) e fotodocumentado em sistema EDAS-290 (Kodak).

O RNA utilizado para confecção da biblioteca de cDNA foi tratado com DNase (Fermentas). Fez-se uma amostra composta por alíquotas de 5 µL dos RNAs extraídos das raízes referente aos diferentes períodos de exposição ao Cd (6, 12, 24, 48, 72 e 96 h). Para construção da biblioteca utilizou-se o kit Smart cDNA CREATOR, conforme descrito pelo fabricante (Clontech). Após o tratamento do RNA com DNase, a primeira fita de cDNA foi sintetizada. Procedeu-se a síntese da segunda fita de cDNA em uma reação de PCR com 24 ciclos. Os cDNAs foram visualizados em gel de agarose a 1%. Posteriormente, os cDNAs foram fracionados por tamanho em CHROMA SPIN -400 Column (Clontech). Obteve-se 14 frações das quais 3 foram selecionadas (4^a, 5^a e 6^a) para reação de ligação ao vetor. As frações foram visualizadas em gel de agarose a 1,1%.

Os cDNAs foram clonados no plasmídeo pGEM-T Easy A137A, eletroporado em células competentes Electromax DH10β (Invitrogen), utilizando-se um eletroporador MicroPulser Electroporator (Biorad). Os clones foram plaqueados em meio LB-ágar contendo ampicilina (100 µg L⁻¹), 4 µL de IPTG (200 mg L⁻¹) e 80 µL de X-Gal (SAMBROOK et al. 1989). Após um ciclo de crescimento de 14 h em estufa a 37°C, procedeu-se uma PCR de colônias (clones) para verificar se os cDNAs foram ligados ao vetor. Confirmada a clonagem dos cDNAs, fez-se a seleção dos clones contendo o inserto, que foram transferidos para microplacas de 96 poços, contendo meio LB e ampicilina (100 µg L⁻¹). Após um período de 14 h de crescimento, adicionou-se glicerol 16% e em seguida o estoque de clones foi conservado a -80°C.

3.1.3. Extração de DNA plasmidial e sequenciamento dos clones de cDNA

O DNA plasmidial foi obtido de clones individuais usando o procedimento de lise alcalina conforme Sambrook et al. (1989), com adaptações para microplacas de 96 poços. Para verificar a qualidade do DNA plasmidial, procedeu-se eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. O gel foi posteriormente visualizado em transluminador UV (Vilber Loumart) e fotodocumentado em sistema EDAS-290 (Kodak).

Foram selecionados 200 clones aleatoriamente para serem seqüenciados. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando-se o kit de seqüenciamento DYEnamic ET dye Terminator (MegaBACE, GE Health Care), e o primer M13-F 5'-GTAAACGACGGCCAGT-3' como *primer forward*. O seqüenciamento do DNA foi executado em um seqüenciador capilar Megabace 1000 (Amersham biosciences-GE Health Care).

Os eletroferogramas contendo as seqüências foram editados para remoção do vetor usando o programa Vecscreen, parte do software BLAST disponível na *Web*, que identifica seqüências de ácidos nucleicos que podem ser vetores ou primers, antes que as seqüências sejam analisadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Depois deste processo, apenas seqüências maiores que 90 pb foram consideradas. Cada EST editado foi traduzido em todas 6 ORFs e comparado com o banco de dados do NCBI, utilizando o programa BLASTx e tBLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Foram considerados significativos os alinhamentos que demonstraram similaridade com um valor esperado menor ou igual a 1.10^{-04} . As identificações prováveis para os ESTs foram anotadas tendo como base os resultados da pesquisa BLAST, informações de ontologia gênica (<http://www.geneontology.org/>), e de trabalhos relacionados com a área de pesquisa (JOURNET et al., 2002; ZHANG et al., 2001; COVITZ et al., 1998).

3.1.4. Teste para Peroxidases (POD) E.C 1.11.1-

Para análise da atividade de peroxidases foram realizadas coletas da 1ª ou 2ª folha completamente expandida e madura a partir do ápice caulinar no período de exposição ao metal de 0, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h para as diferentes concentrações de Cd em solução nutritiva. As folhas foram fixadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C . Posteriormente, foram macerados aproximadamente 200 mg de tecido em nitrogênio líquido para cada amostra foliar, sendo adicionado tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) na proporção 4:1 (tampão:massa fresca). As amostras foram ultra-sonicadas (Ultrasonic Processor) em gelo até o tecido romper totalmente, com pulsos de 8 s, intervalos de 10 s e amplitude de 70%. Em seguida, foram

centrifugadas por 5 min. a 13400 rpm. Logo após, recuperou-se 200 µL da fase aquosa, que foi diluída em 800 µL de tampão fosfato.

Para o ensaio enzimático, foram preparadas microplacas de 96 poços contendo 140 µL de tampão POD 2x (40 mM de guaiacol e 0,06% de peróxido de hidrogênio em fosfato de sódio 20 mM, pH 6,0), 40 µL de H₂O₂ mili-Q autoclavada, 60 µL de tampão fosfato, 60 µL do extrato enzimático. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (VERSAmax). A atividade de peroxidase foi expressa como o aumento do consumo de guaiacol em µmol h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca. A conversão dos dados obtidos em valores de absorvância a 470 nm min.⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca para consumo de guaiacol em µmol h⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca foi feita com o uso da equação $y = 0,1284x + 0,0189$ originada a partir de uma curva padrão para POD-guaiacol.

3.1.5. Análises anatômicas e histoquímicas

Ao final do experimento, 120 h após aplicação dos tratamentos (AAT), foram coletados ápices radiculares, gema caulinar e porção mediana da 2ª folha madura e expandida a partir do ápice. O material vegetal, de todos os tratamentos, foi fixado com glutaraldeído a 3% em tampão PBS (pH 7,4) por 4 h. Logo em seguida, foi transferido para álcool 70% e mantido a 4°C em geladeira.

Posteriormente, as amostras dos órgãos vegetativos dos diversos tratamentos foram desidratadas em série butanólica, incluídas em parafina, seccionadas ao micrótomo rotativo (7 µm de espessura) e submetidas ao processo de coloração com safranina e azul de astra a 1% (KRAUS; ARDUIN, 1997). Realizaram-se testes histoquímicos, em cortes feitos à mão livre com lâmina de barbear, utilizando-se lugol para identificação de amido (JOHANSEN, 1940); floroglucina a 2%, diluída em etanol 95%, para identificação de lignina; sudan III para identificação de substâncias lipídicas, suberização e cutinização de paredes celulares; e cloreto férrico para identificar compostos fenólicos (SASS, 1951). Os resultados das análises foram documentados em fotomicroscópio Olympus 50 com câmera fotográfica acoplada.

3.1.6. Análise de TUNEL (Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick and labelling)

A coleta e a conservação do material vegetal para a análise pelo método TUNEL seguiram os mesmos procedimentos descritos para as análises anatômicas e histoquímicas. Para esta análise foram selecionadas amostras de folhas submetidas às concentrações de 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ e o controle. As amostras foram desidratadas em série butanólica, incluídas em parafina, seccionadas ao micrótomo rotativo (7µm de espessura) e montadas em lâminas de vidro contendo albumina glicerizada como adesivo (KRAUS; ARDUIN, 1997). É importante ressaltar que o adesivo de Haupt e *Poly-L-lysine* a 0,01 e 0,1% também foram utilizados para aderência dos cortes à lâmina, no entanto, não foi obtido resultado satisfatório com o uso destes adesivos.

As secções foram desparafinadas em placa aquecida por 10 min. a 60°C, em seguida foram imersas em xilol por 15 min. por 2 vezes. Logo após, os cortes foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol 100%, 95% e 75% durante 5 min. por 2 vezes em cada álcool, seguida de duas lavagens com água destilada por 3 min. cada.

Para a permeabilização e detecção da fragmentação do DNA, os cortes foram lavados 5 vezes, por 10 min. cada lavagem, em tampão PBS (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2), à temperatura ambiente e incubados por 30 min. a 37°C em uma solução contendo pectinase a 4% (E.C. 3.2.1.15, Sigma) e celulase Onozuka R-10 (Merck) a 2% em PBS. Em seguida, os cortes foram mais uma vez lavados em PBS por 5 min. e incubados por 20 min. em metanol e ácido acético 1% (1:1) (CEITA, 2004). Após mais uma lavagem em PBS por 5 min., houve a incubação em solução, pré-aquecida a 80°C, composta por PBS e Triton X a 0,5% durante 20 min. em estufa, mantendo-se a mesma temperatura. Posteriormente, os cortes foram lavados 3 vezes em PBS, por 5 min. cada lavagem (DENG et al., 2001). Logo após as lavagens, as secções foram imersas em tampão TDT (Trisma base 30 mM, cacodilato de sódio 140 mM e cloreto de cobalto 1 mM, pH 7,2). O kit para detecção de fragmentação do DNA “In situ Cell Death Detection Kit, AP” (Boehringer Mannheim; TUNEL assay) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, adicionou-se as lâminas contendo as secções de folha à

TUNEL reaction mixture (solução de sondagem + solução enzimática do kit). Logo após, as lâminas foram incubadas em câmara úmida (placa de Petri com algodão umedecido em água) por 60 min. a 37°C. Após este período de incubação, os cortes foram imersos em tampão TB (NaCl 300 mM, citrato de sódio 30 mM, pH 8,5) por 15 min. a 37°C e lavados 2 vezes em PBS à temperatura ambiente.

Os cortes sondados com TUNEL foram observados em microscópio de fluorescência Leica DM RXA2, equipado com câmera digital Leica MPS 60. As imagens foram capturadas utilizando-se o filtro I3 (450-490 nm de excitação).

3.1.7. Composição química

Ao final do experimento, 120 h AAT com Cd, coletou-se as plântulas dos diferentes tratamentos (3 plantas por unidade experimental), juntamente com o controle. Em seguida, as plantas foram lavadas 3 vezes em água deionizada e separadas em raízes, caules e folhas. As partes referentes aos órgãos vegetativos foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel e colocadas em estufa de circulação forçada de ar a 75°C, até massa constante, para obtenção da biomassa seca. Após este período de secagem, o material foi moído em moinho de rotor vertical MA-340 (Marcone), pesado e analisado quimicamente.

Na massa seca (MS) das diferentes partes das plântulas foram determinados os teores de Cd, de macro (P, K, Mg e Ca) e micronutrientes minerais (Fe e Zn), utilizando-se a técnica *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MS). As análises foram realizadas pelo *Service Central d'Analyses* (Lion, França).

3.1.8. Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos, referentes às concentrações de Cd, cinco repetições e oito plântulas por unidade experimental. Para a construção dos gráficos foi utilizado o programa

Excel 7.0 (Microsoft®). Fez-se ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância para os dados referentes à atividade de peroxidases. Para os dados de composição química foram realizadas análises de regressão e ajustes de modelos matemáticos utilizando o programa estatístico SPSS® 10.0 Windows.

3.2. Experimento II

3.2.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação da UESC. Sementes de *G. americana* foram semeadas no dia 05/04/2006 em leito de areia lavada e autoclavada. Em 11/09/2006 as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos (1 plântula/vaso), com capacidade para 3,5 L, contendo solução nutritiva de 1/4 de força iônica, preparada segundo Hoagland e Arnon (1950); onde permaneceram por um período de 77 dias para aclimação, com trocas periódicas da solução a cada 30 dias. Em 27/11/2006, após 77 dias de transplantadas para o sistema de hidroponia, realizou-se novamente a troca da solução nutritiva e, foram implementados os tratamentos com concentrações crescentes de Cd (0,5, 1, 2, 4, 8 e 16 mg L⁻¹), juntamente com o controle (sem Cd), sob a forma CdCl₂. 5/2H₂O (Sigma). As soluções foram monitoradas quanto ao pH diariamente e ajustadas para 5,9 utilizando-se NaOH ou HCl. O nível diário da solução nutritiva foi mantido pela reposição diária do volume com água deionizada e mantida sob aeração constante.

3.2.2. Medições de trocas gasosas foliares

As medições pontuais de trocas gasosas foliares foram realizadas na 2ª ou 3ª folha madura a partir do ápice aos 3 dias AAT (30/11/2006) entre 8 e 12 h, utilizando um medidor portátil LI-6400 (Li-Cor Inc. Nebraska, USA). A radiação fotossinteticamente ativa (RFA) foi fixada em 800 µmol m⁻² s⁻¹ acima da irradiância de saturação de luz das plântulas controle. Com exceção de RFA, não houve controle das variáveis microclimáticas no interior da câmara do aparelho durante a

realização das medições. As taxas de fotossíntese líquida por unidade de área foliar (A), a condutância estomática ao vapor de água (g_s), a taxa transpiratória foliar (E) foram estimadas a partir dos valores da variação de CO_2 e da umidade do ar no interior da câmara, determinados pelo analisador infravermelho de gases do referido aparelho. A concentração de CO_2 intercelular (C_i) foi calculada pelo equipamento a partir dos valores de A , g_s e E . Foram estimados também a razão entre C_i e a concentração de CO_2 atmosférico (C_a) (C_i/C_a); a eficiência intrínseca (A/g_s) e a instantânea do uso da água (WUE) em irradiância igual a $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.3. Medições de fluorescência da clorofila *a*

As medições da emissão de fluorescência da clorofila em nível foliar foram efetuadas em folhas maduras opostas às utilizadas para as medições de trocas gasosas, também aos 3 dias AAT (30/11/2006), entre 8 e 12 h; usando-se o medidor portátil LI-6400 (Li-Cor Inc. Nebraska, USA) acoplado à câmara foliar modelo 6400-40 para medições simultâneas de emissão de fluorescência e de trocas gasosas foliares. Antes das medições serem realizadas, colocou-se um *clip* na região mediana da folha, permitindo-se que esta região permanecesse no escuro por um período mínimo de 20 min., para que todos os centros de reação adquirissem a condição de oxidados. Os sinais de fluorescência foram registrados no sistema de aquisição de dados do LI-6400, que calculou automaticamente as fluorescências mínima (F_o), máxima (F_m), variável (F_v) e o rendimento quântico potencial máximo (F_v/F_m).

3.2.4. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com sete tratamentos, referentes às concentrações de Cd, quatro repetições e uma plântula por unidade experimental. Fez-se análises de regressão entre os dados obtidos para cada um dos parâmetros fisiológicos avaliados e o ajuste de modelos

matemáticos usando o programa CurveExpert[®]. Os gráficos foram construídos no programa Excel 7.0 (Microsoft[®]).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da biblioteca de cDNA e identificação de prováveis genes relacionados ao estresse por Cd

A raiz de *G. americana* é um importante órgão para o acúmulo e estabilização de metal pesado como constatado por Barbosa (2005) em estudos realizados com Cr^{+3} . A compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo, principalmente a identificação de bioligantes que possam manter a concentração do elemento metálico em níveis toleráveis, para o funcionamento adequado das funções celulares, é de suma importância para a análise do potencial dessa espécie como fitorremediadora de metais pesados. Assim, o RNA utilizado na construção da biblioteca de cDNA foi proveniente de raízes coletadas nos diferentes tempos de exposição de *G. americana* ao Cd (Figura 1).

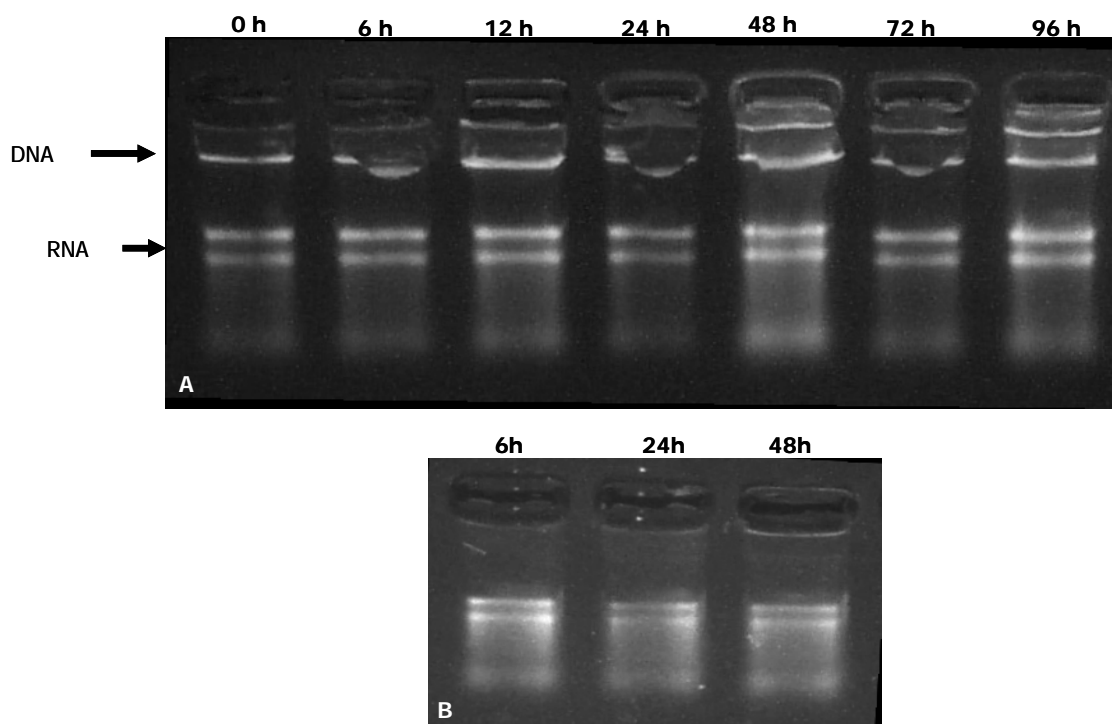


Figura 1 – Avaliação da qualidade de RNA total em raiz de plântulas de *G. americana* submetida a 16 mg Cd L^{-1} , em gel de agarose a 1%. (A) RNA total, (B) RNA após tratamento com DNase.

Durante a construção da biblioteca, os cDNAs segunda fita enriquecidos de *full length* foram visualizados em gel de agarose a 1,1%, onde observou-se um rastro que indica a variedade de tamanhos dos fragmentos de cDNAs (Figura 2). A banda forte observada corresponde aos transcritos mais abundantes na amostra. As frações obtidas também são um indicativo da variedade de tamanhos dos fragmentos de cDNAs (Figura 3). A reação de PCR de colônias, para confirmar a clonagem dos cDNAs no vetor de ligação, mostrou bandas com tamanhos variando entre 1000 e 1500 kb (Figura 4).

As seqüências originadas da biblioteca de cDNA, de raízes de plântulas de *G. americana* tratadas com Cd, apresentaram um comprimento médio de 459 pb. Dos 200 clones seqüenciados aleatoriamente, após o processamento para eliminação do vetor, dos adaptadores e das seqüências menores ou iguais a 90 pb, 165 seqüências corresponderam ao critério de qualidade adotado. O comprimento das seqüências de boa qualidade variou entre 98 e 880 pb.

Dos 165 ESTs, 81 apresentaram homologia a genes identificados e depositados no banco de dados do NCBI, 67 não teve similaridade com nenhum gene disponível ou apresentaram similaridade com *E-value* abaixo do valor padrão adotado (10^{-4}). Os 17 ESTs restantes demonstraram homologia a genes desconhecidos. No processo de anotação funcional, as prováveis proteínas codificadas foram agrupadas em 9 categorias funcionais de acordo com a classificação descrita por Covitz et al. (1998) (Tabela 1).

As categorias com predominância de genes foram a do metabolismo primário e de defesa. Foi identificado um número significativo de seqüências com homologia a genes que codificam para proteínas envolvidas na transdução de sinal, na síntese e no processamento de proteínas. A representação diversa de genes que codificam para proteínas relacionadas à síntese de parede celular, citoesqueleto, divisão celular e outros processos ativos durante o crescimento é esperada, pois reflete o estado de crescimento ativo do tecido usado para construir a biblioteca (ZHANG et al., 2001; COVITZ et al., 1998). Os genes categorizados nas funções de defesa podem ser alvos apropriados para estudo, dado o possível envolvimento destes genes nos mecanismos de tolerância de *G. americana* ao estresse ocasionado pelo Cd.

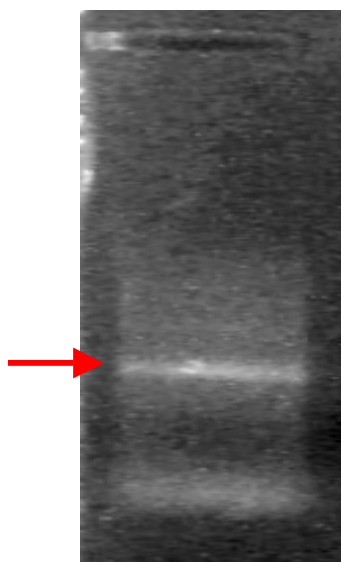


Figura 2 - Síntese da segunda fita de cDNA observada em gel de agarose a 1%. Seta indica cDNAs mais abundantes.

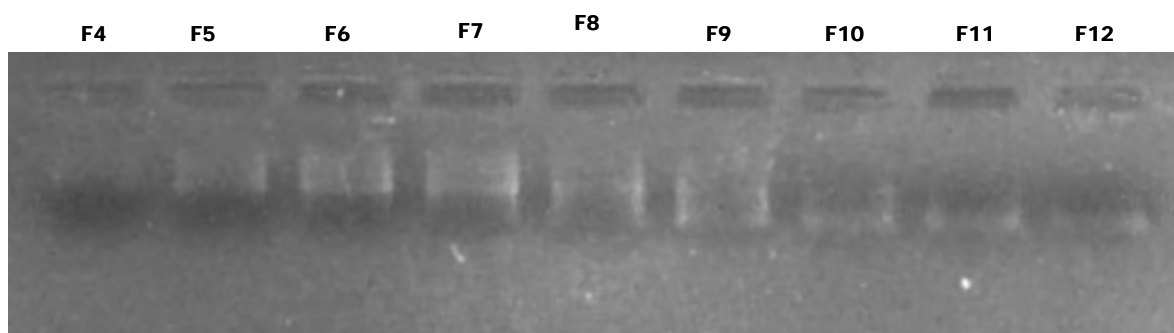


Figura 3 - Fracionamento por tamanho de cDNA selecionando fragmentos acima de 400 pb em CHROMA SPIN -400 Column (Clontech) em gel de agarose 1,1%. F4-F12 = frações.

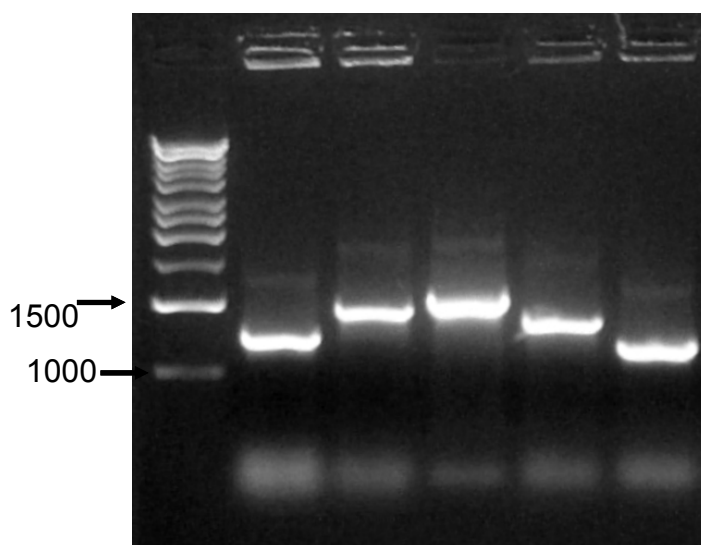


Figura 4 - PCR de colônias, amplificação com primers M13 *forward* e *reverse*, observada em gel de agarose a 1%.

Os ESTs correspondentes aos cDNAs mais abundantes estão listados na Tabela 2. Dentre estes, 14 ESTs apresentaram similaridade a genes que codificam para metalotioneínas caracterizadas na espécie *Mimulus gutatus* e 2 à metalotioneína do tipo IV da espécie *Plantago major*. A expressão destes genes que codificam para MT pressupõe uma estratégia adotada por *G. americana* para tolerar e acumular altas concentrações de Cd em seu sistema radicular. A abundância relativa de mRNA no tecido reflete aproximadamente os seus correspondentes cDNAs em bibliotecas não normalizadas. Por isso, o sequenciamento aleatório de cDNAs fornece informações sobre os níveis de expressão dos genes representados pelos ESTs (ADAMS et al., 1993).

As MTs são proteínas de baixo peso molecular, contendo 45 a 85 aminoácidos, que apresentam propriedades de ligação e seqüestro de metais pesados, exercendo proteção a determinadas espécies vegetais contra a toxicidade destes elementos metálicos. As MTs em plantas constantemente têm sido relacionadas à tolerância e a homeostase de Cu, ao passo que as FQs estão associadas à proteção das plantas dos efeitos tóxicos do Cd (ZENK, 1996; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Entretanto, em *Arabidopsis*, o silenciamento gênico demonstrou que a MT1 é requerida para proteção desta espécie aos efeitos tóxicos de Cd, podendo estar envolvida especificamente no seqüestro e controle dos níveis tóxicos deste metal na célula (ZIMERI et al., 2005). Ademais, uma MT1, isolada de uma biblioteca de cDNA induzida por Cu na espécie *Festuca rubra*, conferiu tolerância ao Cd em estudos de complementação funcional usando vetores contendo o cDNA MT1 (MA et al., 2003). Além disso, transformação de plantas de *Nicotiana tabacum* com um gene de MT, isolado de *Silene vulgaris*, aumentou a tolerância e o acúmulo de Cd nesta espécie (GORINOVA et al., 2006).

Outros genes com alta expressão em raízes de *G. americana* pertencem a família gênica de proteínas relacionadas à patogênese (PR): PR4, PR10, β -1,3-glicanase e famílias gênicas de quitinases e peroxidases. As proteínas PRs ocorrem em uma ampla variedade de espécies vegetais, cuja indução geralmente é acompanhada pelo desenvolvimento de uma resistência local ou sistêmica após infecção por um abrangente número de patógenos (BRITO, 2005). A ação do Cd em espécies vegetais se assemelha às respostas de plantas ao ataque de patógenos, em que se observa um aumento de ERO, seguido por reações de defesa secundária (SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002).

Tabela 1 – Identificações prováveis dos ESTs gerados e agrupados em 9 classes funcionais.

Classe	Anotação Funcional
Estrutura da parede celular ou metabolismo	Proteína rica em prolina Desidrogenase do álcool cinamil
Citoesqueleto	Actina
Metabolismo primário	Subunidade V b da oxidase do citocromo c Desidrogenase Gliceraldeído-3-fosfato Hidroximetiltransferase 1 da Serina Sintetase de S-adenosilmetionina Redutase de aldeído α -Arabinosidase1 Redutase do mono-deidroascorbato Precursor da subunidade II do centro de reação do fotossistema I (PS-I) S-metiltransferase
Expressão gênica e metabolismo de RNA	Fator de transcrição GRAS Subunidade isoforma V da polimerase do RNA Proteína <i>zinc finger</i>
Síntese e processamento de proteína	Subunidade 40S do RNA ribossomal Subunidade 60S do RNA ribossomal Precursor do inibidor da tripsina Carboxipeptidase da serina Fator 5A-4 de início de tradução Ligase de ubiquitina-proteína
Transdução de sinal	Proteína de ligação a GTP Fosfatase 2C Proteína de ligação a calmodulina Quinase
Defesa	Desidrogenase do secoisolariciresinol Pin2, <i>wound induced</i> Endoquitinase ácida da classe III Quitinase 2 Peroxidase da classe III (pod3) Peroxidase secretória (prx) Metalotioneína Proteína relacionada à patogênese (PR10A) Proteína relacionada à patogênese (PR4A) β -1,3-glicanase
Estímulo abiótico e desenvolvimento	Fator de resposta ao vermelho distante (<i>far1</i>) Proteína repressora de auxina Proteína induzida por auxina Proteína relacionada ao amadurecimento
Diversos	Proteína induzida inicialmente por luz Proteína relacionada a tumor Proteína secretória (33 kDa) Proteína envolvida no metabolismo do amido

Tabela 2 – Identificações prováveis das seqüências mais abundantes na biblioteca de cDNA induzida por Cd.

Anotação funcional	Nº de ESTs	E-value	pb
Metalotioneína (MT)	14	$1.10^{-17} - 4.10^{-04}$	294 – 827
Metalotioneína IV (MT IV)	2	$3.10^{-15} - 1.10^{-08}$	367 – 379
PR4	3	$8.10^{-50} - 5.00^{-40}$	316 – 857
PR10	2	$2.10^{-34} - 9.10^{-32}$	478 – 578
Proteína do metabolismo do amido	2	$2.10^{87} - 2.10^{-05}$	396 – 549
RNA ribossomal	3	$3.00^{-79} - 8.10^{-40}$	358 – 792

4.2. Análise de TUNEL

São conhecidas duas formas de morte celular, a necrose, que se caracteriza pelo aumento de volume da célula, rompimento da membrana plasmática e lise; e a apoptose, processo geneticamente programado que se caracteriza pela condensação nuclear, encolhimento do citoplasma, clivagem do DNA nuclear em oligonucleossomos e pela formação de corpos apoptóticos (DANGL et al. 2000).

Morte celular programada (MCP) em vegetais, ou apoptose, é um importante componente de programas de desenvolvimento, mediando senescência em órgãos, determinação do sexo, diferenciação de elementos traqueais, germinação e desenvolvimento de sementes, dentre outros. Além disso, os estresses abióticos, particularmente aqueles que podem ser percebidos, como, a ruptura no estado oxidativo ou *status* de energia da célula, podem também induzir MCP (BEERS; MCDOWELL, 2001).

Um dos métodos mais utilizados para a detecção de MCP é a análise do padrão de degradação de DNA genômico em gel de agarose, porém este método não possibilita a distinção entre células que estão passando por MCP ou não. A técnica TUNEL possibilita a visualização *in situ* de MCP em células individuais, preservando a arquitetura do tecido. Dessa forma, a eletroforese de DNA em gel de agarose fornece uma resposta qualitativa para confirmar se a MCP está ocorrendo, ou não, ao passo que a técnica TUNEL é capaz de determinar a fração de células que passam por apoptose (GRAVIELI et al., 1992).

A reação TUNEL permite identificar a ocorrência da fragmentação de DNA em células apoptóticas, pela marcação das extremidades 3'-OH acumuladas, com nucleotídeos modificados (dNTP marcado com fluorescência) em uma reação enzimática TdT. Contudo, esta reação enzimática é difícil de ser conduzida em seções montadas em lâminas histológicas. Conseqüentemente, tem sido continuamente proposto o aprimoramento da técnica, no sentido de evitar resultados falsos positivos (DENG et al., 2001).

A reação TUNEL, realizada em seções transversais de folhas de *G. americana* submetidas a diferentes concentrações de Cd, demonstrou a presença de núcleos TUNEL positivos que apresentaram fluorescência amarelo-verde brilhante (Figuras 5-7). Os núcleos TUNEL positivos das células da região da medula exibiram

fluorescência em um padrão disperso, sendo que, em alguns casos, dois ou três núcleos adjacentes apresentaram fluorescência (Figura 5). Observou-se, nesta mesma região, para as concentrações de 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹, uma frequência maior de núcleos TUNEL positivos, quando comparado ao controle, no tecido vascular localizado no interior da medula (Figura 5F-H, J-L); apesar de algumas células do controle, próximas às zonas de diferenciação de tecido vascular, também apresentarem fluorescência (Figura 5I).

Na face adaxial da nervura central, as células localizadas no colênquima e na epiderme que apresentaram núcleos TUNEL positivos, diferentemente da medula, estavam agrupadas e os cloroplastos também tornaram-se fluorescentes, principalmente para concentração 8 mg Cd L⁻¹ (Figura 6A-D). Na face abaxial ocorreu uma predominância de núcleos TUNEL positivos na epiderme e no colênquima com padrão morfológico distinto, além da presença de cloroplastos fluorescentes (Figura 6E-H). Verificou-se, também, que no controle raros núcleos TUNEL positivos foram encontrados próximos aos tecidos vasculares e na epiderme.

A análise do padrão morfológico das células da face abaxial evidenciou, para as concentrações de 4 e 8 mg Cd L⁻¹, núcleos com esferas de cromatina condensada e deslocados para a periferia celular (Figura 7E-G). Em alguns casos foi constatada perda da arquitetura nuclear, exibindo núcleo com formato elíptico (Figura 7B, C e G). Ainda, para a concentração 8 mg Cd L⁻¹ observou-se aparecimento de micronúcleos e de núcleos completamente fragmentados (Figura 7C). Por outro lado, apesar de alguns núcleos no controle serem positivos para a reação TUNEL, estes não demonstraram alterações morfológicas típicas de células que passam por apoptose (Figura 7A e D).

Observações semelhantes às realizadas neste trabalho foram feitas em raiz de *Allium cepa*, submetida as diferentes concentrações de Cd durante 72 h. No caso de *A. cepa*, houve alterações na morfologia celular, incluindo a presença de núcleo marginal e condensado, esferas de cromatina condensada, fragmentação do núcleo e corpos apoptóticos que se assemelhavam aos encontrados em células animais (BEHBOODI; SAMADI, 2004). Estes autores ainda confirmaram que morte celular induzida por concentrações moderadas de Cd é mais similar a apoptose do que MCP para diferenciação de células do ápice radicular.

Alterações do núcleo constituem um dos mais importantes diagnósticos de apoptose (BEHBODI; SAMADI, 2004). MCP em plantas raramente segue o mesmo processo apoptótico como em animais. De acordo com Danon (2000), em células animais a apoptose se inicia com retração celular e condensação da cromatina, seguida da fragmentação do núcleo e, posteriormente, da célula inteira, dando origem a corpos apoptóticos. Já em células vegetais, estes mesmos eventos podem ser constatados, porém sem a formação de corpos apoptóticos. Segundo Mittler (1998), células vegetais raramente formam corpos apoptóticos, liberando o conteúdo resultante da morte celular no fluido intercelular. Tal fato ocorre porque a parede celular não é eliminada. Entretanto, mesmo que a parede celular não seja eliminada, a degradação do núcleo pode ser facilitada por sua divisão em pequenos corpos apoptóticos e estes, por sua vez, podem ser digeridos por enzimas presentes no vacúolo de células vegetais.

Considerando-se que o Cd estimula a produção de H_2O_2 (CHO; SEO, 2005), as modificações nucleares encontradas nas células foliares de *G. americana* podem ser devido ao acúmulo desta biomolécula neste órgão. Células de *Nicotiana tabacum* BY2 cultivadas em suspensão, após tratamento com H_2O_2 , apresentaram sintomas característicos de células que passam por apoptose (HOUOT et al., 2001). O primeiro evento observado nas células de *Nicotiana tabacum* BY2 após tratamento com H_2O_2 foi a condensação da cromatina. Posteriormente, as células apresentaram cromatina condensada na periferia do núcleo (núcleo pré apoptótico) ou aparecimento de micronúcleos (núcleo como apoptótico), perda da arquitetura nuclear (cromatina com aparência de laço e núcleo estendido) ou células vazias com núcleos completamente lisados.

A degradação de DNA observada nos cloroplastos de *G. americana* poderá ocasionar a inviabilidade deste orgânulo celular. A degradação de DNA em cloroplastos já foi observada em células foliares de *Zinnia*, como parte do programa para diferenciação de elementos traqueais (OBARA et al., 2001). A MCP em células desta espécie, para formação de elementos traqueais, foi caracterizada pela ruptura do tonoplasto antes da degradação do núcleo. Uma vez ocorrida a ruptura do tonoplasto, os ácidos nucleicos, tanto do núcleo como dos cloroplastos, foram degradados rapidamente. É importante ressaltar que a MCP observada durante a formação de elementos traqueais em *Zinnia* foi caracterizada pela preservação do

formato do núcleo até sua degradação completa. Dessa maneira, os núcleos TUNEL-positivos observados próximos aos tecidos vasculares nas secções transversais de folhas de *G. americana* do controle podem estar passando por MCP para formação de vasos, visto que o formato do núcleo não foi alterado, apesar de apresentar emissão de fluorescência (Figura 7A e D).

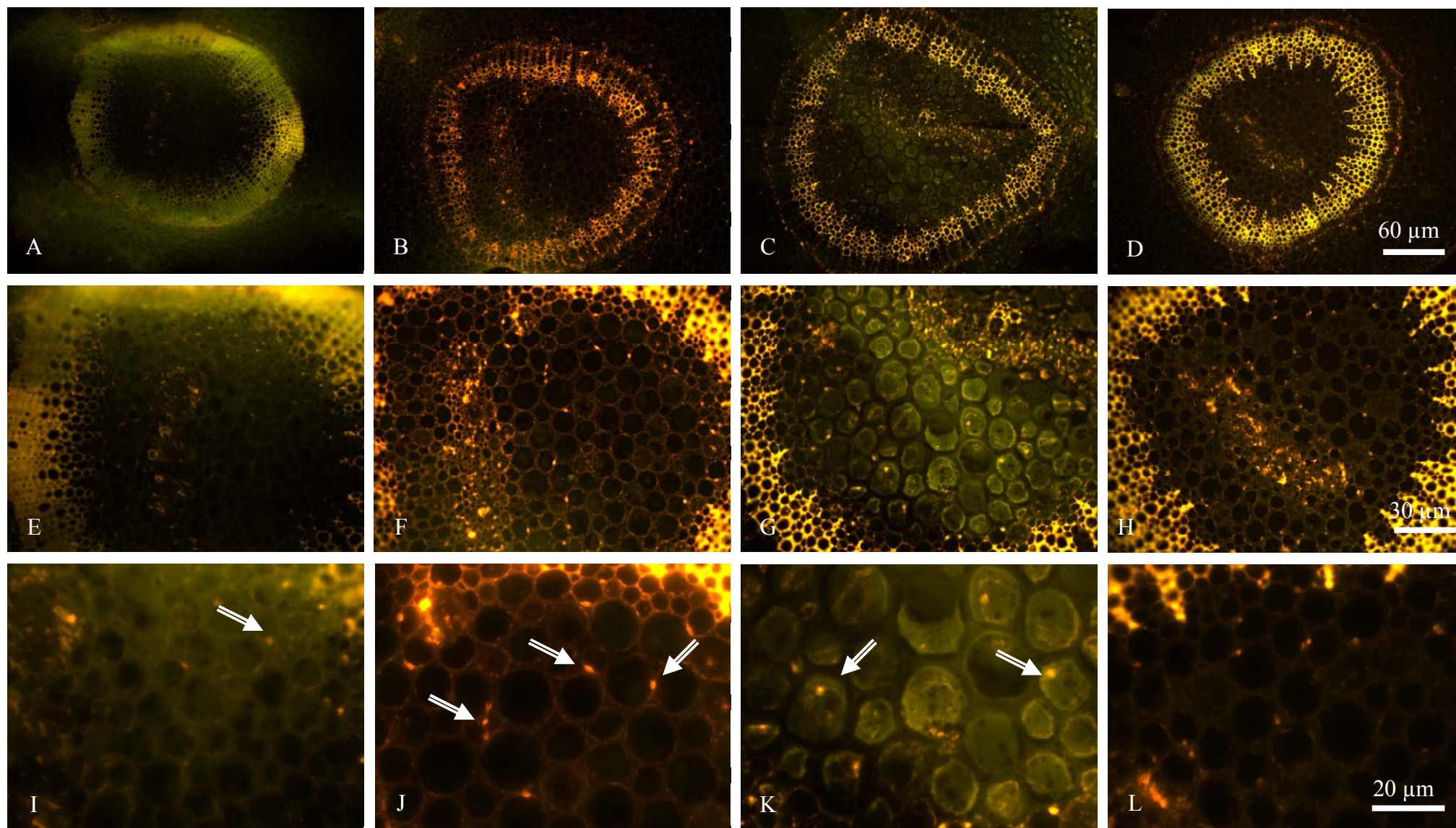


Figura 5– Secção transversal da nervura foliar, em detalhe a medula, submetida às diferentes concentrações de Cd. Reação TUNEL: controle (A,E,I), 4 (B,F,J), 8 (C, G, K) e 16 mg Cd L⁻¹ (D,H,L). Setas indicam núcleos TUNEL positivos deslocados para a periferia da célula.

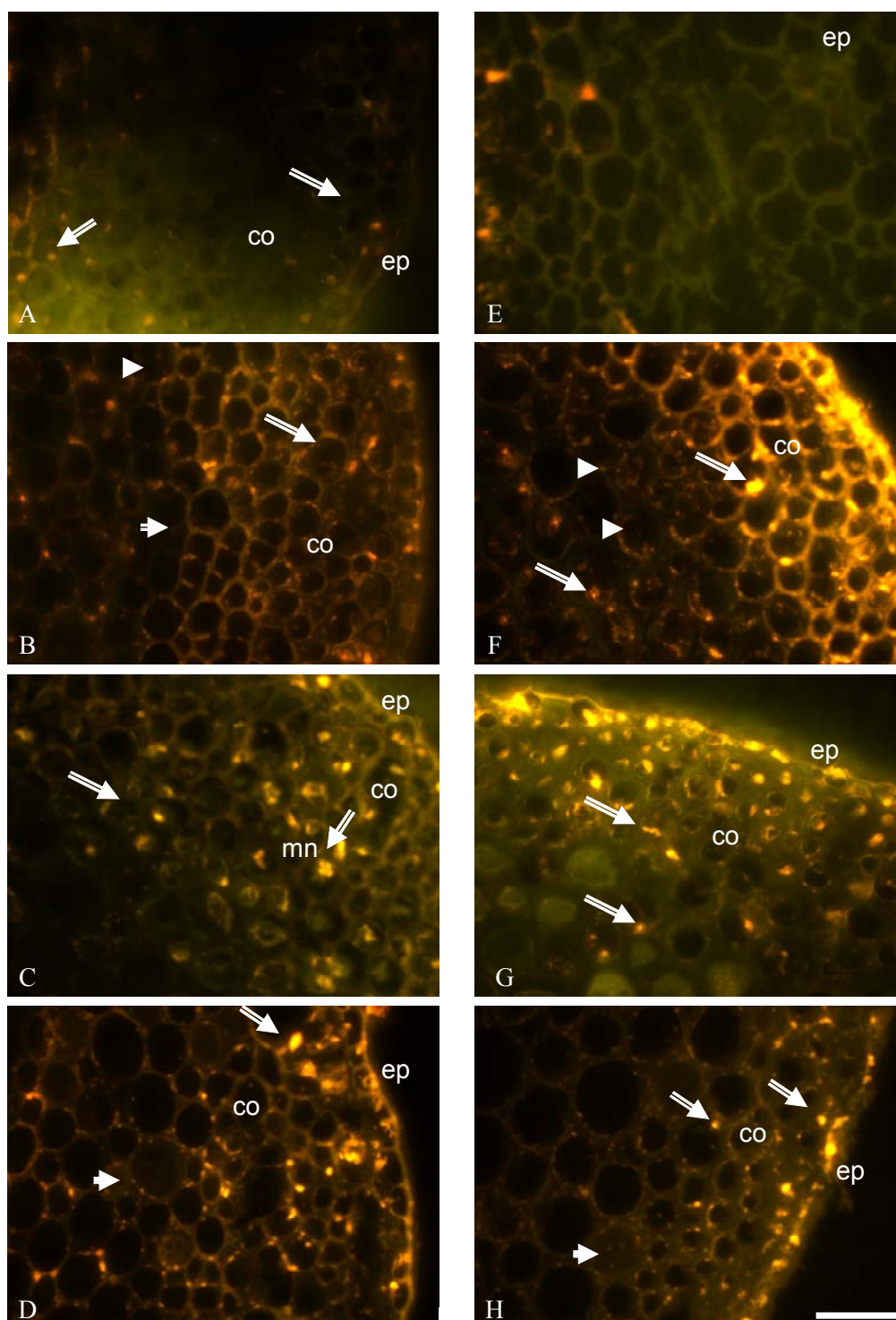


Figura 6 – Secção transversal da nervura foliar de *G. americana*, em detalhe colênquima e epiderme adaxial e abaxial, submetida a diferentes concentrações de Cd. Reação TUNEL face adaxial: controle (A), 4 (B), 8 (C) e 16 mg Cd L⁻¹ (D). Reação TUNEL face abaxial: controle (E), 4 (F), 8 (G) e 16 mg Cd L⁻¹ (H). Setas indicam núcleos TUNEL positivos deslocados para a periferia da célula e pontas de seta evidenciam os cloroplastos. Abreviaturas: (ep) epiderme, (co) colênquima, (mn) micronúcleos. Escala: 20 µm.

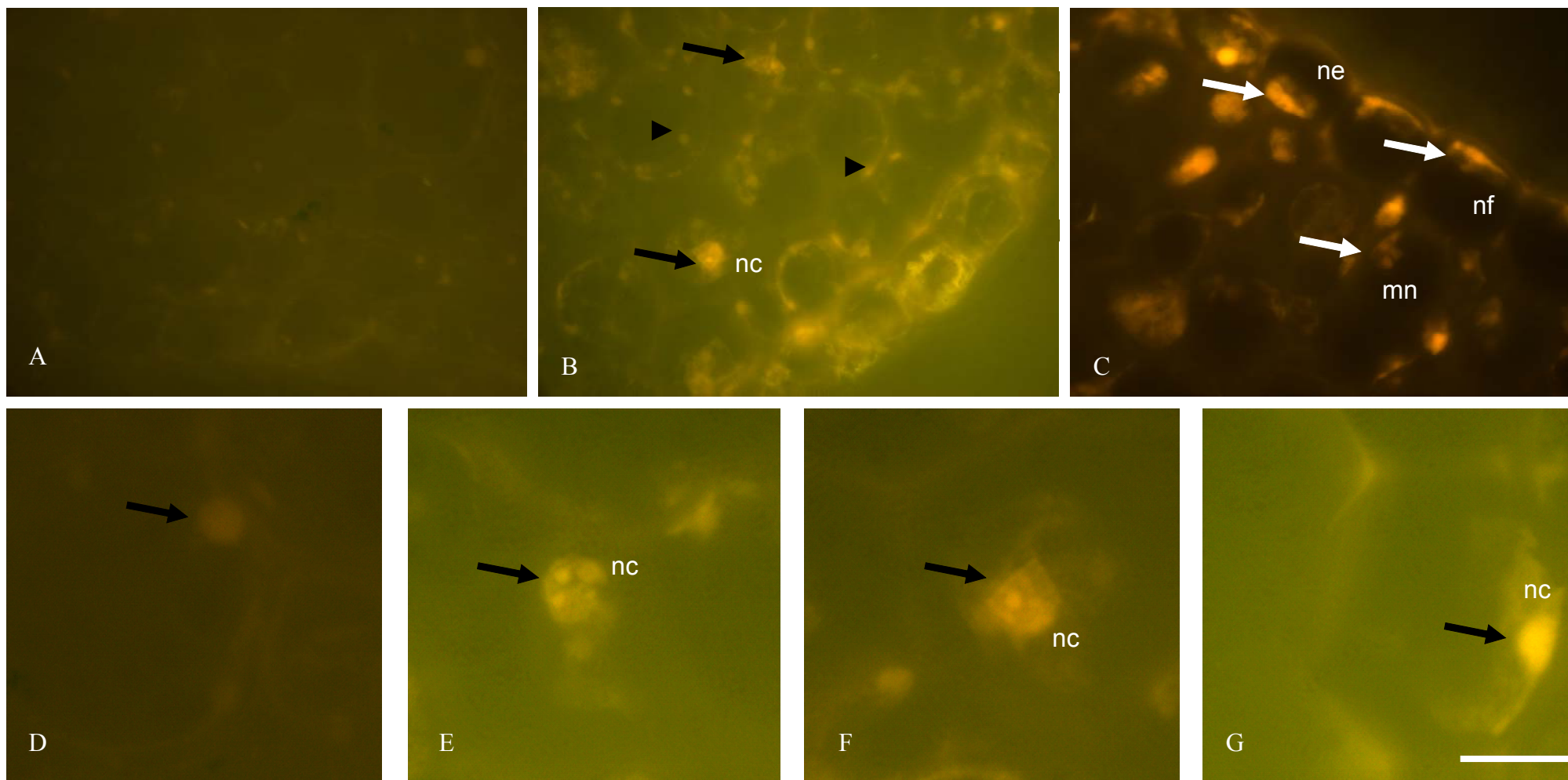


Figura 7– Secção transversal da nervura central da folha de *G. americana* submetida as diferentes concentrações de Cd. Detalhe dos núcleos do córtex e epiderme abaxial. Reação TUNEL: controle (A e D), 4 (B, E e F), 8 mg Cd L⁻¹ (C e G). Setas indicam núcleos TUNEL positivos em diferentes fases apoptóticas para as concentrações 4 e 8 mg L⁻¹. Pontas de seta evidenciam os cloroplastos. Abreviaturas: (ne) núcleo formato elíptico, (nf) núcleo fragmentado, (mn) micronúcleos, (nc) núcleo com esferas de cromatina condensada ou apenas com cromatina condensada. Escala: 10 µm.

4.3. Atividade de Peroxidases (PODs)

Houve um declínio significativo da atividade de PODs nas folhas de *G. americana*, após o período de 12 h de exposição das plântulas ao Cd, em todas as concentrações do metal. Verificou-se uma recuperação da atividade de PODs após 12 h de tratamento para as concentrações 2, 4 e 8 mg Cd L⁻¹, sendo que esta indução só foi observada depois de 72 h para a maior dose de Cd (16 mg Cd L⁻¹) em solução nutritiva. Este aumento na atividade de PODs permaneceu constante para as plântulas submetidas a 4 mg Cd L⁻¹ a partir de 24 h e começou a declinar após 24 h de tratamento com 8 mg Cd L⁻¹ e 72 h para a dose 2 mg Cd L⁻¹ (Figura 8).

As peroxidases (PODs) são hemoproteínas que catalisam a oxidação do substrato simultâneo a redução do H₂O₂ e atuam em vários processos metabólicos essenciais, incluindo regulação do crescimento celular (GOLDBERG et al., 1986), lignificação, oxidação fenólica, defesa contra patógenos e proteção contra estresses (GRISEBACH, 1981). Nas espécies vegetais a peroxidase do guaiacol apresenta isoformas ácidas e básicas. As isoformas ácidas estão envolvidas numa variedade de processos relacionados com a síntese da parede celular, incluindo a formação de lignina. As isoformas básicas participam da regulação da degradação de AIA (ácido indol-3-acético) e da síntese de etileno (FIELDES; GERHARDT, 1998).

Observou-se que a diminuição da atividade de PODs em *G. americana* para as concentrações 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ corresponde a um período anterior a coleta de material vegetal para análise de MCP (120 h). Assim, o declínio na atividade desta enzima pode ter contribuído para o acúmulo de H₂O₂ nas células vegetais, pois mesmo com o aumento observado na atividade desta enzima este não alcançou os níveis do controle. Tendo em vista que Cd promove estresse oxidativo, que pode levar ao acúmulo de H₂O₂, devido ao declínio nas atividades de enzimas antioxidativas como as PODs (CHO; SEO, 2005), e que H₂O₂ quando em excesso na célula dispara morte celular com características apoptóticas (HOUOT et al., 2001); a MCP verificada em *G. americana* pode estar associada ao acúmulo deste metabolito na célula induzido pelo tratamento com Cd. Baixos níveis de H₂O₂ podem ser suficientes para a indução de genes relacionados à defesa, mas altos níveis podem ser necessários para indução de morte celular (LEVINE et al., 1994).

A possibilidade de que a queda na atividade de PODs possa contribuir com o aumento das concentrações de H₂O₂ nos tecidos de *G. americana*, após exposição

ao Cd, deve ser analisada mais profundamente, pois geralmente as peroxidases que utilizam como substrato o guaiacol estão associadas à lignificação da parede celular, quando há aumento de sua atividade no tecido. Chaoui e El Ferjani (2005) constataram em plântulas de *Pisum sativum* expostas ao Cd, que não houve modificação significativa na atividade de POD na fração solúvel de folhas, porém a atividade POD foi marcadamente aumentada nas frações obtidas da parede celular. Estes autores sugeriram que os ensaios com peroxidases inespecíficas, confinados ao extrato de proteínas solúveis, talvez não sejam um indicador de estresse eficiente, à exceção das frações da parede celular, cuja atividade poderá ser um marcador adequado de estresse. Ainda salientaram que estas peroxidases parecem apenas contribuir para o estímulo da via de lignificação.

Em *Arabidopsis thaliana*, a atividade de POD diminuiu com o aumento da concentração de Cd em plântulas do tipo selvagem, porém não houve mudança em sua atividade com variações do teor de H_2O_2 , indicando que a atividade desta enzima não está relacionada ao acúmulo de H_2O_2 nos tecidos desta espécie (CHO; SEO, 2005). Já em plântulas de *Pinus sylvestris*, submetidas ao Cd, inicialmente não se observou nenhum efeito sobre a atividade POD em ápices radiculares; no entanto, houve uma indução significativa após 48 h, com atividade mais pronunciada em raízes expostas à maior concentração de Cd (50 μM) (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001).

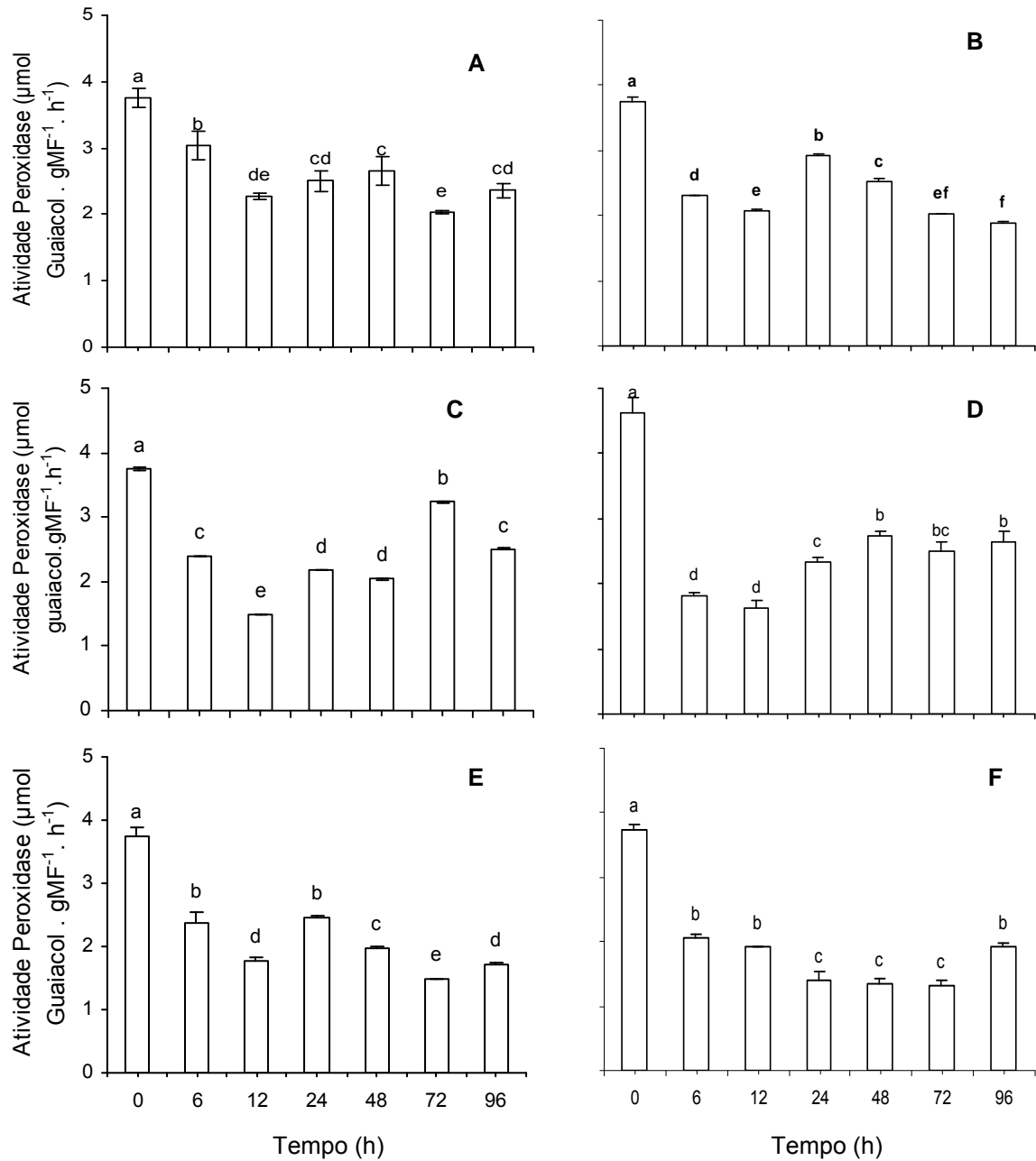


Figura 8 – Atividade de peroxidases (PODs) em folhas de plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante os períodos de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h. (A) 0,5, (B) 1, (C) 2, (D) 4, (E) 8, (F) 16 mg Cd L⁻¹. P ≤ 0,05 pelo teste de Tukey, n= 4, ± EP.

4.4. Análises anatômicas e histoquímicas

Observou-se condensação acentuada da cromatina nuclear das células da epiderme, exoderme e endoderme, com o aumento da concentração de Cd em solução nutritiva (Figura 9). Além disso, algumas células apresentaram núcleos com formato elíptico para as concentrações 8 e 16 mg Cd L⁻¹ (Figura 9). Verificou-se, nas células da epiderme e exoderme da raiz, que a parede celular tornou-se mais lignificada quando comparada ao controle (Figura 9). Ademais, para as concentrações 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹, a medula apresentou-se totalmente esclerenquimatosa (Figura 9). Além disso, constatou-se também, em nível foliar, uma acentuada lignificação dos tecidos vasculares da nervura central (Figura 10 A-F) e o aparecimento de fibras nos raios parenquimáticos e no floema, com maior intensidade nas concentrações 4 (Figura 10 D e J) e 16 mg Cd L⁻¹ (Figura 10 F e L).

A acentuada lignificação da parede celular observada nos tecidos presentes na raiz e na folha de *G. americana* (Figura 8) pode estar associada ao aumento da atividade POD nesta espécie. As alterações verificadas no núcleo das células da raiz foram também confirmadas na folha por meio da reação TUNEL, principalmente na epiderme e colênquima da face abaxial da nervura central (Figura 7). O Cd dispara a morte celular programada em vegetais, sendo que a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear precedem o aumento na síntese de lignina (CHO; SEO, 2005; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; BERBOODI; SAMADI, 2004). Conseqüentemente, a lignificação diminui a plasticidade da parede celular, diminuindo o crescimento das células e bloqueando o desenvolvimento do órgão (CHAOUI; EL FERJANI, 2005).

Observou-se compactação do mesofilo foliar, com diminuição dos espaços intercelulares, para a concentração de 0,5 mg Cd L⁻¹ (Figura 11B). Para os demais tratamentos, quando comparados ao controle, notou-se que houve ampliação dos espaços intercelulares do mesofilo com o incremento da concentração de Cd (Figura 11C-F). A ampliação dos espaços intercelulares no mesofilo foliar de *G. americana*, após exposição ao Cd, pode ser devido à morte celular para aumento da aeração neste tecido, porque também houve diminuição do volume e deformação da parede das células, quando comparado ao controle. Vollenweider et al. (2006) constataram, no mesofilo foliar da espécie arbórea *Salix viminalis*, após tratamento com Cd, que houve declínio na vitalidade das células que constituem os parênquimas paliçádico e

lacunoso, pois estas células apresentaram intensa vacuolização e núcleos condensados. Porém, em *Brassica juncea* nenhuma alteração foi observada neste tecido sob estresse por Cd (SRIDHAR et al., 2005).

Constatou-se, na nervura foliar central, após exposição ao Cd, a presença de amido no xilema, no parênquima cortical e na medula para as concentrações 1, 2, 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ (Figura 12). A presença de amido foi restrita apenas à endoderme amilífera na concentração de 1 mg Cd L⁻¹ e nas plântulas controle (Figura 12 A e B). Ademais, a maior quantidade de amido foi observada nas concentrações de 2 e 4 mg Cd L⁻¹, decrescendo para as maiores concentrações. O aumento na ocorrência de amido nas folhas de *G. americana* pode ser atribuído às modificações na estrutura dos cloroplastos, pois a reação TUNEL detectou a fragmentação dos ácidos nucléicos cloroplastídicos neste órgão. O Cd pode danificar os cloroplastos causando a sua inativação, com diminuição no teor de clorofila e aumento no armazenamento de amido e de lipídeos (VOLLENWEIDER et al., 2006).

Apesar de o Cd ocasionar o aumento no acúmulo de fenóis em células de diferentes tecidos (VOLLENWEIDER, 2006; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001), testes histoquímicos com cloreto férrico e sudan III não reagiram com os conteúdos celulares das folhas e raízes para os diversos tratamentos avaliados. Além disso, os tecidos de amostras de gemas caulinares não apresentaram modificações que pudessem ser relacionadas ao estresse induzido por Cd.

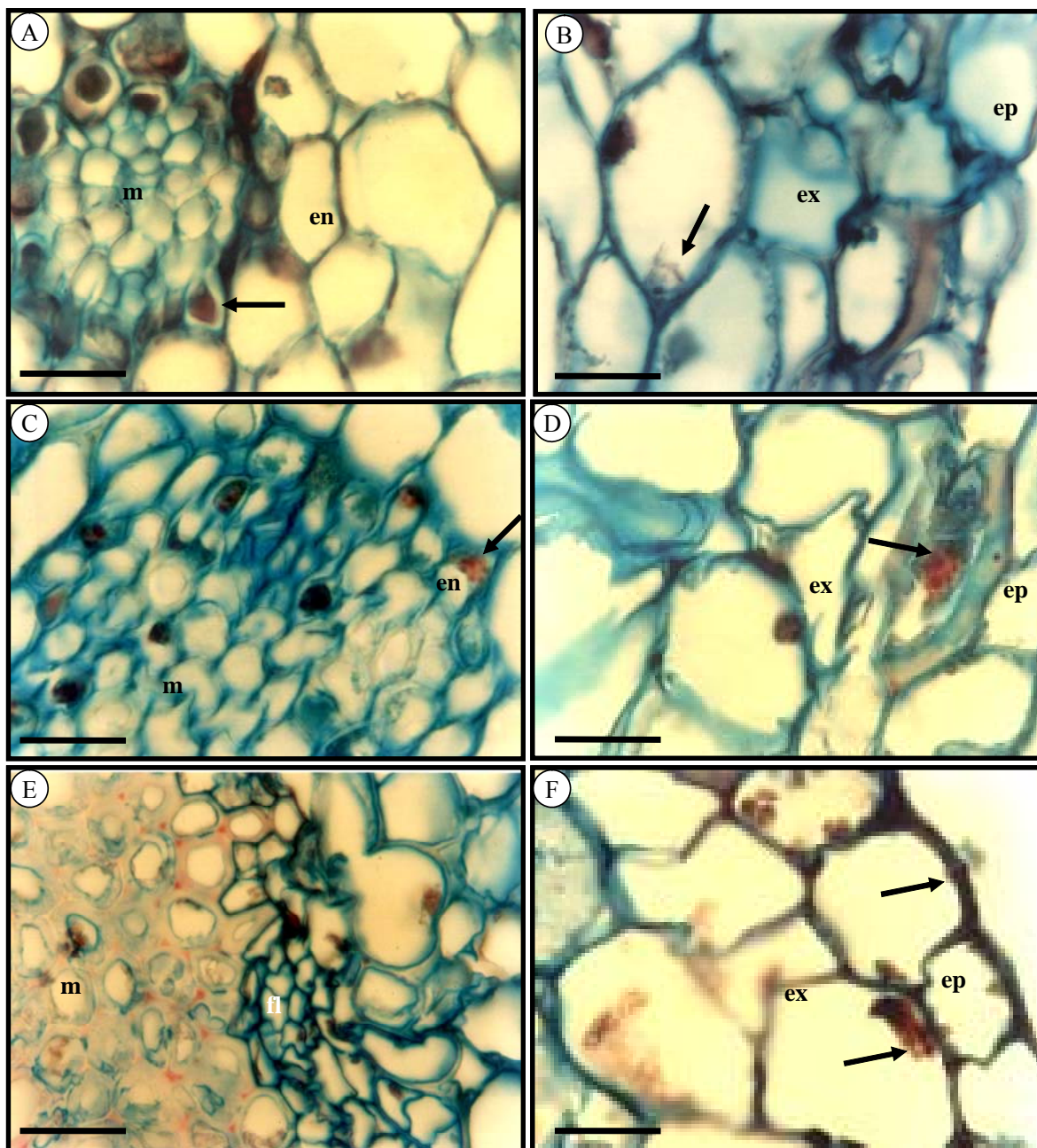


Figura 9 – Secção transversal da raiz de *G. americana* tratada com Cd. Detalhe do cilindro vascular e endoderme (A, C, E), epiderme e exoderme (B, D, F). (A e B) Controle com núcleos normais, (setas). Núcleos com cromatina condensada são indicados pelas setas para o tratamento 1 mg L^{-1} (C e D). Nas raízes tratadas com 16 mg L^{-1} Cd observa-se medula com células esclerificadas (E), células da epiderme com parede lignificada e deformação do núcleo das células da exoderme (F). Abreviaturas: (en) endoderme, (m) medula, (ep) epiderme, (ex) exoderme, (fl) floema, (x) xilema. Escala: $10 \text{ }\mu\text{m}$.

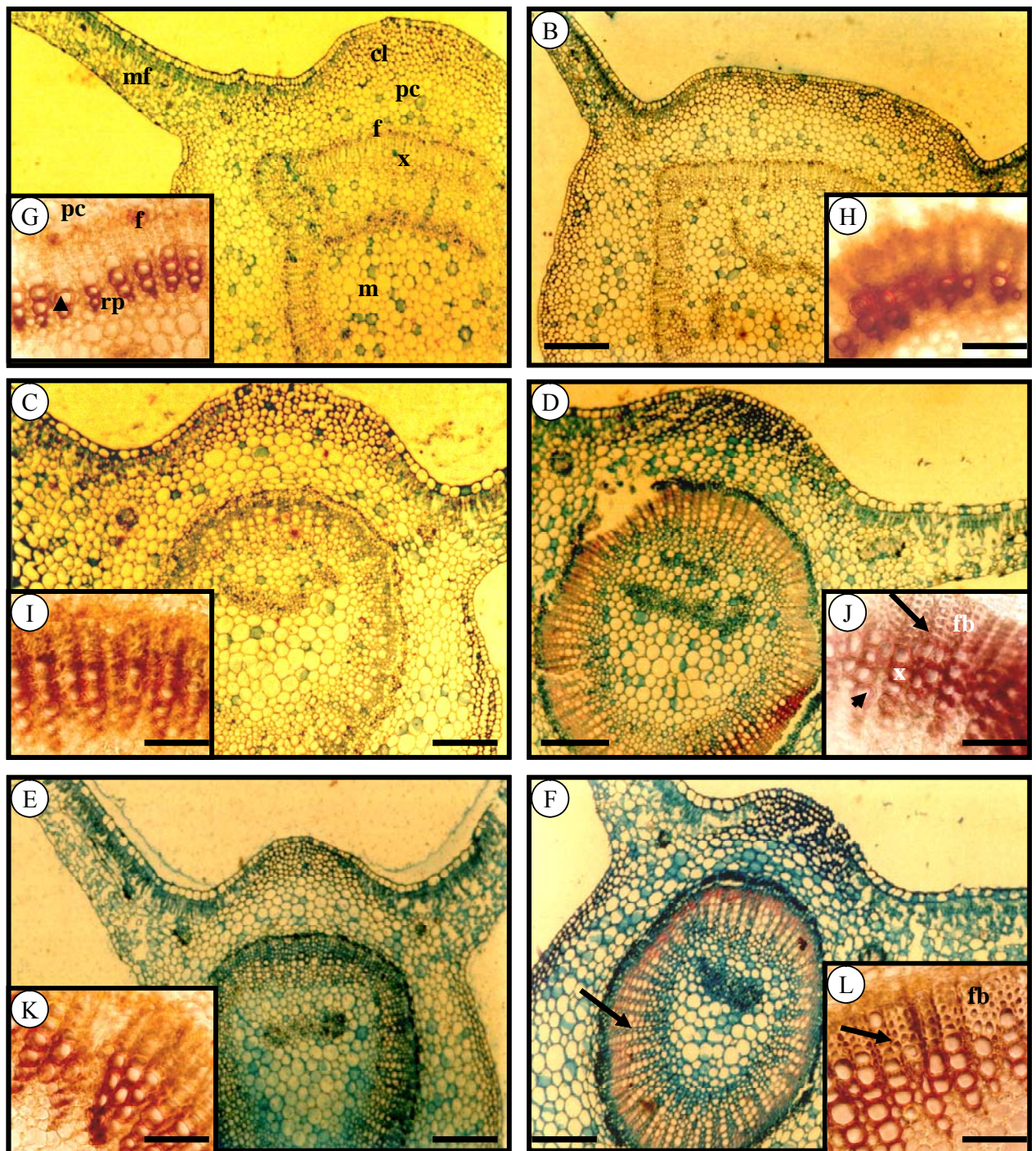


Figura 10 - Secção transversal da nervura central foliar submetida as diferentes concentrações de Cd. (A) Controle, (B) 0,5 e (C) 2 mg Cd L⁻¹ já observa-se intensificação da lignificação (detalhe I), (D-F) 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ respectivamente, verifica-se a formação de fibras (detalhe J-L) nos raios parênquimáticos. Setas indicam fibras e ponta de setas elementos de vaso do xilema. Abreviaturas: (cl) colênquima, (pc) parênquima cortical, (f) floema, (x) xilema, (m) medula, (mf) mesofilo, (fb) fibras, (rp) raios parênquimáticos. (A-F) azul de astra e safranina a 1%, (G-L) floroglucina acidificada. Escala: (A-F) 170 μm, (G-L) 30 μm.

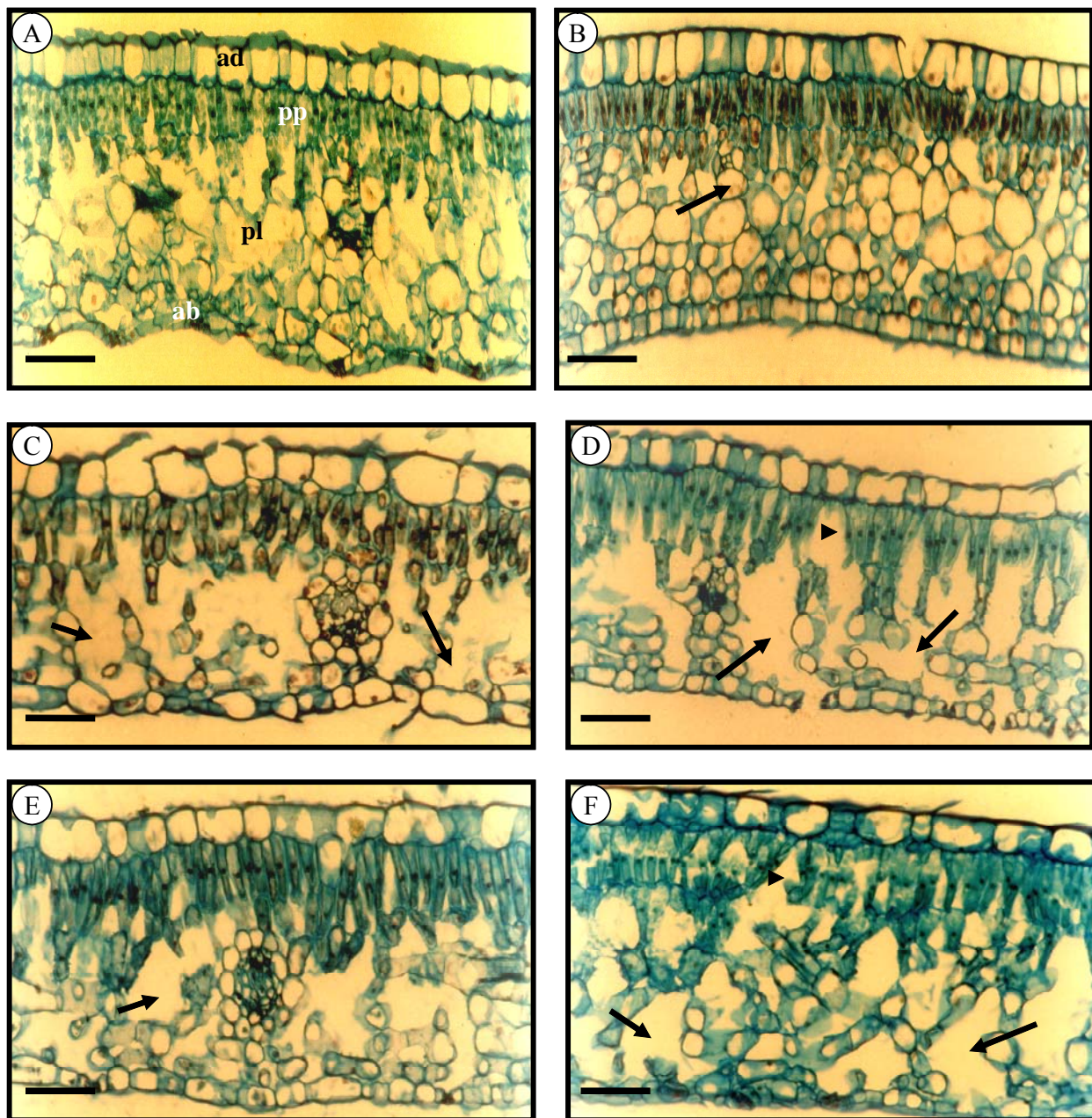


Figura 11- Secção transversal do mesofilo foliar submetido a diferentes concentrações de Cd em solução nutritiva. Controle (A), 0,5 (B) 2 (C), 4 (D), 8 (E) e 16 (F) mg Cd L⁻¹. Setas indicam parênquima lacunoso e ponta de seta parênquima paliádico. Abreviaturas: (pp) parênquima paliádico, (pl) parênquima lacunoso, (ad) epiderme adaxial, (ab) epiderme abaxial. Escala: 30 µm.

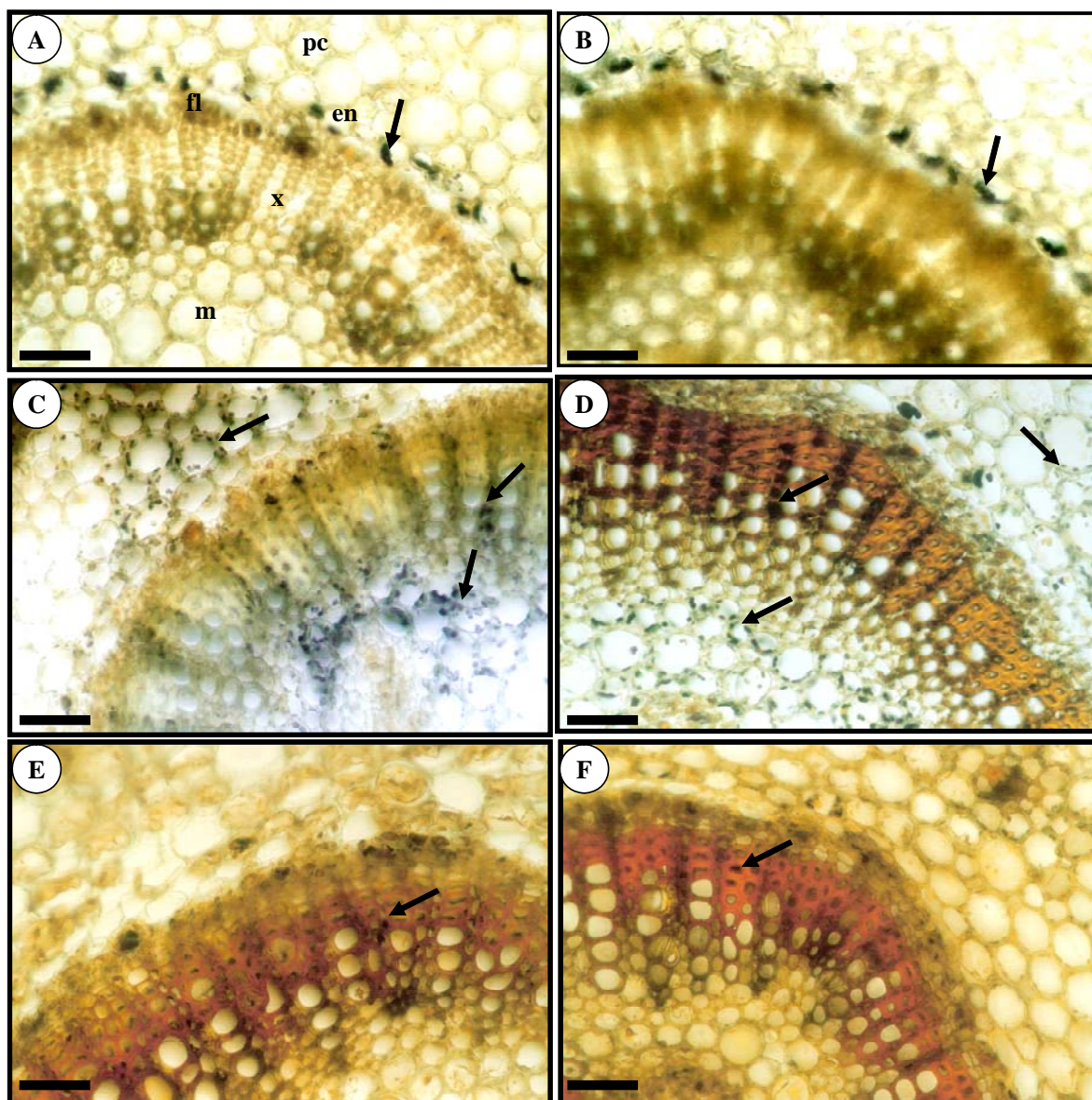


Figura 12 – Secção transversal da nervura central da folha tratada com Cd. Teste histoquímico com lugol. Grãos com cor negra no interior das células representam o amido e são indicados pelas setas. (A) Controle, (B-F) tratamentos 1, 2, 4, 8 e 16 mg L⁻¹ respectivamente. Abreviaturas: (pc) parênquima cortical, (en) endoderme, (fl) floema, (x) xilema, (m) medula. Escala: 30 μm.

4.5. Trocas gasosas foliares e emissão de fluorescência da clorofila a

As trocas gasosas foliares em *G. americana* foram afetadas com o aumento da concentração de Cd em solução nutritiva. Houve um decréscimo em *A* proporcional ao aumento da concentração de Cd até 8 mg Cd L⁻¹, possivelmente devido ao fechamento estomático, pois ocorreu um declínio em *gs*, conseqüentemente, *E* também diminuiu. Os valores máximos de *A*, *gs* e *E* foram de 9,4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,06 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 1,22 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente para o controle, ao passo que os menores valores foram de 2,8 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,02 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 0,38 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente para 8 mg Cd L⁻¹ (Figura 13). Entretanto, houve um leve incremento nos valores de *A*, *E* e *gs* a partir de 8 mg Cd L⁻¹.

Os resultados obtidos mostraram uma relação diretamente proporcional entre *A* e *gs* de 9,4 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 0,06 $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Figura 14). Os menores valores da relação entre *A* e *gs* foram obtidos na concentração 8 mg Cd L⁻¹. Por outro lado, observou-se também um decréscimo nos valores de *Ci/Ca* em relação ao controle (Figura 15), o que reforça a hipótese de limitação estomática ocasionada pelo Cd nesta espécie. Como conseqüência da resistência difusiva ao CO₂ a perda de água foi limitada como pode ser verificado pelo aumento nos valores de *A/gs* e *WUE* (Figura 15).

De acordo com Mendelssohn et al. (2001), a atividade fotossintética decresce significativamente com o aumento da concentração de Cd, sendo considerada como um indicador sensível do estresse ocasionado por este elemento metálico. Mobin e Khan (2006) constataram, em um cultivar de *B. juncea*, que o declínio em *A* foi acompanhado pelo aumento em *gs* e *E*. Segundo estes autores, esta alteração se deveu a diminuição das atividades das enzimas anidrase carbônica e ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco). Chugh e Sawhney (1999), em estudos realizados com *Pisum sativum*, evidenciaram que o Cd exerceu um efeito deletério sobre as enzimas fotossintéticas e que *A* diminuiu progressivamente com aumento da concentração deste metal.

Em *G. americana* o impacto negativo na abertura dos estômatos pode ter sido influenciado pela diminuição da absorção de água pelas raízes, promovida pela morte das regiões apicais. Pois, como resultado das reações de defesa induzidas

por Cd, células dos ápices radiculares tornaram-se lignificadas com o aumento da concentração de Cd em solução nutritiva (Figura 9). Isso, por sua vez, pode ter promovido um decréscimo da capacidade do sistema radicular em absorver e transportar água e substâncias nela dissolvidas via xilema.

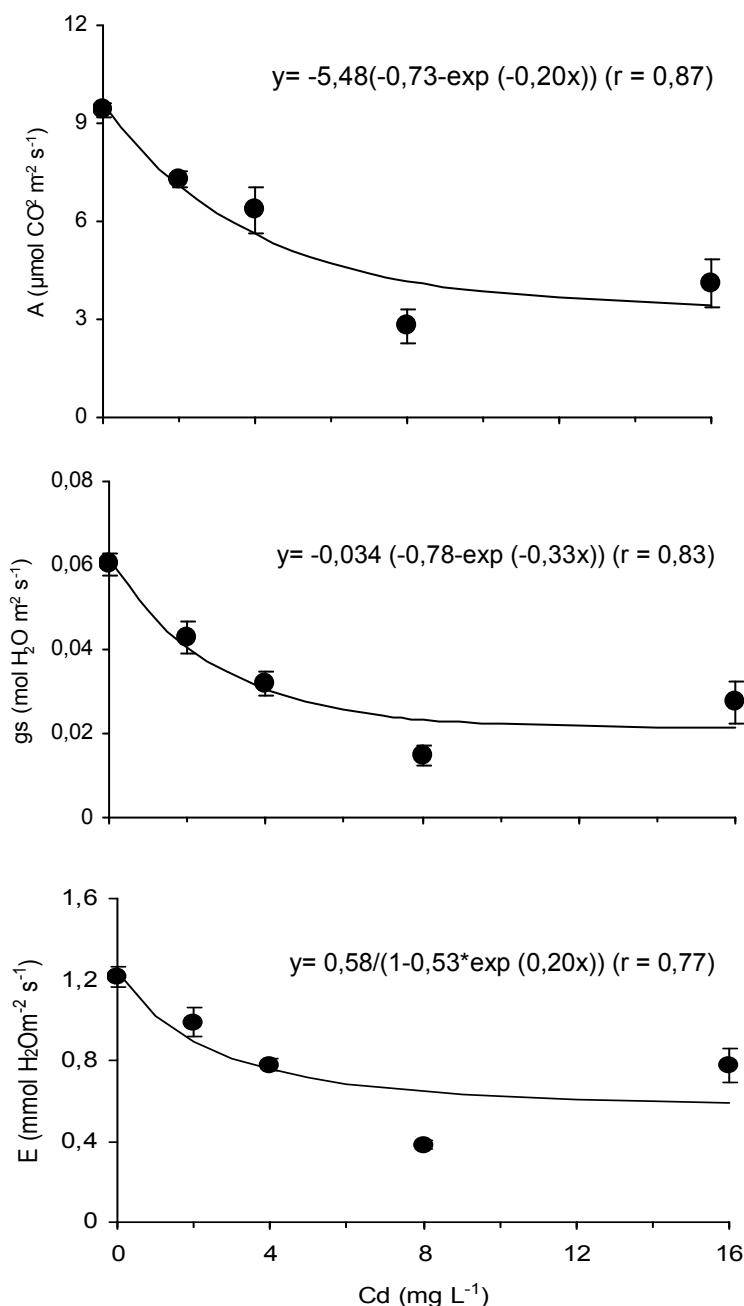


Figura 13 – Mudanças na taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar, A ; condutância estomática ao vapor de água, g_s ; e transpiração foliar, E ; em folhas de plântulas de *G. americana* submetidas às concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg Cd L⁻¹ juntamente com o controle, em solução nutritiva durante 72 h, $n = 4$, \pm EP ($P \leq 0,01$ pelo teste t). As medições foram efetuadas fixando-se a irradiância em $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

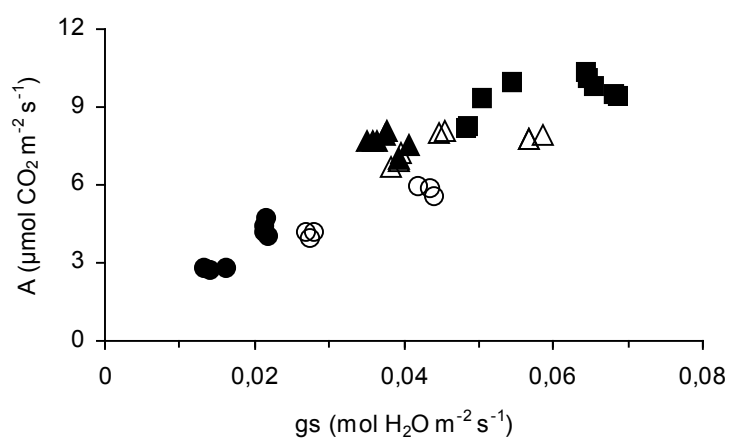


Figura 14 – Relação entre a taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar (A) e a condutância estomática ao vapor de água (gs) em plântulas de *G. americana* submetidas as concentrações de 2 (Δ), 4 (\blacktriangle), 8 (\bullet) e 16 (\circ) mg Cd L⁻¹, juntamente com o controle (\blacksquare), em solução nutritiva durante 72 h, n= 4, \pm EP. As medições foram efetuadas fixando-se a irradiância em 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

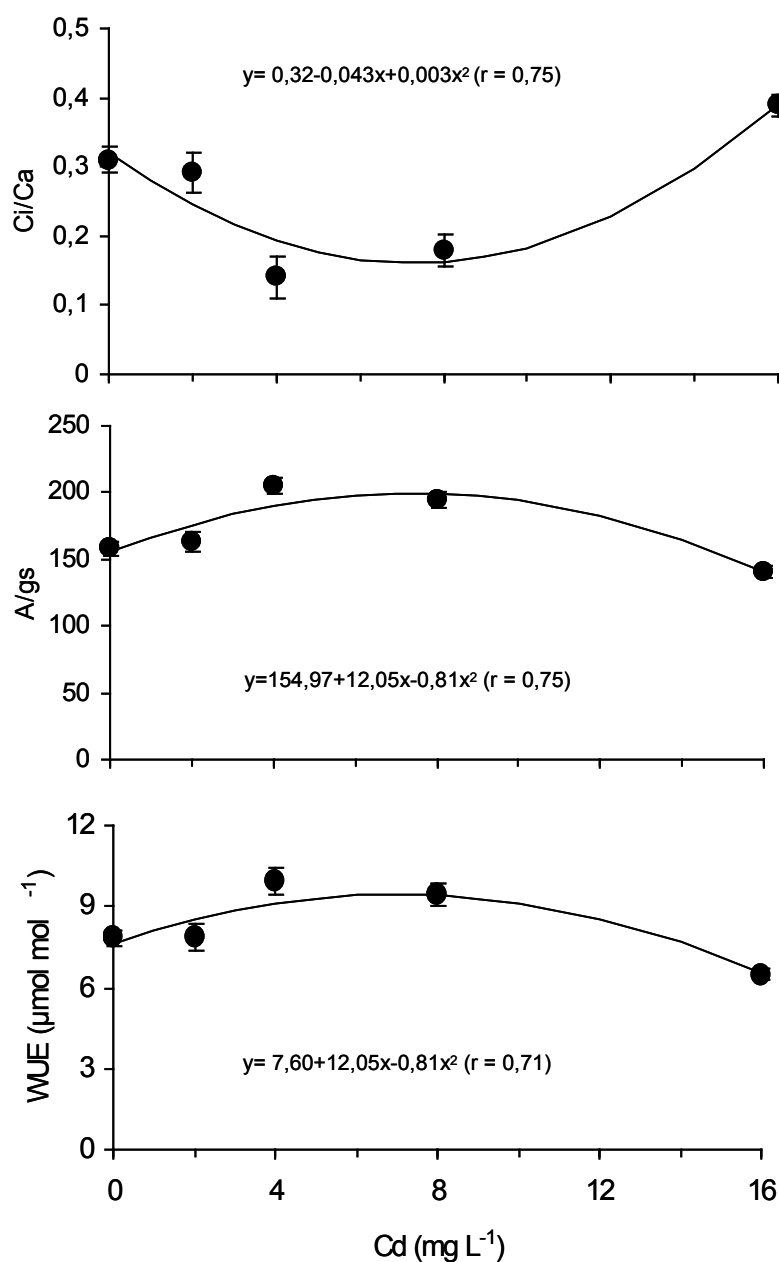


Figura 15 – Mudanças na razão entre a concentração intercelular (Ci) e a atmosférica (Ca) de CO_2 , Ci/Ca ; eficiência intrínseca do uso de água, A/gs ; e eficiência instantânea do uso de água, WUE ; em folhas de plântulas de *G. americana* submetidas às concentrações de 2, 4, 8 e 16 mg Cd L^{-1} , juntamente com o controle, em solução nutritiva durante 72 h, $n = 4$, $\pm \text{EP}$ ($P \leq 0,01$ pelo teste t). As medições foram efetuadas fixando-se a irradiância em $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

A fluorescência da clorofila *a* pode ser usada para medir a eficiência fotoquímica de PS-II. A flutuação de elétrons através de PS-II é indicativa do estado global da fotossíntese sob várias condições de estresse. Danos em PS-II, geralmente estão associados a primeira manifestação de estresse em nível foliar (MAXWELL; JOHNSON, 2000). A fluorescência da clorofila apresenta uma série de variáveis, dentre as quais a fluorescência inicial (F_o), que é alcançada quando a luz é absorvida pelo complexo antena; e a fluorescência variável (F_v) que consiste da variação existente entre a fluorescência máxima (F_m) e (F_o). A obtenção destas variáveis permite a determinação da eficiência quântica máxima de PS-II, calculada por $F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$. A razão F_v/F_m varia de 0,75-0,85 em plantas não estressadas e constitui uma média da eficiência intrínseca de PS-II (BOLHÀR-NORDENKAMPF; ÖQUIST, 1993; FRACHEBOUD, 2000).

Verificou-se, em *G. americana*, que não houve variação na emissão de fluorescência da clorofila com aumento da concentração de Cd em solução nutritiva (Figura 16), pois os valores médios da razão F_v/F_m variaram entre 0,79-0,81. Portanto, o Cd não exerceu nenhum efeito sobre a fase fotoquímica da fotossíntese nesta espécie. Resultados similares foram encontrados por Mendelssohn et al. (2001) em estudos realizados com *Thypha domingensis* e *Spartina alterniflora*. Estes autores concluíram que a razão F_v/F_m é menos sensível ao estresse imposto pelo Cd, quando comparado com os valores de *A*. Logo, não constitui um bom indicador fisiológico para avaliação do estresse imposto por Cd. Entretanto, Chugh e Sawhney (1999), em ensaios *in vitro* com o isolamento de cloroplasto de *Pisum sativum*, observaram que o PS-II foi altamente sensível ao efeito deletério do Cd e que seu funcionamento foi mais afetado do que o de PS-I. Porém, estes resultados em nível de cloroplastos isolados são menos confiáveis pelo fato de o isolamento deste orgânulo celular passar por um processo químico.

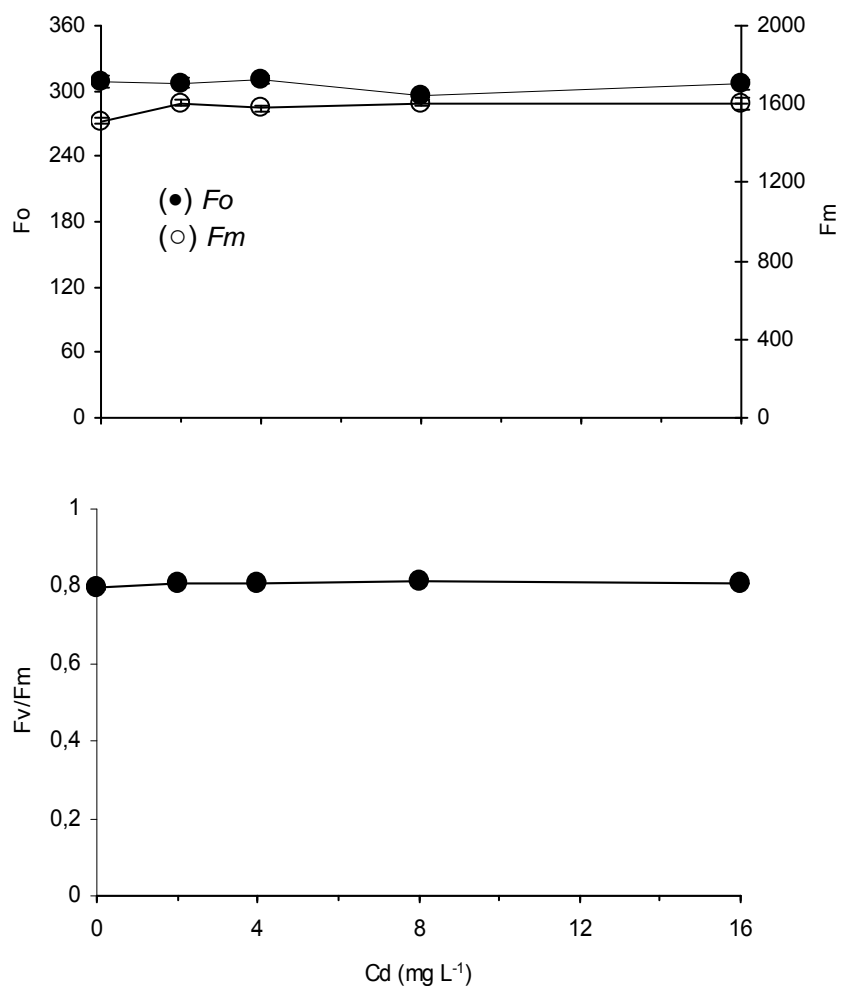


Figura 16 – Fluorescência inicial (F_o), máxima (F_m) e rendimento quântico máximo do PS-II (F_v/F_m) em plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 72 h.

4.6. Composição química

As análises químicas demonstraram que o acúmulo de Cd nos órgãos de *G. americana* foi proporcional ao aumento de Cd em solução nutritiva. Aproximadamente 99% do Cd absorvido ficaram retidos no sistema radicular. O acúmulo de Cd nas raízes, durante os 5 dias de exposição a 16 mg Cd L⁻¹, foi de 1318,3 mg Cd kg⁻¹ de massa seca (Figura 17). Houve uma translocação insipiente do metal para a parte aérea, sendo que no caule os teores mais elevados foram obtidos para a concentração 16 mg Cd L⁻¹, correspondente a 4,3 mg Cd kg⁻¹ de massa seca, cerca de 0,4% do metal absorvido. Nas folhas o Cd só foi detectado para as concentrações 8 e 16 mg Cd L⁻¹, cerca de 0,2% do conteúdo total de metal absorvido (Figura 17).

A baixa translocação de Cd para a parte aérea pode estar associada a vários fatores, tais como: (i) o tempo de exposição da espécie ao metal, tendo em vista que o acúmulo de Cd nos tecidos aumenta com o tempo de exposição (COSIO et al., 2005; ARDUINI et al., 2004); (ii) as concentrações de Cd a qual a espécie foi submetida, pois o Cd começou a ser translocado para o caule a partir da dose 1 mg Cd L⁻¹ e para a folha a partir da dose 8 mg Cd L⁻¹ (ARDUINI et al., 2004); e (iii) a estratégia da espécie para proteger a atividade fotossintética, pois, segundo Dixit et al. (2001) o baixo acúmulo de Cd nas folhas pode ser uma estratégia de proteção às funções fotossintéticas do estresse oxidativo induzido por Cd.

Segundo Grant et al. (1998), o Cd pode se ligar às cargas negativas das paredes celulares da raiz, e, posteriormente, ser transferido ou translocado para a parte aérea. Adicionalmente, admite-se que parte do Cd absorvido é complexado com fitoquelatinas (ZENK, 1996). Entretanto, em *G. americana*, a análise da biblioteca de cDNA induzida por Cd demonstrou que os ESTs similares a genes que codificam para metalotioneínas foram os mais abundantes (Tabela 2). Este ligante provavelmente representa uma função importante na complexação de Cd na raiz, evitando a sua translocação. Além disso, os tecidos das gemas caulinares desta espécie não apresentaram modificações que pudessem estar relacionadas ao estresse induzido por Cd, fato esse que pode ser devido à baixa translocação de Cd para a parte aérea.

Outro aspecto importante a ser considerado para a retenção de Cd no sistema radicular é a interferência do Cd nas trocas gasosas foliares de *G. americana*. De acordo com Salt *et al.* (1995), o aumento na resistência difusa dos estômatos ao CO₂ pode causar uma diminuição no acúmulo de Cd nas folhas, uma vez que o acúmulo neste órgão é dirigido, principalmente, pelo fluxo de massa devido à transpiração. Logo, as espécies arbóreas diferem consideravelmente em sua capacidade para translocar metais pesados da raiz para a parte aérea (PULFORD; WATSON, 2003). Assim, o acúmulo de metais nas raízes, preservando sua integridade e funções primárias, e a baixa translocação para a parte aérea são considerados mecanismos pelos quais o sistema radicular pode contribuir para a tolerância de espécies arbóreas às concentrações tóxicas de metais (ARDUINI *et al.*, 1996). É interessante ressaltar nesse caso que a retenção de Cd no sistema radicular é apropriada para *G. americana*, pois se trata de uma espécie frutífera, cujos frutos são consumidos pelos seres humanos, animais e pássaros.

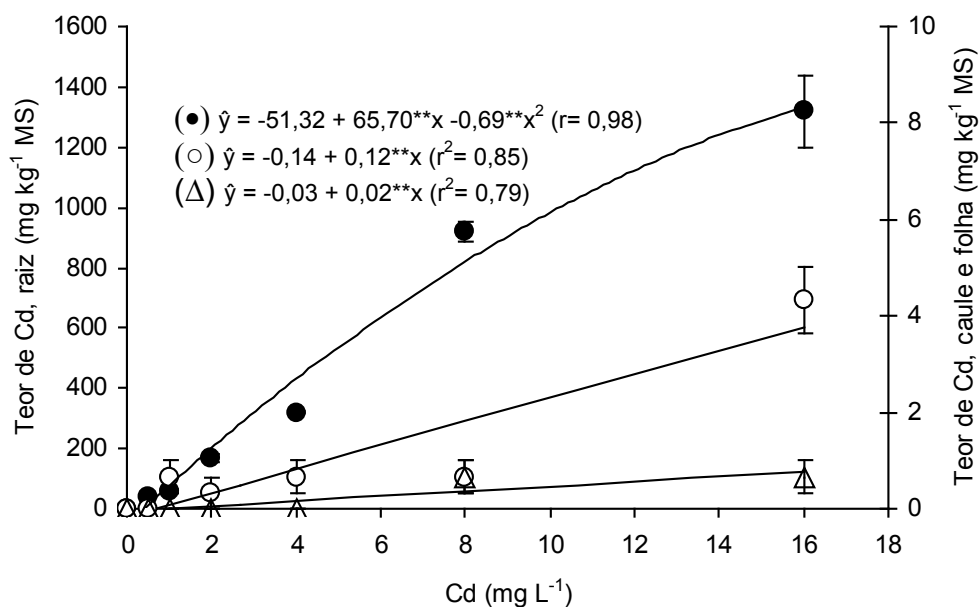


Figura 17 – Variação do teor de Cd em raízes (●), caules (○) e folhas (△) de plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 120 h, n= 3, ± EP (** $P \leq 0,01$ pelo teste t).

O aumento das doses de Cd em solução nutritiva interferiu nos teores de K, Ca, Zn, Fe e Mg. Não houve variação significativa nos teores de P nos diferentes órgãos das plântulas de *G. americana*. Verificou-se um declínio acentuado nos teores de K na folha proporcional ao aumento da concentração de Cd em solução nutritiva. Os valores máximos e mínimos dos teores de K observados nas folhas foram 19,37 e 14,73 g K kg⁻¹ MS, respectivamente (Figura 18) correspondente a uma diminuição de 8% e 30% em relação ao controle. Este declínio também foi observado no caule, porém em proporção menor. Por outro lado, os teores de Ca na raiz aumentaram com o incremento de Cd em solução, enquanto no caule observou-se um declínio deste macronutriente. Os valores máximos e mínimos dos teores de Ca observados na raiz foram 3,67 e 2,28 g Ca kg⁻¹ MS, respectivamente correspondente a um aumento de 71% e 8,6% em relação ao controle (Figura 18).

O K tem um importante papel na regulação do potencial osmótico nas células vegetais, ativa muitas enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese. Dentre os sintomas de deficiência, destaca-se clorose em manchas ou marginal que evolui para necrose nos ápices foliares, nas margens e entre nervuras, acarretando curvatura do pecíolo, necrose e morte foliar. O Ca, por outro lado, é utilizado na síntese de novas paredes celulares, em particular a lamela média, e sintomas característicos da deficiência de Ca incluem necrose de regiões meristemáticas jovens, como os ápices radiculares ou folhas jovens (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os teores de Zn e Mg apresentaram variação significativa apenas na raiz. Ocorreu um ligeiro declínio de Mg em uma relação diretamente proporcional ao aumento de Cd em solução, ao passo que, este metal induziu um aumento no conteúdo de Zn. Os valores máximos e mínimos dos teores de Zn observados na raiz foram 21,33 e 11,67 mg Zn kg⁻¹ MS, respectivamente correspondente a um aumento de 137% e 29% em relação ao controle. Nas folhas o teor de Fe também sofreu uma ligeira queda, em relação ao controle, tendo alcançado um mínimo para a concentração 8 mg Cd L⁻¹ com uma média de 98 mg Fe kg⁻¹ MS enquanto o controle apresentou 150 mg Fe kg⁻¹ MS (Figura 19).

O Mg atua na ativação de enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e síntese de DNA e de RNA, e faz parte da estrutura molecular da clorofila. O Zn também participa da síntese de clorofila e o Fe tem um importante papel como componente de enzimas envolvidas nas transferências de elétrons (reações redox)

como citocromos. Sintomas de deficiência destes nutrientes minerais podem levar também a clorose foliar (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Em *G. americana*, a baixa translocação de K e Fe para as folhas, após exposição ao Cd, pode ter contribuído para o decréscimo na fotossíntese observado nesta espécie, visto que o K participa da ativação de enzimas que atuam na fotossíntese e o Fe da composição da molécula de clorofila. Como a deficiência desses nutrientes minerais leva ao sintoma de clorose, este fato poderá explicar, em parte, a presença de folhas cloróticas verificadas em algumas plantas após 120 h de tratamento com Cd (Figura 20B). Apesar de a clorose intensa e necrose observada em algumas plântulas de *G. americana*, houve genótipos que não apresentaram sintomas visuais de toxicidade por Cd (Figura 20A), evidenciando a grande variabilidade genética nesta espécie e a importância de selecionar genótipos resistentes ao Cd. Por outro lado, os sintomas de morte celular constatados na raiz não podem ser explicados por deficiência de Ca, uma vez que a absorção deste macronutriente não foi afetada. Porém, o excesso de Ca citosólico pode provocar fechamento estomático (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A clorose característica de deficiência de Fe é um dos sintomas de toxicidade de Cd, causada pela competição entre estes dois elementos pelo mesmo sítio de absorção na membrana plasmática (PAGE *et al.*, 1972). Root *et al.* (1975) sugerem que a clorose, induzida por Cd em plantas de *Zea mays*, pode ser devida às alterações na relação Fe/Zn, e não propriamente a uma deficiência de Fe, visto que as plantas tratadas com Cd apresentaram maior concentração desse micronutriente.

Os efeitos do Cd na absorção de macro e micronutrientes são bastante diversificados em espécies arbóreas. Assim, na espécie arbórea *Tabebuia impetiginosa*, os teores de P, Ca e K na massa seca da raiz diminuíram de forma linear com a aplicação de Cd, ao passo que os teores caulinar e foliar destes macronutrientes não foram afetados. Ainda, nesta espécie, os teores radicular e foliar de Fe aumentaram e de Zn diminuíram na raiz na presença de Cd (PAIVA *et al.*, 2004). Nas espécies *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* a elevação nas doses de Cd diminuiu os teores de Ca, Fe e Mg e aumentou o de P na parte aérea nas duas espécies, enquanto que os teores de Mg permaneceram abaixo da faixa considerada adequada para *E. urophylla* (SOARES *et al.*, 2005).

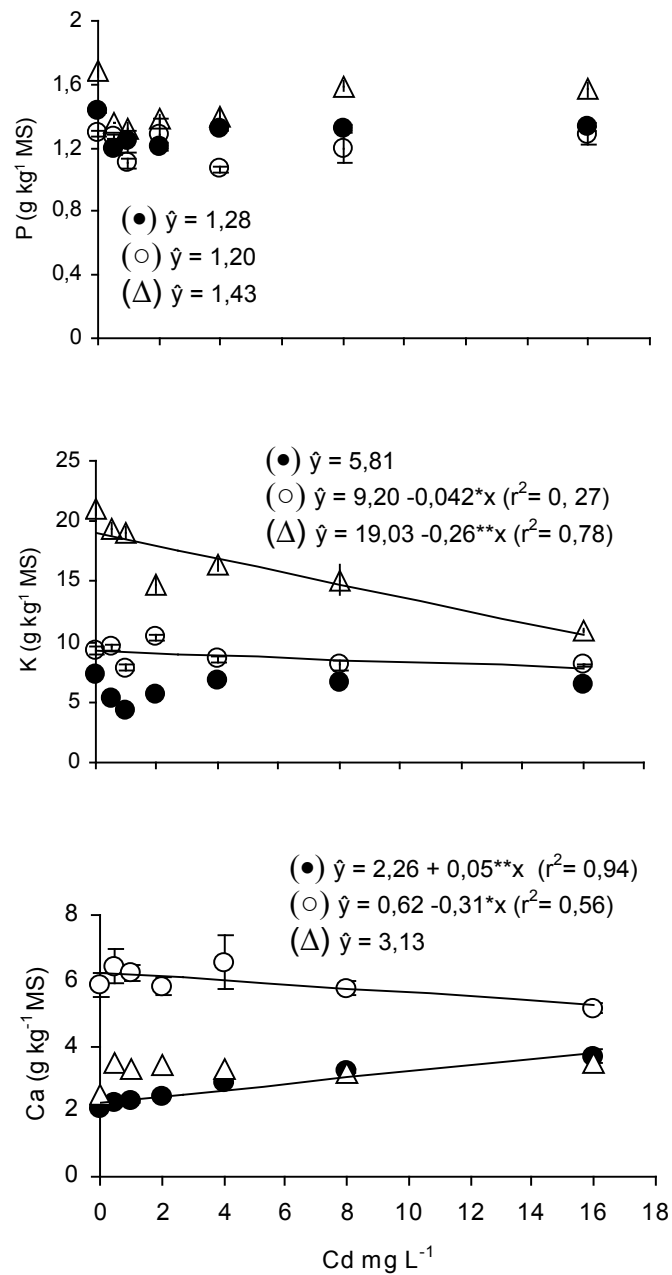


Figura 18 – Variações dos teores de P, K e Ca em raízes (●), caules (○) e folhas (Δ) de plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 120 h, n= 3, ± EP (** P ≤ 0,01; * P ≤ 0,05 pelo teste t).

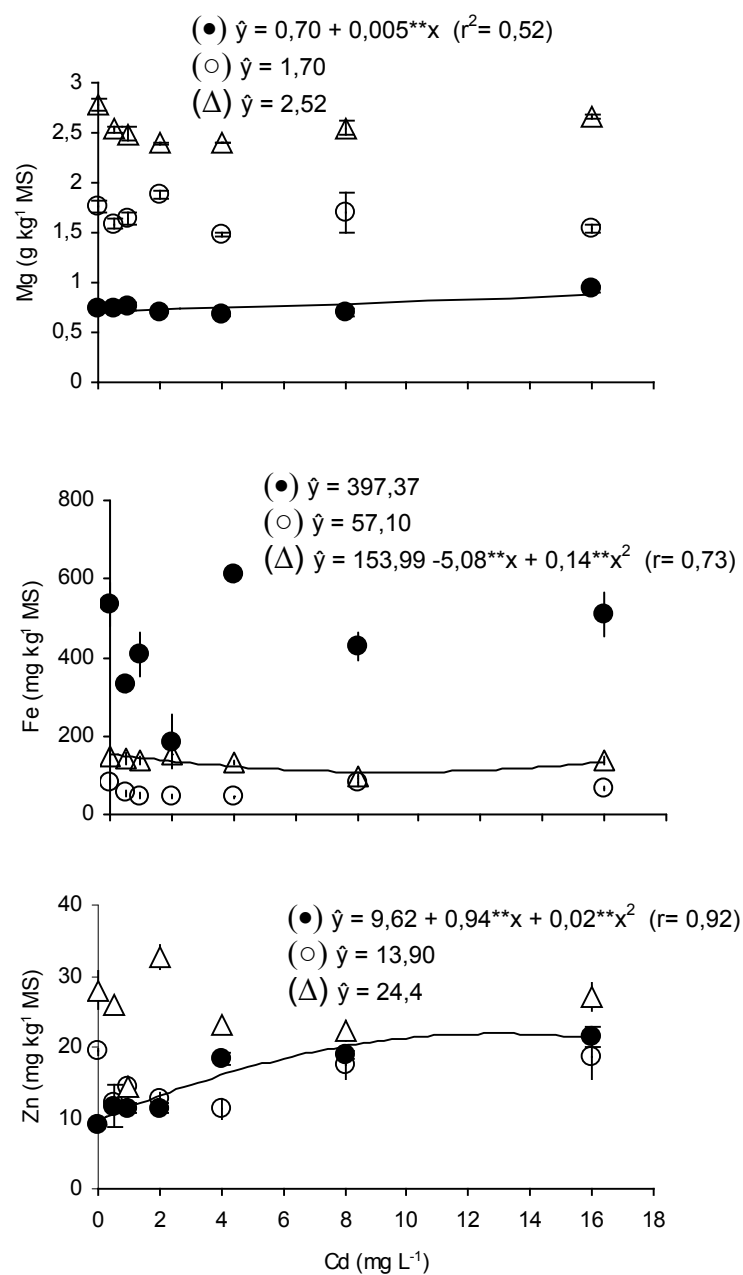


Figura 19- Variações dos teores de Fe, Mg e Zn em raízes (●), caules (○) e folhas (Δ) de plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva durante 120 h, n = 3, ± EP (** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$ pelo teste t).

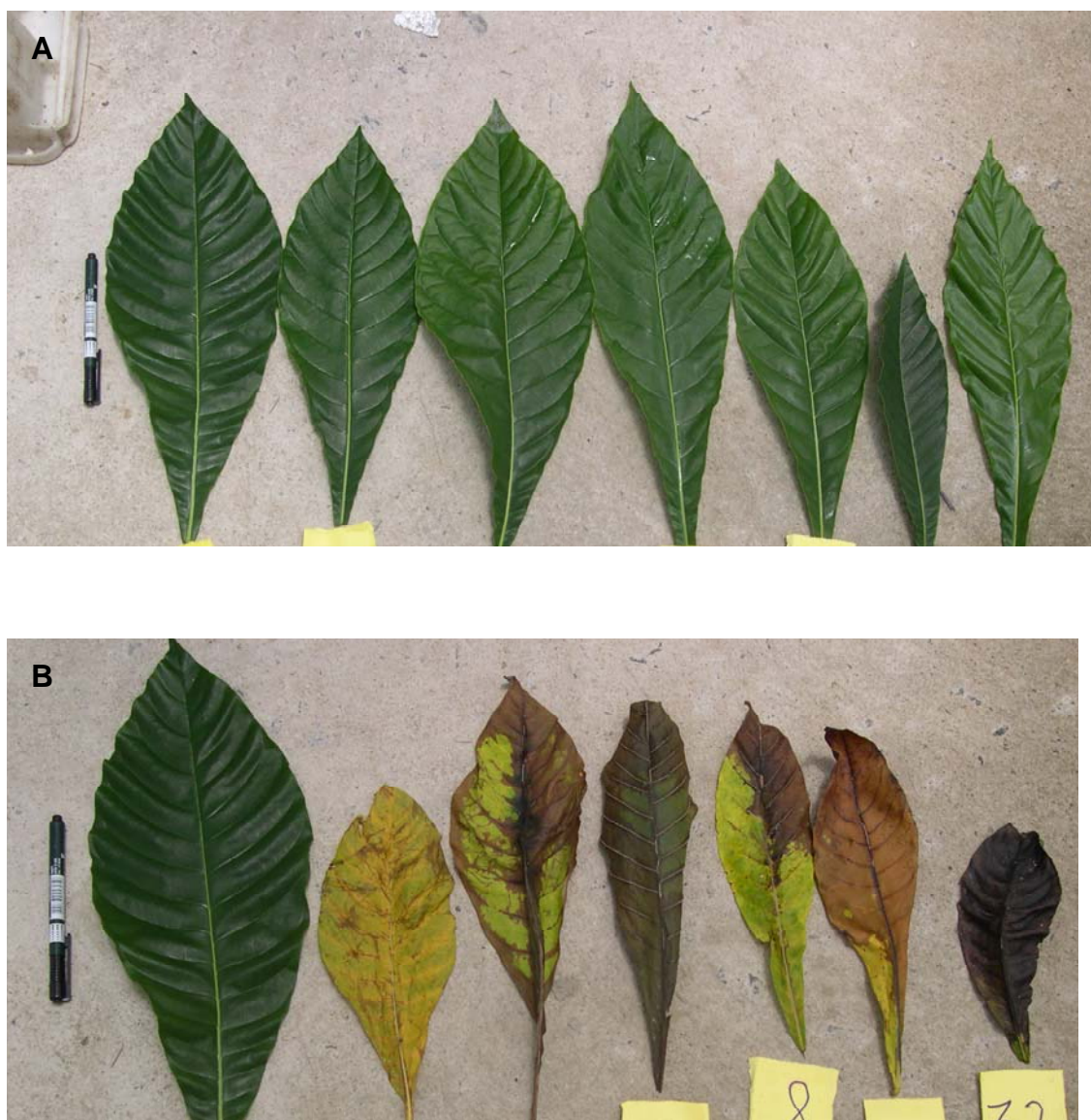


Figura 20 – Amostras de folhas de plântulas de *G. americana* após 120 h de exposição ao Cd em solução nutritiva. Na seqüência da esquerda para a direita se refere a folha do tratamento controle e das concentrações de 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 mg Cd L⁻¹, respectivamente, sem sintomas visuais de toxicidade por Cd (A) e com clorose e necrose intensa (B).

5. CONCLUSÕES

- Os dados dos ESTs, obtidos por meio da construção da biblioteca de cDNA de raiz de plântulas de *G. americana* submetidas a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva, permitiram identificar genes associados às metalotioneínas, peroxidases e a outras proteínas e enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa de plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos.

- O Cd disparou o processo de morte celular nos tecidos foliares de *G. americana* semelhante à apoptose evidenciada em animais, exibindo todas as fases de alterações do núcleo celular.

- A atividade de peroxidases pode ser usada como um indicador dos processos envolvidos no acúmulo de H_2O_2 , na morte celular programada e na lignificação de células de tecidos foliares e radiculares em plântulas de *G. americana* exposta a diferentes concentrações de Cd.

- Ao contrário da emissão de fluorescência da clorofila *a*, as trocas gasosas foliares podem ser usadas como um dos indicadores de tolerância ao estresse por Cd em *G. americana*.

- As alterações nos teores de K, Zn, Fe e Mg induzidas por Cd nos órgãos de *G. americana* contribuíram para o surgimento de clorose em nível foliar.

- A hiperacumulação de Cd nas raízes de *G. americana* demonstrou a capacidade fitorremediadora desta espécie, principalmente como planta lenhosa rizofiltradora de Cd em ambientes contaminados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.D.; KERLAVAGE, A.R.; FIELDS, C.; VENTER, J.C. 3400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. **Nature Genetic**, v. 4, p. 256-267, 1993.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, A.C.S.; RAMOS, F.N.; SOUZA, A.F.; LOUREIRO, M.B.; BASTOS, R. Flooding effects in seedlings of *Cytherexylum myrianthum* Cham. and *Genipa americana* L.: responses of two neotropical lowland tree species. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 281-285, 1999.

ARDUINI, I.; GODBOLD, D.L.; ONNIS, A. Cadmium and copper uptake and in Mediterranean tree seedlings. **Physiology Plantarum**, v.97, p.111-117, 1996.

ARDUINI, I.; MASONI, A.; MARIOTTI, M.; ERCOLI, L. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 89-100, 2004.

BAKER, A.J.M.; PROCTOR, J. The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. **Plant Systematic. Evolution**, v. 173, p. 91-108, 1990.

BARBOSA, R.M.T. **Avaliação das potencialidades do jenipapeiro como planta fitorremediadora de cromo**. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

BEERS, E. P.; MCDOWELL, J. M. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens stress and developmental cues. **Plant Biology**, v. 4, p. 561-567, 2001.

BERBOODI, B. SH.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**, v.167, p. 411-416, 2004.

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, v. 40, p.143-152, 1984.

BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C.; LONG, S.P. (eds.). **Photosynthesis and production in a changing environment, a field and laboratory manual**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 193-206.

BRITO, D.S. **Análise funcional do gene de glicanase isolado de uma biblioteca de cDNA da interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis perniciosa***. 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2005.

BROWN, T.A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA. Uma introdução**. 4ª Ed. ArtMed: Porto Alegre, 2003.

BUTT, A.; MOUSLEY, C.; MORRIS, K.; BEYNON, J.; CAN, C. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. **Plant Journal**, v. 16, p. 209-221, 1998.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Brasília, DF: Embrapa/CNPQ/SPI, 1994. 639p.

CATALDO, D.A.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. **Plant Physiology**, v. 73, p. 844-848, 1983.

CEITA, G.O. **Análise do processo de morte celular em *Theobroma cacao* L. induzido por *Crinipellis pernicios* (Stahel) Singer**. 2004. 78f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004.

CETEC - CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. Diagnóstico da situação de poluição na área de influência de Ipatinga e Timóteo: Relatório final. Belo Horizonte, 1990.

CHANEY, R.L.; MALIK, K.M.; LI, Y.M.; BROWN, S.L.; BREWER, E.P.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.J.M. Phytoremediation of soil plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 279-284, 1997.

CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, p. 23-31, 2005.

CHO, U.; SEO, N. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, v. 168, p. 113-120, 2005.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 297-303, 1999.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Review Plant Biology**, v. 53, p. 159-182, 2002.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357 de 17 de março de 2005.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies exóticas cultivadas. IBDF: Rio de Janeiro, 1969, v. 4, p. 5515-519.

COSIO, C.; DeSANTIS, L.; FREY, B.; DIALLO, S.; KELLER, C. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 412, p. 765-775, 2005.

COVITZ, P.A.; SMITH, L.S.; LONG, S.R. Expressed sequence tags from a root-hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. **Plant Physiology**, v. 117, p. 1325-1332, 1998.

CUNHMAN, J.C.; BOHNERT, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. **Current Opinion Plant Biology**, v. 3, p. 117-124, 2000.

DANGL, J. L.; DIETRICH, R. A; THOMAS, A. Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. (eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1044-1100.

DANON, A.; DELORNE, V.; GALLOIS, P. Plant programmed cell death: A common way to die. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 647-655, 2000.

de KNECHT, J.A.; VAN DILLEN, M.; KOEVOETS, P.L.M.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.C.; ERNST, W.H.O. Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 104, p. 255-261, 1994.

DENG, X.; WANG, Y.; CHOU, J.; CADET, J.L. Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method. **Molecular Brain Research**, v. 93, p. 64-69, 2001.

DICKINSON, N.M. Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. **Chemosphere**, v. 41, p. 259-263, 2000.

DICKINSON, N.M.; PULFORD, I.D. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. **Environment International**, v. 31, p. 609-613, 2005.

DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 358, p. 1101-1109, 2001.

DUSHENKOV, V.; KUMAR, P.B.A.N.; MOTTO, H.; RASKIN, I. Rizofiltração: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. **Environmental Science & Technology**, v. 29, p. 1239-1245, 1995.

FIELDES, M.A.; GERHARDT, K.E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, v. 132, p. 89-99, 1998.

FLORIJN, P.J.; de KNECHT, J.A.; VAN BEUSICHEM, M.L. Phytochelatin concentrations and binding state of Cd in roots of maize genotypes differing in shoot/root partitioning. **Journal Plant Physiology**, v. 142, p. 537-542, 1993.

FRACHEBOUD, Y. Using chlorophyll fluorescence to study photosynthesis. In: **Agronomy and Plant Breeding**. Zürich: Institute of Plant Sciences ETH, Universitätstrasse. Disponível em: <http://www.ab.ipw.agrl.ethz.ch/~yfracheb/flex.htm>. Acesso em: 1 jun. 2000.

GARDEA-TORRESDEY, J.L.; PERALTA-VIDEA, J.R.; ROSA, G.; PARSONS, J.G.. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 17-18, p. 1797-1810, 2005.

GESTEIRA, A. S.; MICHELLI, F.; FERREIRA, C.F.; CASCARDO, J.C. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Biotechniques**, v. 35, n.3, p. 494-500, 2003.

GOLDBERG, R.; IMBEERTY, A.; LIBERMAN, M.; PRAT, R. Relationship between peroxidatic activities and cell plasticity. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPER JR. T. (eds.). **Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases**. University of Geneva, Switzerland, 1986. p. 208-220.

GORINOVA, N.; NEDKOVSKA, M.; TODOROVSKA, E.; SIMOVA-STOILLOVA, L.; STOYANOVA, Z.; GEORGIEVA, K.; DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; ATANASSOV, A.; HERZIG, R. Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. **Environmental Pollution**, p. 1-10, 2006.

GRANT, C.A.; BUCKLEY, W.T.; BAILEY, L.D.; SELLES, F. Cadmium accumulation in crops. **Canadian Journal of Plant Science** v. 78, p. 1-17, 1998.

GRAVIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GRILL, E.; LÖFFLER, S.; WINNACKER, E.-L.; ZENK, M.H. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific g-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 6838–6842, 1989.

GRISEBACH, H.L. In: CONN, E.E. (ed.). **The Biochemistry of plants**. New York: Academy Press., 1981. v. 7, p. 457-458.

HALL, J.L. Cellular mechanisms for metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1-11, 2002.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. University of California, **Circular**, 347, 1950. 39p.

HOUOT, V.; ETIENNE, P.; PETITOT, A-S.; BARBIER, S.; BLEIN, J-P.; SUTY, L. Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose- dependent manner. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 361, p. 1721-1730, 2001.

IL'YASOVA, D.; SCHWARTZ, G.G. Cadmium and renal cancer. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 179-186, 2005.

INOUE, M.; ITO, R.; ITO, S.; SASADA, N.; TOHOYAMA, H., JOHO, M. Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatins. **Plant Physiology**, v. 123, p. 1029-1036, 2000.

JÄRUP, L.; ALFVÉN, T. Low level cadmium exposure, renal and bone effects - the OSCAR study. **BioMetals**, v. 17, p. 505-509, 2004.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 1940. 523p

JOURNET, E-P.; van TUINEN, D.; GOUZY, J.; CRESPEAU H.; CARREAU, V.; FARMER, M-J.; NIEBEL, A.; SCHIEX, T.; JAILLON, O.; CHATAGNEIR, O.; GODIARD, L.; MICHELI, F.; KAHN, D.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GAMAS, P. Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p. 5579-5592, 2002.

KUMAR, P.B.A.N.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H.; RASKIN, I. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science & Technology**, v. 29, p. 1232-1238, 1995.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. EDUR: Rio de Janeiro, 1997. 198p

KÜPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Planta**, v. 212, p. 75-84, 2000.

LANE, B.G.; KAJIOKA, R.; KENNEDY, T.D. The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. **Biochemistry Cell Biology**, v. 65, p. 1001-1005, 1987.

LAVID, N.; BARKAY, Z.; TEL-OR, E. Accumulation of heavy metals in epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). **Planta**, v. 212, p. 313-322, 2001.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.A.; LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v. 69, p. 583-593, 1994.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4ª Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 368p.

MA, M.; LAU, P-S.; JIA, Y-T.; TSANG, W-K.; LAM, S.K.S.; TAM, N.F.Y.; WONG, Y-S. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant. *Festuca rubra* cv. Merlin. **Plant Science**, v. 164, p. 51-60, 2003.

MACFARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 233-240, 2001.

MACNAIR, M.R. The genetics of metal tolerance in vascular plants. **New Phytology**, v. 124, n. 49, p. 541-559, 1993.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental, micronutrientes e metais pesados: Mitos, Mistificação, e Fatos**. ProduQuímica: São Paulo, 1994. 153p.

MAXWELL, K.; JOHNSON, N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-698, 2000.

MAZEN, A. M. A.; EL MAGHRABY, O. M. O. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 40, n. 3. p. 411-417, 1997.

MENDELSSOHN, I.A.; MCKEE, K.L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetland plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, p. 263-275, 2001.

MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A.-A. F.; GOMES, F. P.; AGUILAR, M. A. G.; MANGABEIRA, P. A. O. Leaf gas exchange, chlorophyll fluorescence and growth responses of *Genipa americana* seedlings to soil flooding. **Environmental and Experimental Botany**, v. 50, n. 3, p. 221-231, dez. 2003.

MITTLER, R. Cell death in plants. In: LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z.; TILLY, J.L. (Eds.). **When cell die**. New York: Wiley-Lis, 1998. p. 147-174.

MOBIN, M.; KHAN, N. A. 2006. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology** doi: 10.1016/j.jplph.2006.03.003.

NEUMANN, D.; LICHTENBERGER, O.; GÜNTHER, D.; TSCHIERSCH, K.; NOVER, L. Heat -shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. **Planta**, v. 146, p. 704-717, 1994.

NOCTOR, G.; GOMEZ, L.; VANACKER, H.; FOYER, C.H. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1283-1304, 2002.

OBARA, K.; KURIYAMA, H.; FUKUDA, H. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during Programmed Cell Death in Zinnia. **Plant Physiology**, v. 125, p. 615-626, 2001.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p. 329-341, 2001.

PAGE, A.L.; BINGHAM, F.T.; NELSON, C. Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. **Journal Environmental Quality**, v. 1, n. 3, p. 288-291, 1972.

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G.; SIQUEIRA, J. O.; MIRANDA, J.R.P.; FERNANDES, A.R. Absorção de nutrientes por mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) em solução nutritiva contaminada por cádmio. **Revista Árvore**, v. 28, n. 2, p. 189-197, 2004.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review Plant Biology**, v. 56, p. 15-39, 2005.

PORTO, M.L. Plantas detectoras de metais. **Ciência Hoje**, v. 10, n. 55, p. 8-9, 1989.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, n. 4, p. 525-545, 1995.

PRASAD, M.N.V.; FREITAS, H. Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (holly oak). **Environmental Pollution**, v. 110, p. 277-283, 2000.

PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H. M. O. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 285-321, 2003.

PULFORD, I. D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. **Environment International**, v. 29, p. 529-540, 2003.

REBOUÇAS, N.A.; GOMES, M.D. Hibridização subtrativa seguida de PCR. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, p. 30-35, 1999.

RODECAP, K.D.; DAVID, T.T.; LEE, E.H. Iron nutrition influence on cadmium accumulation by *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Journal Environmental Quality**, v. 23, p. 239-246, 1994.

ROMANI, T.R.N.; LIMA, É.G.; AZOUBEL, R.; BATIGÁLIA, F. Toxicidade do Cádmio no Homem. **HB Científica**, v. 9, n. 1, 2002.

ROOT, A.R.; MILLER, R.J.; KOEPPE, D.E. Uptake of cadmium - its toxicity and effect on the iron ratio in hydroponically grown corn. **Journal Environmental Quality**, v. 4, n. 4, p. 473-476, 1975.

SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, v. 109, p. 427-433, 1995.

SALVADOR, J.L.G. Comportamento de espécies florestais nativas em áreas de depleção de reservatórios. IPEF 33, p. 73-78, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2ª Ed. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANITÁ di TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 41, p. 105-130, 1999.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2ª Ed. The Iowa State College Press: Ames, 1951. 391p.

SATARUG, S.; BAKER, J. R.; URBENJAPOL, S.; ELKINS, M.H.; REILLY, P.E.B.; WILLIAMS, D.J.; MOORE, M.R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicology Letters**, v. 137, p. 65-83, 2003.

SCHAT, H.; VOOIJS, R. Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris*, a co-segregation analysis. **New Phytology**, v. 136, p. 489-496, 1997.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D. L.; POLLE, A. Cadmium - induced changes in antioxidant systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. **Plant Physiology**, v. 127, p. 887-898, 2001.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1351-1365, 2002.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G.; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, v. 29, n. 2, p. 175-183, 2005

SRIDHAR, B. B. M., DIEHL, S. V., HAN, F. X., MONTS, D. L., SU, Y., Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, n. 2, p. 131-141, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 3ª Ed. Sunderland: Sinauer, 2004. 670p.

VEKEMANS, X.; LEFÈVRE, C. On the evolution of heavy metal tolerant populations in *Armeria maritima*, evidence from allozyme variation and reproductive barriers. **Journal Evolution Biology**, v. 10, p. 175-191, 1997.

VOLLENWEIDER, P., COSIO, C., GÜNTHARDT-GOERG, M.S., KELLER C. Localization and effects of cadmium in leaves of a tolerant *Salix viminalis* L. Part II. Microlocalization and cellular effect of cadmium **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, n. 1-3, p. 25-40, 2006.

YANG, X.; FENG, Y.; HE, Z.; STOFFELLA, P.J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, p. 339-353, 2005.

ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. **Gene**, v. 179, p. 21-30, 1996.

ZHANG, L.; MA, X-L.; ZHANG, Q.; MA, C-L.; WANG, P-P.; SUN, Y-F.; ZHAO, Y-X; ZHANG, H. Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. **Gene**, v. 267, p. 193-200, 2001.

ZIMMERI, A. M.; DHANKHER, O. P.; McCAIG, B.; MEAGHER, R.B. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. **Plant Molecular Biology**, v. 58, p. 839–855, 2005.

APÊNDICE

Apêndice A - Identificações prováveis de todos ESTs gerados e agrupados em 9 classes funcionais.

Classe	Anotação Funcional	Espécie	E-value	Comprimento (pb)	Acesso
Estrutura da parede celular ou metabolismo	proline-rich protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2E-04	385	BT000633
	proline-rich protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,00E-25	637	AK230334
	cinnamyl alcohol dehydrogenase	<i>Eucalyptus gunnii</i>	3,00E-10	280	X88797
Citoesqueleto	actin	<i>Capsicum chinense</i>	7E-103	566	AM168448
Metabolismo primário	cytochrome c oxidase subunit Vb	<i>Pisum sativum</i>	2E-25	710	AB236122
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Magnolia quinquepeta</i>	8E-76	756	X60347
	Serine Hydroxymethyltransferase 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-48	456	AJ271726
	S-adenosylmethionine synthetase	<i>Actinidia chinensis</i>	3,00E-08	189	U17241
	aldo-keto reductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-29	666	NM_104751
	aldo/keto reductase	<i>Manihot esculenta</i>	5,00E-12	670	AY973615
	alpha-Arabinosidase1	<i>Pyrus communis</i>	1E-39	863	AB067643
	monodehydroascorbate reductase	<i>Solanum lycopersicum</i>	6,00E-14	371	L41345
	S-methyltransferase	<i>Neosartorya fischeri</i>	3E-84	466	XM_001267289
	photosystem I reaction center subunit II precursor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-85	710	AF326887
Expressão gênica e metabolismo do RNA	GRAS transcription factor	<i>Capsicum annuum</i>	1E-38	365	DQ241734
	RNA polymerase subunit C1	<i>Hedera helix</i>	9E-30	316	U72477
	zinc finger protein	<i>Neosartorya fischeri</i>	1E-40	532	XM_001262375.
	eukaryotic translation initiation factor 5A isoform V	<i>Hevea brasiliensis</i>	5,00E-44	457	AF516354
Síntese e processamento de proteína	small subunit ribosomal RNA	<i>Hypocrea lutea</i>	8,00E-40	358	AB027362
	small subunit ribosomal RNA	<i>Hypocrea lutea</i>	2,00E-73	521	AB027362
	small subunit ribosomal RNA	<i>Hypocrea lutea</i>	3,00E-79	792	AB027362
	large subunit ribosomal RNA	<i>Atherosperma moschatum</i>	8,00E-100	495	DQ008775
	translation initiation factor 5A-4	<i>Hyacinthus orientalis</i>	1E-59	444	AY389707
	6-domain trypsin inhibitor precursor	<i>Nicotiana attenuate</i>	5,00E-05	501	AY297103
	serine carboxypeptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9E-26	880	NM_112594
	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-30	791	NM_114672

Apêndice A - Continuação

Sinal de transdução	GTP-binding protein	<i>Cicer arietinum</i>	2E-39	670	AJ299064
	GTP binding / translation elongation factor/	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1E-101	533	NM_179487
	protein phosphatase 2C	<i>Solanum tuberosum</i>	2E-77	475	AB206783
	calmodulin binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	9,00E-08	510	AC007797
	protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	3,00E-15	541	L27821
Defesa	secoisolariciresinol dehydrogenase	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	8E-31	457	EF205022
	pin2 gene, wound induced	<i>Solanum tuberosum</i>	6E-07	648	X99095
	mRNA for class III acidic endochitinase	<i>Glycine max</i>	2E-14	457	AB000097
	mRNA for class III chitinase (chi2 gene).	<i>Coffea arabica</i>	2E-36	648	AM159173
	mRNA for chitinase 2	<i>Triticum aestivum</i>	7E-31	379	AB029935
	class III peroxidase (pod3) mRNA	<i>Gossypium hirsutum</i>	1E-63	664	AF485265
	secretory peroxidase (prx) mRNA	<i>Catharanthus roseus</i>	2E-68	598	AY924306
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	2E-17	354	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	6E-17	294	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	4E-14	365	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	1E-16	490	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	1E-15	510	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	5E-17	480	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Plantago major</i>	3E-15	367	AJ843996
	metallothionein mRNA	<i>Plantago major</i>	1E-08	379	AJ843996
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	1E-16	760	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	4E-16	527	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	6E-15	817	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	1E-17	335	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Sambucus nigra</i>	1E-06	367	X83439
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	2E-17	368	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	4E-04	376	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Oenanthе javanica</i>	8E-08	393	AF017787
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	3E-17	377	X51993
	metallothionein mRNA	<i>Sambucus nigra</i>	4E-04	366	X83439
	metallothionein mRNA	<i>Mimulus guttatus</i>	4E-17	434	X51993
	cherry-allergen PRUA1	<i>Prunus avium</i>	5E-40	487	U66076
	cherry-allergen PRUA1	<i>Prunus avium</i>	5E-41	857	U66076
	class 4 pathogenesis-related protein	<i>Prunus persica</i>	8E-50	316	AF362989
	mRNA for pathogenesis-related protein PR10A	<i>Datisca glomerata</i>	2E-32	578	AJ489320
	mRNA for pathogenesis-related protein PR10A	<i>Datisca glomerata</i>	9E-34	478	AJ489320

Apêndice A - Continuação

	pathogenesis-related protein 4A (PRP4A)	<i>Pisum sativum</i>	6E-17	363	AF137351
	pre- hevein-like protein (PHLP) mRNA	<i>Pisum sativum</i>	7E-42	606	AF137352
	beta-1,3-glucanase	<i>Coffea arabica x Coffea canephora</i>	3E-36	374	AY389811
Estimulo abiotico e desenvolvimento	FAR1 (FAR-RED IMPAIRED RESPONSE 1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5E-31	480	NM_117596
	auxin-repressed protein-like protein	<i>Manihot esculenta</i>	1E-48	569	AY973620
	auxin-induced	<i>Nicotiana tabacum</i>	3E-22	456	X56267
	putative ripening-related protein	<i>Vitis vinifera</i>	5E-18	584	AJ237985
	early light inducible protein	<i>Trifolium pratense</i>	1E-10	514	AY340640
Diversos	tumor-related protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	6E-23	495	U66263
	tumor-related protein	<i>Pisum sativum</i>	2E-56	376	EF208905
	putative 33 kDa secretory protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3E-36	419	AY050924
	mitochondrion	<i>Hypocrea jecorina</i>	4E-15	264	AF447590
	protein involved in starch metabolism	<i>Solanum tuberosum</i>	2,00E-05	396	Y09533
	starch-branching-enzyme	<i>Solanum tuberosum</i>	2E-87	549	X69805