Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Avaliação de tolerância ao Cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Fernando Angelo Piotto

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

Fernando Angelo Piotto
Engenheiro Agrônomo

Avaliação de tolerância ao Cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)

Orientador:
Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Piotto, Fernando Angelo
Avaliação de tolerância ao Cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) / Fernando Angelo Piotto.- - Piracicaba, 2012.
144 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cádmio - Tolerância 2. Estresse oxidativo 3. Metabolismo oxidativo 4. Tomate 5. Variação genética I. Título

CDD 635.642
P662a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sebastião e Mara,
e às minhas irmãs Flávia e Tânia
por sempre acreditarem em mim.

OFEREÇO

À minha querida e amada esposa Katherine

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por sempre estar ao meu lado e iluminar meu caminho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela orientação, dedicação, amizade e confiança em mim depositada.

Ao Prof. Giancarlo Conde Xavier Oliveira, pela amizade e total apoio durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Augusto Tulmann Neto pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida e à Dra. Cristina Vieira de Almeida pelo apoio, amizade e pela colaboração nesta tese.

Ao senhor Evandro da Silva Matos (Syngenta Seeds), por todo o suporte com o plantio dos mutantes de tomateiro no campo.

À Dra Salete Gaziola, pelas contribuições profissionais, pela paciência e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus amigos de laboratório (em ordem alfabética para ninguém se sentir menos importante): Aline, Amerivan, Berenice, Berta, Carol, Daiana, Daniel, Deived, Flávia, Georgia, Gicka, Jackeline, Lucas, Lucélia, Luis Felipe, Manuela, Milca, Mônica, Paula, Priscila, Roberta, Sandra, Tiago, Vanessa, Vinícius, etc, espero não ter esquecido de ninguém.

Aos funcionários do Departamento de Genética que sempre me ajudaram: Cláudio Segatelli, Seu Miguel, João, José, Amaral, Marcinho, Carlão, Berdan, Fernandinho, Léia, Adilson, Marcos Cella, Reginaldo, Aparecido, Ronaldo, Nivaldo, Pipo, Rudinei, Seu Antônio... acho que vai ser difícil lembrar de todos... mas de qualquer forma, agradeço por tudo que aprendi com vocês, tanto na parte profissional, quanto como pessoas trabalhadoras e honestas que todos vocês são.

Em especial, agradeço à minha queria e amada esposa Katherine, pela paciência, compreensão e amor dedicados ao longo da realização deste trabalho, estando presente nos momentos difíceis como fiel companheira e colaborando sempre que necessário.

Ao CNPq e FAPESP pela bolsa e concessão dos recursos para a realização deste trabalho.

A durante a realização deste trabalho, contei com uma parcela de contribuição de várias pessoas. Porém, dificilmente farei jus a todos que merecem aqui meu sincero agradecimento. Assim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse sonho, sou-lhes muito grato.

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais votará ao seu tamanho original"

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO 13
ABSTRACT 15
1 INTRODUÇÃO 17
1.1 O tomateiro como planta modelo de estudos 18
1.2 Parâmetros de tolerância ao Cd em tomateiro 18
1.3 Efeitos do Cd causa sobre o tomateiro 19
Referências 21
2 SELEÇÃO DE MUTANTES DE TOMATEIRO TOLERANTES AO CÁDMIO (*Solanum lycopersicum* L.) 23
Resumo 23
Abstract 23
2.1 Introdução 24
2.2 Material e Métodos 27
2.2.1 Mutagênese 27
2.2.2 Desenvolvimento do sistema para seleção das plantas tolerantes ao Cádmio 32
2.2.2.1 Avaliação das plantas em areia 32
2.2.2.2 Avaliação das plantas em meio de cultura 32
2.2.2.4 Avaliação das plantas em hidroponia 33
2.2.3 Germinação e transplante 34
2.2.4 Estrutura de cultivo para a seleção de tolerantes 35
2.2.5 Mutações marcadoras 36
2.2.6 Determinação de proteína de tecidos de folhas e raízes 37
2.2.7 Perfil de proteínas (SDS-PAGE) 37
2.2.8 Delineamento experimental e análises estatísticas 37
2.3 Resultados e Discussão 37
2.3.1 Seleção de mutantes tolerantes ao Cádmio 37
2.3.2 Avaliação das progênies M3 potencialmente tolerantes 41
2.3.3 Confirmação de tolerância do mutante *Cd23* 42
2.3.4 A tolerância do mutante *Cd23* 45
2.3.5 Perfil de proteínas (SDS-PAGE) 45
2.4 Considerações Finais 47
Referências 48

3 PARÂMETROS PARA DETERMINAÇÃO DE TOLERÂNCIA AO CÁDMIO EM CULTIVARES DE TOMATEIRO 53
Resumo 53
Abstract 53
3.1 Introdução 54
3.2 Material e Métodos 56
3.2.1 Material vegetal 56
3.2.2 Estágio de avaliação e cultivo em solução nutritiva 57
3.2.3 Curva de Dose-Resposta ao $CdCl_2$ 58
3.2.4 Parâmetros avaliados 59
3.2.4.1 Massa seca e quantificação de Cd 59
3.2.4.2 Determinação indireta de clorofila total (SPAD) 59
3.2.5 Análises histológicas 59
3.2.6 Determinação do Índice de Tolerância (IT) 60
3.2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas 60
3.3 Resultados e Discussão 61
3.3.1 Pré avaliação e seleção das cultivares para experimentos com Cd 61
3.3.2 Caracterização dos efeitos causados pelo Cd em plantas de tomateiro 61
3.3.3 Estudo do efeito do Cd sobre o desenvolvimento das cultivares de tomateiro 65
3.3.4 Relação entre Cd e clorose em plantas de tomateiro 67
3.3.5 Índice de Tolerância (IT) ao Cd em tomateiro 73
3.3.6 Cultivo em solução nutritiva x solos contaminados 78
3.3.7 Taxa de crescimento das cultivares expostas ao Cd 79
3.3.8 Acúmulo relativo de Cd nos tecidos 81
3.3.9 Acúmulo total de Cd nos tecidos 85
3.4 Conclusões 88
Referências 90
4 ANÁLISE COMPARATIVA DO METABOLISMO OXIDATIVO ENTRE CULTIVARES DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) CONTRASTANTES QUANTO À TOLERÂNCIA AO CÁDMIO 95
Resumo 95
Abstract 95
4.1 Introdução 96
4.2 Material e Métodos 98

4.2.1 Material vegetal..... 98
4.2.2 Estágio de avaliação e cultivo em solução nutritiva 98
4.2.3 Massa seca e quantificação de Cd..... 99
4.2.4 Determinação do Índice de Tolerância (IT)..... 100
4.4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas..... 100
4.2.6 Extração e determinação de proteínas solúveis 100
4.2.7 Variações nos padrões proteicos..... 101
4.2.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)..... 102
4.2.9 Peroxidação lipídica 102
4.2.10 Análises das enzimas antioxidantes 102
4.2.10.1.1 Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante..... 102
4.2.10.1.2 Caracterização das isoenzimas de SOD..... 103
4.2.10.2 Atividade da enzima catalase (CAT)..... 103
4.2.10.2.1 Atividade da enzima CAT em espectrofotômetro..... 103
4.2.10.2.2 Atividade da enzima CAT em PAGE não-desnaturante..... 104
4.2.10.3 Atividade da enzima glutationa-redutase (GR)..... 104
4.2.10.3.1 Atividade da enzima GR em espectrofotômetro 104
4.2.10.3.2 Atividade da enzima GR em PAGE 104
4.3 Resultados e Discussão 105
4.3.1 Efeito do Cd nas cultivares PR e CR..... 105
4.3.2 Parâmetros de desenvolvimento..... 106
4.3.3 Acúmulo de Cd nos tecidos 111
4.3.4 Estresse oxidativo induzido pelo Cd 113
4.3.5 Alterações no perfil de proteínas causado pela presença de Cd 117
4.3.6 Resposta do sistema antioxidante enzimático ao estresse causado por Cd 121
4.3.6.1 Atividade de SOD em resposta ao Cd 121
4.3.6.2 Atividade de CAT em resposta ao Cd 126
4.3.6.3 Atividade de GR em resposta ao Cd 131
4.3.7 Relação entre o sistema antioxidante celular e a tolerância ao Cd 136
4.4 Conclusões..... 137
Referências 138

RESUMO

AVALIAÇÃO DE TOLERÂNCIA AO CÁDMIO EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)

A tolerância ao Cádmio (Cd) é um assunto de relevada importância, devido aos vários problemas que este metal pode causar para a agricultura, levando à queda de produção e perda da qualidade dos alimentos, representando, também, riscos à saúde humana pelo consumo de produtos contaminados com esse metal. Neste trabalho, fizemos um estudo geral sobre a tolerância ao Cd em plantas de tomateiro, partindo de 3 abordagens complementares, onde geramos variabilidade genética por meio de mutagênese usando um tomateiro modelo (cultivar Micro-Tom); exploramos uma pequena fração da variabilidade genética da espécie para identificar genótipos com diferentes graus de tolerância ao Cd e, finalmente, realizamos estudos ligados ao metabolismo oxidativo de duas cultivares selecionadas, sendo uma sensível e outra mais tolerante a este metal. Este trabalho nos conduziu também ao desenvolvimento e adaptação de metodologias para a avaliação e seleção de plantas tolerantes a metais pesados, dentre as quais propomos a utilização de um Índice de Tolerância adequado para avaliar cultivares morfologicamente diferentes. Por fim, os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram uma visão geral sobre os parâmetros de tolerância ao Cd em plantas de tomateiro, bem como o estudo dos principais padrões de resposta no metabolismo oxidativo de genótipos mais sensíveis e mais tolerantes a este metal.

Palavras-chave: Parâmetros de tolerância; Planta modelo; Metabolismo oxidativo; Estresse

ABSTRACT

EVALUATION OF CADMIUM TOLERANCE IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.)

Tolerance to heavy metal Cadmium (Cd) is an important subject because this metal can cause several problems in agriculture, such as decrease in production and loss of food quality, representing risks to human health by consumption of vegetables contaminated with this metal. In this research, we studied Cd-tolerance in tomato plants, using three complementary approaches, generating genetic variability by mutagenesis using a tomato model (cultivar Micro-Tom), exploring a small fraction of the genetic variability of species to identify genotypes with different degrees of Cd-tolerance and, finally, we conducted studies related to the oxidative metabolism of two cultivars, with low and high tolerance to this metal. Additionally, this work results in the development and adaptation of methodologies for the evaluation and selection of tolerant plants to heavy metals. Then, we propose an appropriate Tolerance Index to evaluate morphologically different cultivars. In conclusion, the results of this study are an overview of the parameters of Cd-tolerance in tomato plants, as well as the study of the some patterns of response in the oxidative metabolism of genotypes more sensitive and more tolerant to this metal.

Keywords: Parameters of tolerance; Plant model; Oxidative metabolism; Stress

1 INTRODUÇÃO

Os problemas de toxidade por Cádmio (Cd) em plantas vêm crescendo juntamente com o aumento na quantidade de solos contaminados, em decorrência das crescentes atividades industriais, agrícolas e antrópicas (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005). A gama de espécies que mostram algum grau de tolerância a este metal é extremamente restrita, existindo um problema potencial relativo à queda na produção agrícola, redução da qualidade dos alimentos e riscos à saúde humana pelo consumo destes. Mais escassos ainda são os estudos sobre a resposta de plantas cultivadas expostas a este metal, havendo poucas informações que englobem alterações na fisiologia, na morfologia e no metabolismo de tais espécies. Além disso, existem raríssimos estudos voltados para a avaliação da diversidade genética disponível para trabalhos envolvendo tolerância e sensibilidade ao Cd, que são base da escolha de parentais para programas de melhoramento genético, bem como para a compreensão dos mecanismos de tolerância a metais pesados.

Dada a importância deste tema, vários estudos sobre a resposta ao Cd de diversas espécies de plantas tem sido publicados. Contudo, destacamos alguns trabalhos usando a cv Micro-Tom de tomateiro como planta modelo, os quais tiveram como um dos focos principais as alterações no metabolismo antioxidante das células (MONTEIRO et al., 2011; GRATÃO et al., 2009; GRATÃO et al., 2008a; GRATÃO et al., 2008b). A cultivar modelo Micro-Tom (MT) é uma cultivar miniatura de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom) comparável a *Arabidopsis thaliana* (MEISSNER et al., 1997). As principais características da cv MT são o porte reduzido (15 cm de altura) e ciclo de vida curto (70 a 90 dias), o que facilita seu cultivo em pequenos vasos pequenos (100 mL), proporcionando economia de tempo e espaço, além de possibilitar a visualização da planta como um todo.

Embora os estudos com a cv MT tenham sido extremamente esclarecedores em relação aos efeitos do Cd nesta espécie, este trabalho apresenta pesquisas usando acessos de tomateiro geneticamente divergentes entre si, sendo estes cultivares comerciais e *landraces* originários de várias partes do mundo, além de uma abordagem usando a própria cv MT como modelo para identificar novos genes de tolerância ao Cd. Tal proposta vem complementar os estudos realizados até o momento, sobre a resposta da cv MT ao Cd, com a vantagem de estreitarmos cada vez mais a distância entre pesquisa básica e aplicada. Assim, neste trabalho utilizamos 3 abordagens complementares e fundamentais para o estudo de tolerância ao Cd em tomateiro sendo que na primeira delas nós 1) geramos variabilidade genética na cv MT por meio de mutagênese, para selecionar um mutante tolerante ao Cd, desenvolvendo uma

metodologia de seleção diferenciada; 2) exploramos a própria variabilidade genética existente na espécie para avaliar a resposta de diferentes acessos (cultivares) quanto à tolerância a este metal e 3) realizamos estudos de ligados ao estresse oxidativo, visando entender melhor o metabolismo oxidativo, em duas cultivares contrastantes quanto à tolerância ao Cd, sendo uma mais tolerante e uma mais sensível a este metal.

1.1 O tomateiro como planta modelo de estudos

Embora espécies como soja, milho e cana-de-açúcar representem uma fração considerável da importância economia do agronegócio de nosso país, em geral as hortaliças é que são plantadas nas áreas marginais às grandes culturas, alocadas em grande parte perto dos centros urbanos e industriais, onde a probabilidade de ocorrência de solos contaminados por Cd e outros metais pesados é muito maior. Dentre as hortaliças, temos o tomateiro como sendo a espécie de maior importância econômica considerando o exposto acima. Além disso, a própria forma de plantio do tomateiro torna essa planta extremamente vantajosa para nossos estudos, pois é possível simular com facilidade a exposição das plantas ao metal alvo de nossas pesquisas. Isso acontece porque primeiramente são feitas mudas em substrato, as quais são posteriormente transplantadas no solo. Assim, ao trabalharmos com a exposição de plântulas de tomateiro ao Cd, estamos simulando o que de fato acontece no campo.

Somando os fatores 1) importância econômica desta cultura, 2) as características quanto às áreas de cultivo com probabilidade de ocorrência de solos contaminados e 3) a própria forma como essa espécie é plantada no campo, podemos dizer que o tomateiro é um modelo bastante adequado para os nossos propósitos de compreender melhor os mecanismos assimilação, translocação e eliminação de Cd pelas plantas, envolvidos na tolerância aos metais pesados.

1.2 Parâmetros de tolerância ao Cd em tomateiro

Em relação à resposta de plantas aos metais pesados, vamos assumir que os parâmetros de tolerância ao Cd podem ser definidos como sendo um conjunto de diferenças genéticas, fisiológicos, bioquímicos e morfológicos que contribuem de forma isolada ou conjunta para que uma determinada planta seja mais tolerante do que outras. Quando identificamos grupos de plantas mais tolerantes ou mais sensíveis a um tipo de estresse, podemos estudar os padrões de variação que ocorrem entre eles, explicando quais destes

fatores estão associados mais fortemente às variações de tolerância que constatamos. O conhecimento conjunto destes parâmetros pode auxiliar na busca direcionada de acessos mais tolerantes ao estresse causado pelo Cd, havendo a possibilidade de inferir parte dos resultados para resposta a outros metais.

1.3 Efeitos do Cd causa sobre o tomateiro

Embora as causas da toxidez por Cd em nível celular sejam as mais variadas, temos que um dos principais efeitos morfológicos é a redução agressiva do crescimento total das plantas (raízes, caules e folhas), como mostrado na figura 1A, onde plantas da cv MT foram expostas à 10 µM de $CdCl_2$ por 30 dias, em solução nutritiva. Outro efeito marcante é a clorose acentuada nas folhas e caule, além da indução do florescimento precoce das plantas (figura 1B). Porém, os efeitos nocivos do Cd são mais marcantes nos tecidos em desenvolvimento (drenos fisiológicos principais), sendo que a clorose é mais forte nas folhas jovens em relação às folhas mais velhas (figura 1C). A presença do Cd causa forte estresse nas plantas, o qual dependendo da intensidade pode causar a morte do indivíduo. Contudo, é necessário considerar que a intensidade deste estresse é relativa à combinação dos seguintes fatores:

a) **Quantidade de Cd disponível para cada planta:** as plantas possuem um sistema de defesa contra a presença de elementos tóxicos como Cd. Porém, a presença destes em grandes quantidades leva ao colapso deste sistema causando estresse elevado.
b) **Tempo de exposição ao estresse:** em condições experimentais costuma-se submeter as plantas a curtos períodos de exposição ao agente estressante. Porém, em um campo onde o solo está contaminado com Cd esta exposição é constante, podendo levar à redução acentuada de seu desenvolvimento, queda na produtividade e até mesmo à morte dos indivíduos.
c) **Estágio de desenvolvimento das plantas:** obviamente plantas mais jovens devem sofrer mais quando expostas à mesma quantidade de Cd que plantas mais velhas.

Embora existam inúmeros outros fatores, vamos considerar a combinação destes 3 supracitados como sendo os principais fatores de referência para nossos estudos que serão apresentados na sequência.

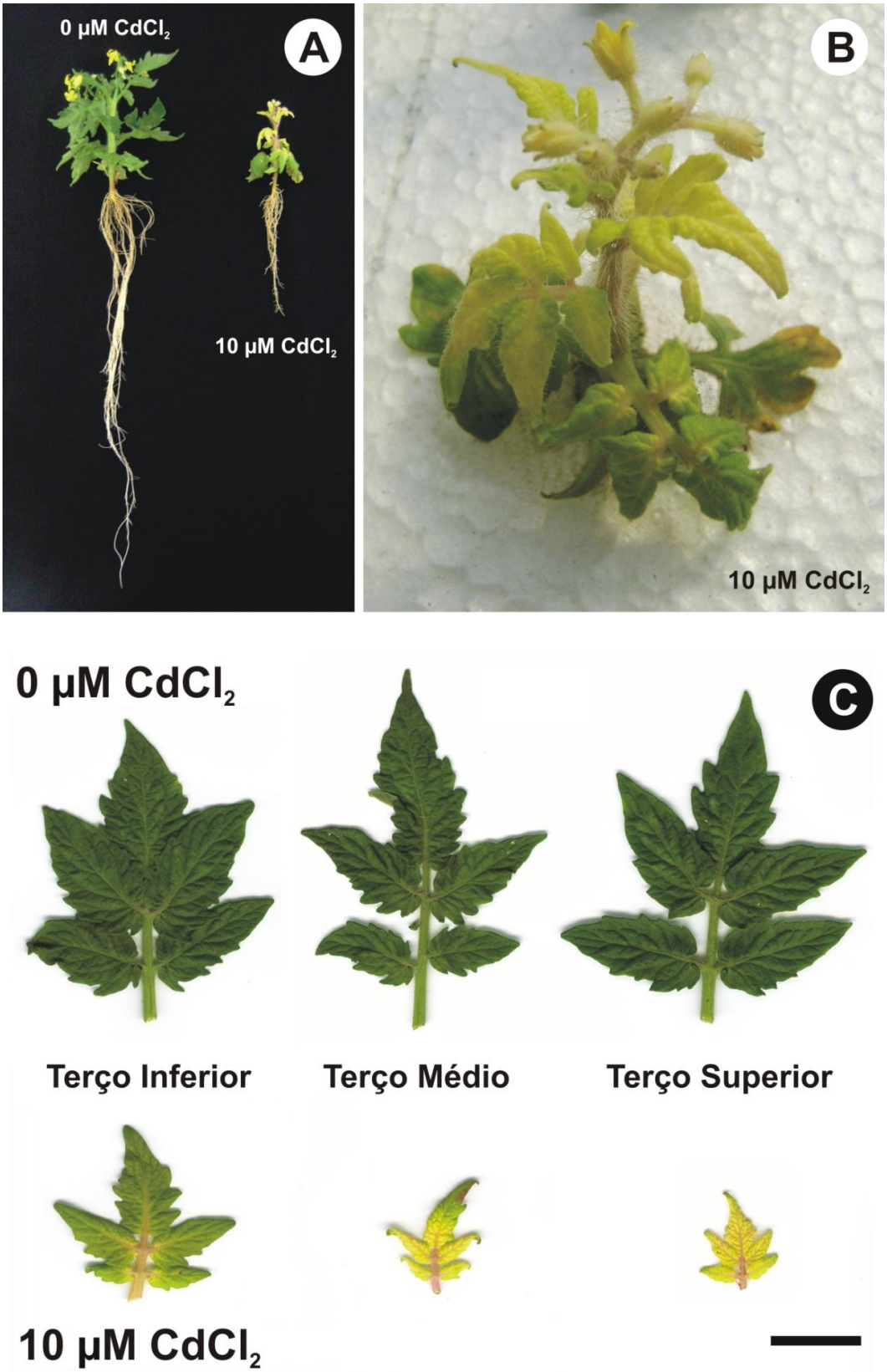

Figura 1 - Efeito do Cd em plantas de tomateiro da cv MT. A) redução geral do crescimento; B) clorose nos tecidos vegetais e indução do florescimento precoce; C) efeito do Cd em folhas que se encontram em três estágios de desenvolvimento diferentes (maduras, intermediárias e jovens). Barra = 20 mm

Assim, este trabalho apresenta, no primeiro momento, uma visão geral sobre a tolerância ao Cd em plantas de tomateiro, considerando os aspectos experimentais relativos à própria metodologia para estudos de tolerância nesta espécie, os quais podem servir como modelo para outros trabalhos cujo objetivo seja relacionado à resposta de plantas a metais pesados. Em um segundo momento, esta abordagem sobre tolerância contribuiu para a seleção de um mutante tolerante ao Cd, e também para a identificação de cultivares com respostas de tolerância contrastantes a este metal, onde mostramos que é possível explorar a própria variabilidade genética da espécie para tal propósito. Finalmente, o estudo do metabolismo oxidativo entre cultivares com diferentes graus de tolerância ao Cd, possibilitou uma visão geral do padrão de resposta de enzimas antioxidantes ao Cd, onde foi possível estabelecer um paralelo entre tolerância e as principais alterações no metabolismo oxidativo das células dos tecidos vegetais.

Referências

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 21-34, Mar. 2005.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ANTUNES, A.M.; PERES, L.E.P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, p. 321-333, 2008a.

GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A.P.; PERES, L.E.P.; MEDICI, L.O.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R. A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, p. 387-394, 2009.

GRATÃO, P.L.; PERES, L.E.P.; MONTEIRO, C.C.; AZEVEDO, R. A. The isolation of antioxidant enzymes from mature tomato (cv. Micro-Tom) plants. **HortScience**, Alexandria, v. 43, p. 1608-1610, 2008b.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics**. The Plant Journal**, Malden, v.12, p. 1465-1472, 1997.

MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; GRATÃO, P. L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, LE. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, p. 306-320, 2011.

2 SELEÇÃO DE MUTANTES DE TOMATEIRO TOLERANTES AO CÁDMIO (*Solanum lycopersicum* L.)

Resumo

O tomateiro possui uma base genética relativamente restrita, embora a variabilidade morfológica desta espécie seja elevada. Partindo do princípio de que a seleção de plantas tolerantes a um determinado estresse depende da existência de diversidade genética, o objetivo deste trabalho foi primeiramente gerar variabilidade genética artificialmente por meio de mutagênese, visando selecionar plantas de tomateiro tolerantes ao metal pesado Cd. Uma das principais dificuldades nos trabalhos visando a seleção de plantas tolerantes a metais pesados é a própria metodologia para avaliação eficiente de grande número de plantas, gerando poucos resíduos para o meio ambiente. Por esse motivo, propomos uma metodologia simples e eficaz que pode ser aplicada a metais ou outros elementos químicos, no qual selecionamos um mutante de tomateiro (cv Micro-Tom) tolerante ao Cd, o qual chamamos de *Cd23*, obtido por meio de mutagênese com etanosulfonato de metila (EMS). A seleção foi realizada inicialmente com base em sintomas de clorose nas folhas e posteriormente com base na taxa de crescimento. Além deste, 27 outros novos mutantes foram selecionados, sendo que 23 deles são mutantes com alterações potenciais quanto a respostas ao Cd e 4 são mutantes com alterações na arquitetura foliar, coloração das folhas e coloração dos frutos. O Índice de Tolerância proposto mostrou-se bastante eficiente para determinar o grau de sensibilidade ou tolerância ao Cd entre a cv MT o mutante *Cd23*. O mutante *Cd23* apresentou maior tolerância nas doses de 25 e 100 µM de $CdCl_2$. No entanto, observamos que as plantas mutantes naturalmente crescem menos em relação ao controle, o que dificultou a avaliação do potencial real de tolerância deste genótipo. Isso provavelmente aconteceu devido à alta carga genética gerada no próprio processo de mutagênese, onde várias outras mutações estariam afetando o desenvolvimento do mutante. Evidências da ocorrência de carga genética puderam ser identificadas na avaliação do perfil proteico das plantas mutantes e não mutantes. Nessa análise, notamos a expressão diferenciada de várias proteínas entre o mutante e o controle, tanto na presença quando na ausência do metal, além do estímulo ou repressão de algumas proteínas exclusivas de cada genótipo. Por fim, chegamos à conclusão de que o sistema proposto foi adequado para selecionar plantas tolerantes ao Cd, podendo ser utilizado para seleção de plantas tolerantes a outros metais, devido à facilidade de montagem da estrutura, baixo custo de implantação, minimização de geração de resíduos e possibilidade de uso em várias espécies e diferentes metais pesados.

Palavras-chave: Mutagênese; Metais pesados; Hidroponia; Carga genética

Abstract

Tomato has a reduced genetic variability, although it shows a high morphological variability. The selection of tolerant plants to a stress relies on the existence of genetic diversity. Therefore, the objective of this work was to generate genetic variability using mutagenesis, to select tolerant mutants to heavy metal Cd, using tomato plants. The main limitation to the selection of tolerant plants to heavy metals is the methodology, which needs to be very efficient to evaluate a large numbers of plants, generating less waste to the environment. Thus, we propose a simple and effective methodology that can be applied to select tolerant mutants to metals and other chemicals substances, through which we selected a Cd-tolerant mutant in tomato plants (cv Micro-Tom). This mutant was designated *Cd23* and

obtained by mutagenesis using Ethyl methanesulfonate (EMS). The selection was, initially, based on symptoms in the leaves and confirmed evaluating growth rate. In addition, we selected 21 mutants showing potential changes in responses to Cd-tolerance and others 4 mutants that exhibited variations in leaf architecture, color of leaves and fruit color, totalizing 25 other new mutants. The Tolerance Index was very efficient to determine the differences in the sensitivity or tolerance to Cd among cv MT (control) and mutant *Cd23*. The *Cd23* showed a higher tolerance at doses of 25 and 100 µM of $CdCl_2$. However, we found that mutant plants naturally grow less than the control (cv MT), making it difficult to know the real potential of tolerance of this genotype. This effect probably is due to the high genetic load generated by mutagenesis process, where several other mutations can be affecting the development of the mutant. An evidence of the occurrence of genetic load could be identified evaluating protein profile among mutant and control plants. Protein profile reveals differential expression of several proteins between the mutant and the control in presence or absence of the metal, and stimulation or suppression of some exclusive proteins of each genotype. Finally, we conclude that the system to select Cd-tolerant plants was efficient to select a tolerant tomato to Cd, and can be used for selection of others heavy metals tolerant plants. This system require a simple structure and a low implementation cost, reducing the waste generation, and can be adapted to be use for selection of plants tolerant to heavy metals in different crops.

Keywords: Mutagenesis; Heavy metals; Hydroponic; Genetic load

2.1 Introdução

A mutagênese tem sido amplamente utilizada para gerar novos alelos, com o objetivo de atender a propósitos diversos. Os trabalhos de mutagênese são concentrados, em grande parte, na obtenção de mutantes cujas alterações tenham uso potencial no melhoramento genético ou que sejam importantes para o estudo de funções gênicas, causando mutações que podem levar ao ganho ou à perda de função de determinados genes (AZEVEDO et al., 1990; BRENNECKE et al., 1996). Existem várias metodologias clássicas de mutagênese, utilizando agentes físicos como raios γ, raios *x* e fast nêutron; ou químicos, tais como etanosulfonato de metila (EMS), metil metanossulfonato (MMS), sulfato de dietilo (DES), e nitrosoguanidina (NTG, NG, MNNG), entre outras, os quais vêm sendo utilizadas com sucesso na obtenção de mutantes vegetais tolerantes a estresses bióticos (ADU-AMPOMAH et al., 1996; BHAGWAT, 1998; JANSEN; SCHAFFRATH, 2009; PATHIRANA, 1992) e abióticos (NAWROT et al., 2001; ZHU, 2003; SALEEM et al., 2005; TSYGANOV et al., 2007; LANG; BUU, 2008; KUMAR et al., 2010; KOCH et al., 2010). Assim, temos que a mutagênese é uma ferramenta muito importante para gerar plantas com alterações gênicas que permitam entender melhor o processo de tolerância e sensibilidade a diversos tipos de estresses.

Embora ambos os tipos de estresses possuam impacto relevante sobre o desenvolvimento das plantas, observamos um aumento crescente de estudos envolvendo estresses abióticos causados por metais pesados, como por exemplo, o alumínio, chumbo, cádmio (Cd), entre outros, os quais estão associados aos problemas crescentes de contaminação de solos em escala global (FORNAZIER et al., 2002; GOMES-JUNIOR et al., 2006; GRATÃO et al., 2008b). Além disso, pouco ainda se conhece sobre o impacto real dos metais em plantas cultivadas, sendo também poucas as alternativas para descontaminação de solos.

Uma das principais abordagens para entender as respostas das plantas aos metais pesados é uso de mutações com alterações na sensibilidade ou na tolerância a estes. Alguns trabalhos de mutagênese têm mostrado sucesso na de obtenção de mutantes de *A. thaliana* supersensíveis ao Cd, por meio dos quais foi possível entender melhor o papel de fitoquelatina sintase (HA et al., 1999; HOWDEN et al.; 1995) e γ-glutamilcisteína sintase (COBBETT et al., 1998), na detoxificação deste metal. Porém, trabalhos de mutagênese visando a obtenção de plantas tolerantes a metais pesados ainda são raros, sendo a maior parte deles voltada para a tolerância ao alumínio em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (GABRIELSON et al., 2006) ou em plantas cultivadas de grande importância econômica como trigo (TULMANN-NETO et al., 2001) e cevada (NAWROT et al., 2001), ou ainda em casos pontuais como, por exemplo, a obtenção de plantas de ervilha tolerantes ao Cd (TSYGANOV et al., 2007).

Dentre os entraves para obtenção de plantas tolerantes a metais pesados está a própria metodologia de seleção destes indivíduos. Os principais problemas encontrados são referentes à dificuldade de avaliar um grande número de plantas, em condições homogêneas e gerando poucos resíduos para o ambiente. Uma das formas clássicas de proceder a seleção de plantas tolerantes seria utilizar áreas contaminadas com metais para o cultivo e avaliação das plantas. Porém, neste caso, não é possível garantir nem a homogeneidade de distribuição e nem a quantidade do metal para o qual se pretende selecionar mutantes tolerantes. Outra possibilidade seria contaminar solo ou areia, cultivando as plantas em casa de vegetação, em condições controladas. Por outro lado, os trabalhos de mutagênese demandam a avaliação de elevada quantidade de indivíduos, tornando esta opção pouco viável. Além disso, existe o fator adicional da grande quantidade de resíduos gerados, pois estes solos provavelmente não serão descontaminados, sendo necessária uma estrutura apropriada para dar o destino adequado a este material.

Uma alternativa para o cultivo de plantas em solos, areia ou substratos é o cultivo em solução nutritiva. Assim, a chamada hidroponia vem sendo utilizada com sucesso em escala comercial para a produção de diversas culturas, proporcionando condições de cultivo altamente homogêneas e controladas. Existem vários estudos com metais pesados, usando o sistema de hidroponia para avaliação de respostas tais como acúmulo do metal nos tecidos (PEREIRA et al., 2002; FOURCAUD et al., 2008; ZHANG et al., 2009), respostas de enzimas ligadas ao sistema antioxidante (FERREIRA et al., 2002; LÓPEZ-MILLÀN et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009), interações com macronutrientes (GONÇALVES et al. 2009) e efeitos de toxidade nas plantas (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009). Além disso, o cultivo em sistema hidropônico possui a vantagem de gerar menos resíduos, pois é possível deixar a solução nutritiva contaminada evaporar, reduzindo a quantidade final de contaminantes a poucos miligramas. Por esses motivos, alguns autores têm proposto diferentes metodologias para seleção de plantas de cevada (HOSSAIN et al., 2005; MA et al., 1997; TAMÁS et al., 2006) e milho (GIAVENO; MIRANDA FILHO, 2000) tolerantes a alumínio, utilizando o cultivo em solução nutritiva. Tais sistemas de seleção podem servir como modelo de metodologia para seleção de novos mutantes com alterações nas respostas a metais pesados em diferentes culturas.

Neste trabalho, fizemos a seleção de mutantes tolerantes ao Cd, no qual também propomos uma metodologia de seleção e avaliação de tomateiros tolerantes a metais pesados, sendo que tal sistema possui a vantagem de unir os benefícios do cultivo de plantas em solução nutritiva, com a necessidade de avaliação de grandes quantidades de indivíduos sob condições de estresse causado por metais. Para tanto, utilizamos plantas da cv Micro-Tom de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), a qual tem sido muito usada como planta modelo (MEISSNER et al., 1997) para diversos estudos em genética (LIMA et al., 2004; BUTELLI et al., 2008; PINO et al., 2010), fisiologia (CARVALHO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2011), bioquímica de plantas (GRATÃO et al., 2008a; GRATÃO et al., 2008b) e para estudos de alterações ultra-estruturais (GRATÃO et al., 2009; VITÓRIA et al., 2003). Esta cultivar de tomateiro possui diversas vantagens, tais como porte reduzido (perto de 15 cm) e ciclo de vida curto (80 a 90 dias da semeadura até a colheita), tornando-a um modelo muito adequado para trabalhos com mutagênese visando a seleção de novos mutantes (PINO-NUNES et al., 2009; MATSUKURA et al., 2007; WATANABE et al.; 2007). Consideramos esta metodologia aqui proposta, rápida e eficaz, devido ao fato de a seleção ser realizada em estágio de plântula, poucos dias após a germinação, o que permite avaliar muitos indivíduos por 10 m².

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Mutagênese

O etanosulfonato de metila (EMS) é um agente mutagênico químico, cuja ação no DNA dos organismos é menos agressiva, porém mais eficiente, em relação a outras metodologias. O EMS troca bases nitrogenadas G/C por A/T, podendo alterar os códons dos genes, consequentemente alterando o quadro de leitura e a proteína formada. Este agente químico chega a proporcionar o aparecimento de até 5% de mutantes em uma população M2. Por esse motivo, a maior parte das sementes disponíveis foi mutagenizada usando EMS, totalizando 11.500 sementes M1.

A metodologia para mutagênese com EMS da cv MT já está bem estabelecida, sendo adotada a dose de 0,5% EMS para todas as sementes, segundo protocolo adaptado por Pino-Nunes et al. (2009). Esta dose é que proporciona grande taxa de mutação sem reduzir muito a fertilidade e a germinação de sementes. O processo completo segue como descrito a seguir.

As sementes da cv MT passaram por um pré-tratamento em água destilada por 24 horas. Após este período, as sementes foram submetidas ao tratamento em solução com EMS (Sigma-Aldrich®) a 0,5% em volume por mais 12h, em temperatura ambiente (26 ± 2 ºC), dentro de uma capela, em erlenmeyer de 1L sob agitação (figura 1A). Juntamente com este, foram colocadas mais 80 sementes da cv MT tratadas somente com água, para serem usadas como controle em análises posteriores.

Uma das maiores dificuldades nesta etapa foi realizar o plantio das 11.500 sementes mutagenizadas, sendo que havia restrições quanto ao espaço, estrutura e mão-de-obra disponíveis para esse trabalho. Por esse motivo, o Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas firmou uma parceria com a empresa Syngenta Seeds, para utilização da área de sua estação experimental em Itatiba-SP. Nesta estação, a empresa já dispunha de toda estrutura necessária para o cultivo de tomates, facilitando a adaptação para o cultivo da cv MT. Com isso, imediatamente após o tratamento com EMS, as sementes foram levadas para esta área experimental da Syngenta em Itatiba-SP.

Para esta semeadura havia o problema de as sementes estarem molhadas devido ao tratamento que estas haviam acabado de receber. Por este motivo, foi aplicado amido de milho sobre as sementes, para secá-las superficialmente (figura 1B). O amido de milho é inerte para a semente, não prejudicando a germinação nem o desenvolvimento inicial das

plântulas. Todas estas sementes foram semeadas em bandejas de germinação de isopor (200 células/bandeja), em substrato de fibra de coco (figura 1C).

Da quantia inicial de 11.500 sementes, somente 7.820 germinaram e foram transplantadas. Após 30 dias da semeadura, as plântulas foram levadas para o campo e transplantadas em canteiros cobertos por mulching plástico, em espaçamento de 10 cm entre plantas e 20 centímetros entre fileiras, sob irrigação por gotejamento (figura 1D). No campo, as plantas cresceram, floresceram e frutificaram, iniciando-se a colheita 60 dias após o transplante (figura 1E). Toda a colheita foi feita manualmente, retirando a planta toda do campo devido à dificuldade da retirada dos frutos, que eram muito pequenos. Como o número de plantas era muito elevado, estas foram colhidas em lotes de 12 plantas em sacos plásticos e levadas para a retida dos frutos no galpão da empresa (figura 1F).

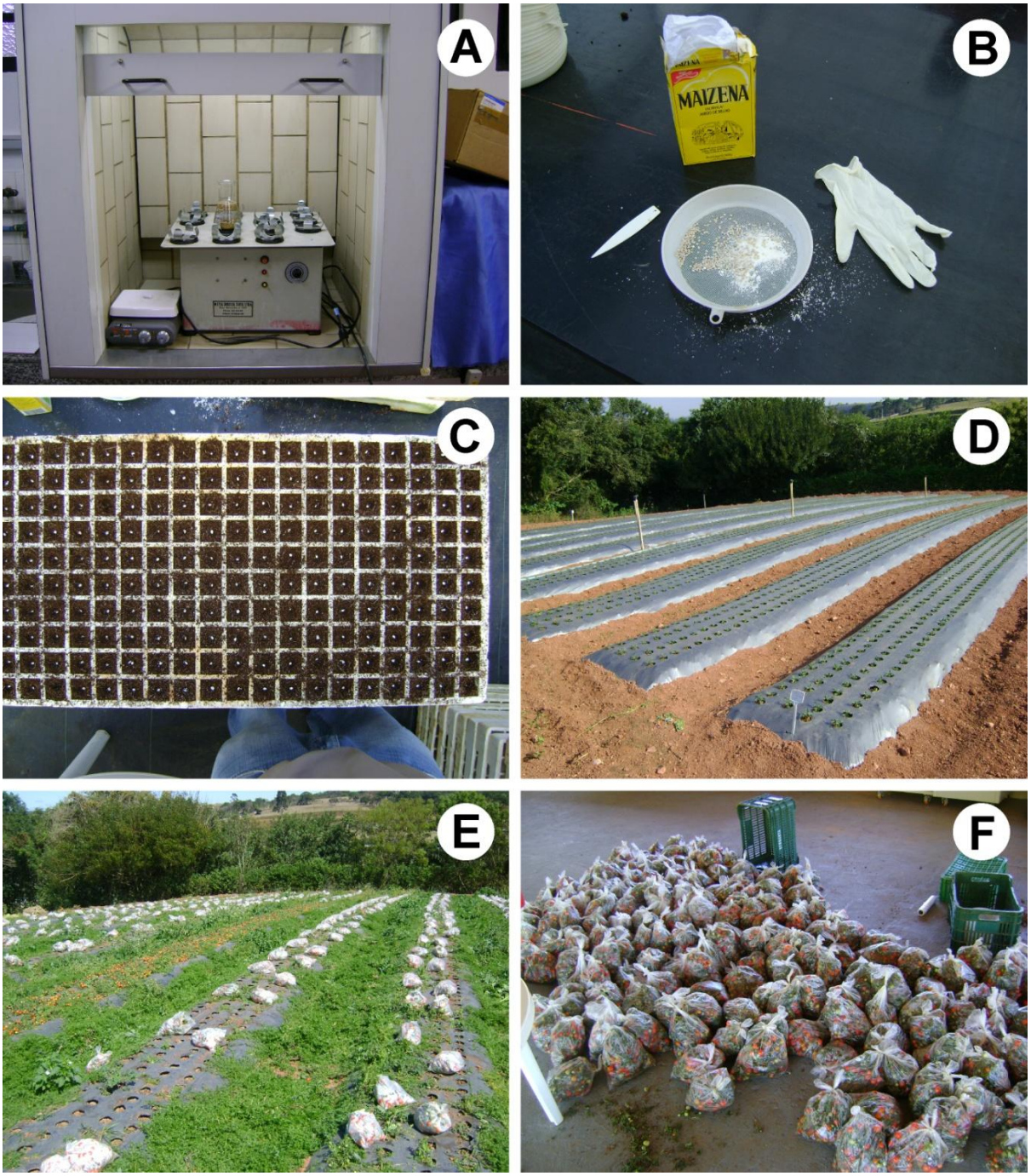

Figura 1 - Mutagênese em tomateiro. A) tratamento das sementes com EMS a 0,5%; B) preparo das sementes para a semeadura usando amido de milho para retirar o excesso de umidade; C) semeadura das sementes em substrato composto por fibra de côco; D) mudas transplantadas em canteiros no campo; E) colheita das plantas em lotes de 12 indivíduos em cada saquinho; F) plantas armazenadas em galpão

Terminada a colheita, os frutos foram separados das plantas e colocados em saquinhos separados contendo cada lote, cuja soma totalizou 350 kg frutos (figura 2A), os quais posteriormente passaram por uma lavagem inicial para retirar o excesso de material vegetal, terra e outros resíduos. A retirada das sementes foi feita por maceração manual dos frutos e retirada da polpa destas (figura 2B). Feita a extração das sementes, estas foram colocadas em pequenas bolsas de nylon (figura 2C) e colocadas em solução de pectinase (2 mL/L) por 6 horas para retirada do excesso de mucilagem.

Depois desse período, as sementes foram lavadas em água e colocadas por 10 minutos em solução de hipoclorito (solução comercial de 10%) na concentração de 10 mL/L. As sementes foram então colocadas em no secador com ventilação forçada, a 30 ºC por 24h (figura 2D) e depois colocadas em envelope de papel (figura 2E).

No total foram transplantados no campo 7.820 indivíduos da geração M1, dos quais perto de 6.180 mostraram-se férteis, sendo que estes compuseram 503 lotes de sementes M2, oriundos de 12 plantas cada um (figura 2F).

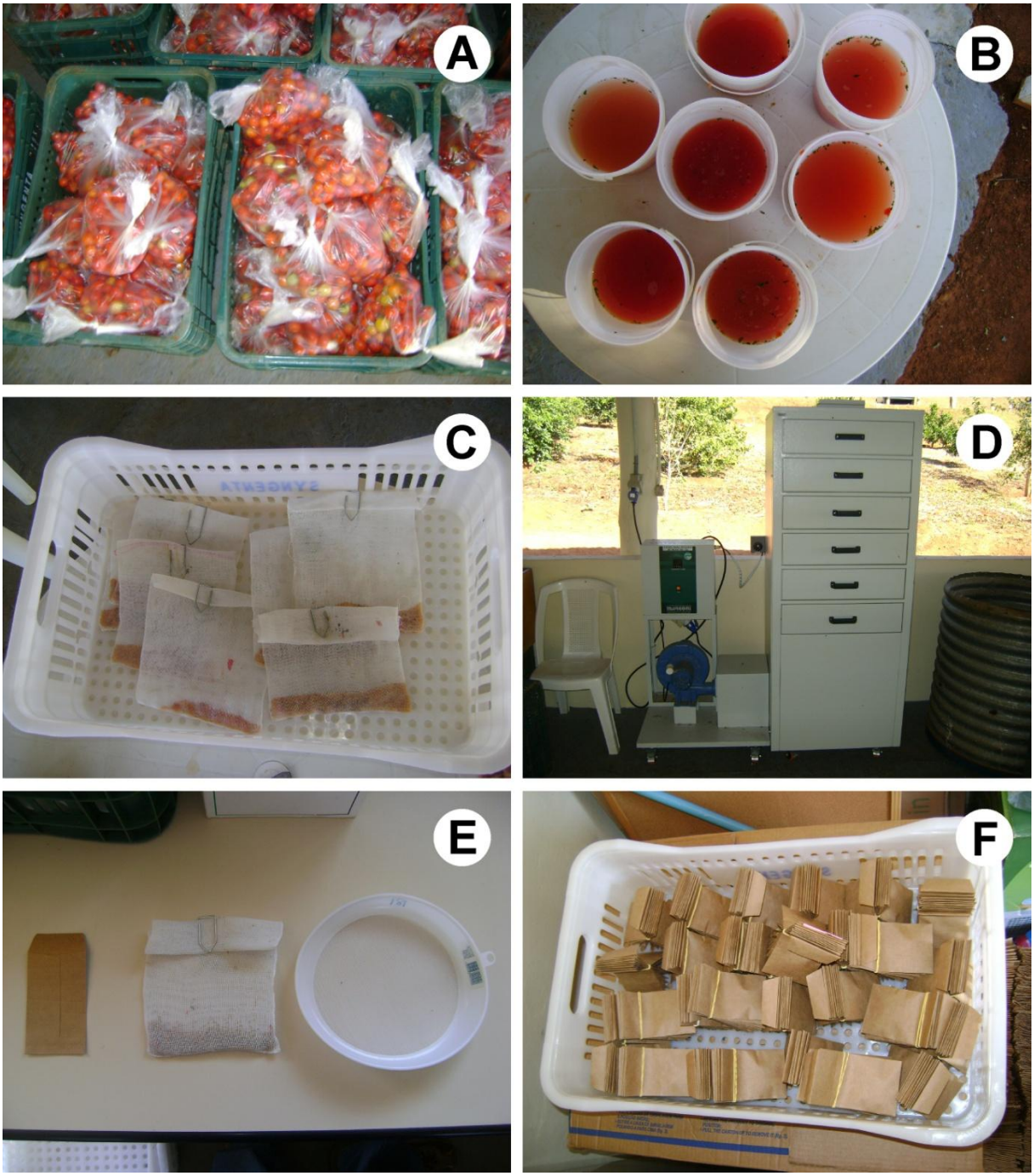

Figura 2 - Mutagênese em tomateiro. A) lotes com frutos de 12 plantas cada um; B) retirada das sementes dos frutos, por meio de esmagamento manual em recipientes com água; C) sementes de cada lote em bolsas de nylon, sendo preparadas para o tratamento com pectinase e hipoclorito de sódio; D) secagem das sementes com ventilação forçada, a 30 ºC por 24h; E) sementes secas e prontas para armazenamento; F) sementes oriundas de 12 plantas, armazenadas em saquinhos de papel, totalizando 503 lotes

2.2.2 Desenvolvimento do sistema para seleção das plantas tolerantes ao Cádmio

Uma das partes mais difíceis deste trabalho foi a seleção das plantas tolerantes ao Cádmio. Para efetuar uma seleção com sucesso foi necessário considerar vários fatores, tais como a idade das plantas, meio para o crescimento com o metal, nutrição, época de avaliação, caracteres usados como parâmetro de avaliação, entre outras. A maior dificuldade, de forma geral, consistiu na necessidade de utilizarmos um número muito elevado de plantas da geração M2, o qual chegou a 10.000 plantas nesta primeira etapa. Para esse propósito, inicialmente foram testadas várias alternativas para o crescimento das plantas, tal como será descrito a seguir.

2.2.2.1 Avaliação das plantas em areia: grande parte dos trabalhos com Cádmio tem usado a areia para o crescimento das plantas, devido ao fato de este ser um substrato com pouca ou nenhuma interação com esse metal. Alguns testes iniciais foram realizados, obtendo-se bons resultados das plantas no aparecimento dos sintomas por toxidez ao Cádmio. Porém, foram identificados dois problemas que inviabilizaram a realização da seleção dos tolerantes em areia. O primeiro deles é relativo à dificuldade operacional do transplante de 10.000 plantas na areia, além da dificuldade em garantir as mesmas condições de distribuição de água, nutrientes e do próprio metal neste substrato. O segundo problema está relacionado com a quantidade de resíduo que seria gerado, pois não seria possível descontaminar o total de aproximadamente 500 kg de areia que seriam utilizados no experimento.

2.2.2.2 Avaliação das plantas em meio de cultura: Uma das formas de selecionar plantas tolerantes ao Cádmio seria germinar as sementes as sementes em meio de cultura com Agar, sais, vitaminas e o próprio metal. Alguns testes foram feitos para verificar a viabilidade da utilização deste método, usando o meio de Murashige e Skoog (1962). No entanto, embora a germinação tenha sido satisfatória neste sistema de cultivo, foi observado o problema de tombamento das plantas logo a após a germinação, levando a grande perda de indivíduos. Outro problema identificado no cultivo em meio de cultura foi a dificuldade no controle das contaminações do meio por microrganismos. Mesmo trabalhando em condições assépticas, ocorreram contaminações em 5-10% dos meios usados, o que poderia levar a perda de plantas tolerantes antes mesmo de sua identificação.

2.2.2.4 Avaliação das plantas em hidroponia: O cultivo em hidroponia vem sendo utilizado em diversas culturas, especialmente para as hortaliças. Este sistema permite grande uniformidade das condições de nutrição das plantas, facilitando também a adição de metais na solução nutritiva. Assim, realizamos alguns testes iniciais com o cultivo da cv MT em hidroponia, usando solução de Hoagland e Arnon (1950), com algumas adaptações para tomateiros. Diversas variáveis tiveram que ser ajustadas, tais como tamanho adequado das plantas para o transplante em hidroponia, concentrações dos sais a ser utilizada, pH adequado para maior disponibilidade do metal em estudo e toda estrutura necessária para oxigenação da solução e suporte físico para as plantas.

Depois de vários experimentos preliminares, observamos que para o cultivo em hidroponia era necessário fazer com que as plantas passassem por uma pré-adaptação à solução nutritiva, cultivando as plantas em 10% da concentração total de sais de Hoagland e Arnon (1950). Após um período de 7 dias, as podiam ser transplantadas para solução com 25% de Hoagland e Arnon, sem que estar sofressem estresse pela concentração de sais. Todas as avaliações foram feitas usando a solução de Hoagland e Arnon a 25% de sua concentração original. Para possibilitar o cultivo de um número de elevado de plantas, optamos por fazer a seleção em plântulas com 30 dias de cultivo, estágio o qual os tomateiros possuem de 3 a 4 folhas jovens. Com isso, foi possível adensar as plantas sem prejudicar o desenvolvimento dentro do período escolhido para a seleção.

Uma vez ajustados o sistema de cultivo, a concentração de sais na solução e o estágio de avaliação, foi necessário escolher a dose de Cádmio para a seleção. Para isso, foi realizado um experimento com doses crescentes de $CdCl_2$ (0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200 µM $CdCl_2$), através do qual foi escolhida a dose de Cádmio para este trabalho (figura 3). O critério adotado foi selecionar a dose que reduzisse em 50% o crescimento das plantas nesta fase, mostrando sintomas de toxidez (clorose nas folhas jovens) em até 10 dias de exposição ao Cd na solução nutritiva. O pH de todos os ensaios foi ajustado para 6,0 ± 0,2.

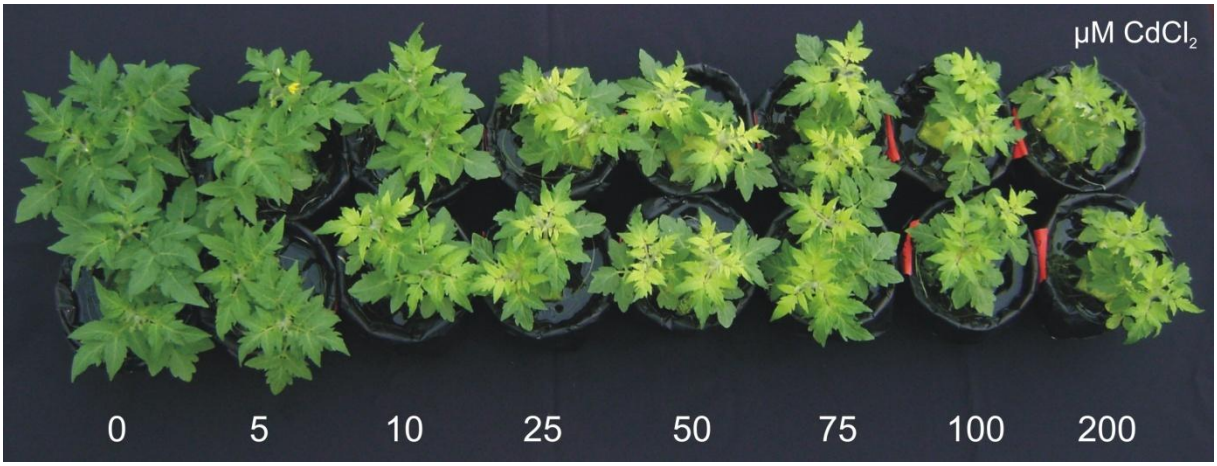

Figura 3 - Curva de dose-resposta para toxidez por Cd de plantas de tomateiro sob cultivo em hidroponia. Escolha da dose através da avaliação dos sintomas de clorose nas folhas jovens e redução geral no crescimento

Por meio deste experimento foi possível observar que mesmo a menor dose que foi de 5 µM de $CdCl_2$ foi capaz de afetar o desenvolvimento das plantas. Já as doses mais elevadas de 100 e 200 µM de $CdCl_2$ causaram muita toxidez nas plantas, não sendo adequadas para o uso no trabalho. A dose de Cd que apresentou os melhores resultados foi a de 25 µM de $CdCl_2$, a qual mostrou sintomas visuais bastante claros em 10 dias, sendo que tais sintomas começaram a aparecer com 4 dias de exposição ao metal. As plantas deste experimento foram deixadas para crescer nestas concentrações de Cd por mais 20 dias (até o início do florescimento), período no qual observamos que a dose de 25 µM de $CdCl_2$ também foi aquele que reduziu em 55,13% o crescimento das plantas, sendo próxima de 50% de redução que era o valor desejado. Finalmente, esta concentração de Cádmio foi escolhida para selecionar as plantas tolerantes.

2.2.3 Germinação e transplante

A semeadura das progênies M2 foi feitas nas próprias bandejas, onde cada uma recebeu 2 lotes vindos de 12 progênies M2, totalizando 300 sementes ao todo (figura 5A). Como já era esperado, perto de 50 a 100 sementes destas 300 não germinaram ou foram inviáveis, sendo assim transplantadas entre 200 e 250 plantas em cada bandeja de hidroponia. O substrato usado para a germinação foi composto de vermiculita e Basaplant® na proporção de 1:1. As plantas foram irrigadas diariamente de forma manual e permaneceram neste substrato por 15 dias, quando então foram transferidas para a hidroponia, passando

inicialmente pelo processo de adaptação aos sais da solução nutritiva, conforme descrito anteriormente.

2.2.4 Estrutura de cultivo para a seleção de tolerantes

Como este trabalho não apresenta precedente, foi necessário desenvolver uma metodologia de cultivo em grande escala, a qual tornasse viável seleção a avaliação de aproximadamente 10.000 plantas de uma só vez. Quanto mais plantas M2 fossem avaliadas, maiores seriam as chances de obtermos uma planta tolerante já na primeira rodada de seleção. Neste ponto surgiu mais um problema que era relativo à dificuldade de colocar 10.000 sob cultivo em hidroponia. Depois de alguns testes usando espuma fenólica, placas de isopor colocar com espumas e espumas de baixa densidade para dar suporte às plantas, encontramos um material alternativo que nos pareceu adequado para este propósito. Tal material era constituído de polietileno expandido com 4 mm de espessura, adicionado de uma folha de papel alumínio em uma das faces.

Este material feito de polietileno expandido possuía a espessura adequada para dar suporte às plantas sem danificá-las, além de flutuar muito bem, o que o tornou muito adequado para o sistema de hidroponia. A folha de alumínio aderida a um dos lados foi usada com sucesso para o propósito de evitar a passagem de luz para as raízes. Essa manta de polietileno expandido podia também ser facilmente cortada e moldada para qualquer recipiente, podendo-se fazer pequenos cortes em seus bordos, o quais servem para dar suporte ao caule das plântulas desde que estes tenham diâmetro de até 5 mm, como demonstrado na figura 4. Com isso, o cultivo das plantas pôde ser feito em bandejas de plástico cobertas por sacos pretos para evitar a entrada de luz. Por fim, a oxigenação da solução nutritiva foi feita usando um compressor de ar adaptado ao um sistema de tubulação de PVC, do qual derivavam mangueiras de plástico com pedras porosas nas pontas. Essas pedras de uso comuns em aquários foram usadas para reduzir o tamanho das bolhas de ar e aumentar a quantidade destas na solução (figura 5B).

Para melhor aproveitamento do espaço, a manta de polietileno expandido foi cortada em pedaços de 350 x 50 mm (comprimento e largura), fazendo-se pequenos cortes de 15 mm em ambas as laterais, espaçados em 25 mm entre si, os quais foram usados para dar suporte às plântulas. Cada pedaço deste material tinha capacidade para receber 24 plântulas, totalizando 264 indivíduos por bandeja, dos quais 24 foram usados para dar suporte aos controles não mutantes e 240 usados para colocar as plantas M2 vindas da mutagênese. Para o transplante,

as raízes foram cuidadosamente lavadas e cada plântula foi acondicionada na manta de polietileno expandido

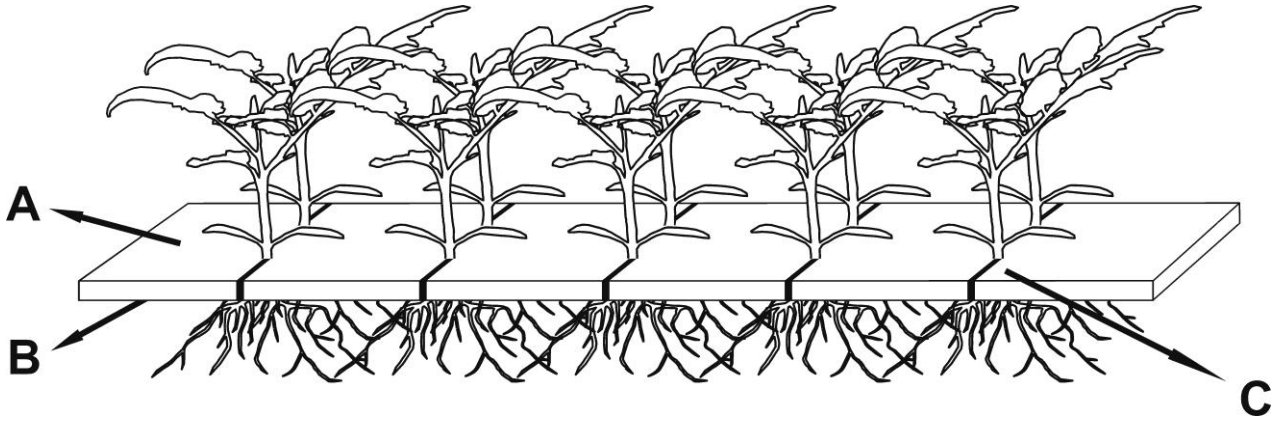

Figura 4 - Sistema de suporte flutuante de polietileno expandido para cultivo de plântulas em solução nutritiva. Este material pode ser cortado em vários formatos conforme o recipiente a ser utilizado. Em geral, uma manta de polietileno expandido com 4 mm espessura é suficiente para dar suporte e manter a flutuação do sistema. A) face superior de cor clara e fosca. O uso de materiais muito brilhantes pode gerar estresse por excesso de luz; B) face inferior aluminizada impedindo a passagem de luz; e C) pequenos cortes nas laterais usados para dar suporte às plântulas, mantendo as raízes no escuro em contato com a solução, possibilitando o livre desenvolvimento da parte aérea

2.2.5 Mutações marcadoras

A montagem dos lotes contendo progênies de 12 plantas M1 seguiu o planejamento relativo ao número de plantas que seriam avaliadas em M2. Considerando que foram semeadas 150 sementes M2 de cada lote, sendo que estas representam a progênie de 12 plantas M2, teríamos uma amostra de 12,5 sementes por planta. Supondo que tenha ocorrido uma mutação recessiva em uma determinada planta da geração M1, esta mutação apareceria em proporções mendelianas de aproximadamente 3 recessivos para cada lote 150 plantas (considerando que haja segregação de 9 dominantes para 3 recessivos em M2, o que é equivalente à proporção de 3:1).

Como já era esperado, foram geradas várias outras mutações as quais apareceram no plantio das sementes M2 para a seleção. Por meio da frequência de aparecimento destas mutações foi possível avaliar se o processo de mutagênese foi feito de forma adequada e se o planejamento para a seleção seguira o modelo esperado. De fato, encontramos vários novos mutantes, os quais apareceram em quantidades de 1, 2 ou 3 plantas cada um deles.

O aparecimento dos mutantes mostrados serviu como referencia para confirmarmos que a mutagênese foi realizada com sucesso, e que o planejamento e dimensionamento do cultivo para a seleção dos tolerantes foram adequados. Assim, o próximo passo foi efetivamente selecionar as plantas potencialmente tolerantes ao Cádmio.

2.2.6 Determinação de proteína de tecidos de folhas e raízes

As concentrações das proteínas solúveis totais nos extratos foram determinadas utilizando-se o BSA (soro albumina bovina) como padrão e utilizando-se do método de Bradford (1976).

2.2.7 Perfil de proteínas (SDS-PAGE)

O perfil proteico de folhas e raízes foi avaliado em gel desnaturante SDS-PAGE, conforme metodologia descrita por (LAEMMLI, 1970).

2.2.8 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos para avaliar o Índice de Tolerância e massa seca e perfil de proteínas, foram realizados em delineamento fatorial inteiramente casualizado. Todos os tratamentos continham 3 repetições compostas de 2 plantas por parcela. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade e erro. Os parâmetros dos modelos, tais como homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos resíduos, foram checados usado o teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Todas as análises foram realisadas usando o software R versão 2.14.2.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Seleção de mutantes tolerantes ao Cádmio

Uma vez que toda a estrutura para o cultivo das plantas em hidroponia estava montada e o planejamento feito, procedemos com o transplante das plantas para a seleção. Cada bandeja recebeu aproximadamente 200 plantas M2 com 15 dias de idade, totalizando pouco

mais de 10.000 plantas avaliadas nesta etapa. As bandejas de crescimento tinham 10 litros de solução de Hoagland e Arnon (1950) cada uma, sendo utilizado o total de 500 litros de solução em cada semana, para as 50 bandejas disponíveis (figura 5D). Devido ao grande porte desta seleção, a semeadura e transplante foram feitos de forma escalonada ao longo de duas semanas, de modo que as aplicações de $CdCl_2$ também seguiram este esquema.

Após uma semana de adaptação no sistema de hidroponia, procedemos com a troca da solução nutritiva e a aplicação de 25 µM de $CdCl_2$ em cada bandeja. Todas as plantas foram acompanhadas pelo período de 10 dias, avaliando-se o aparecimento de sintomas de toxidez ao Cd, que neste caso foi a clorose nas folhas jovens (figura 5D).

Com menos de 10 dias após a aplicação do Cd, já foi possível observar o aparecimento de sintomas nas plantas. Contudo, uma das maiores dificuldades foi realizar a própria seleção das plantas, pois o material oriundo de mutagênese por si já era pouco uniforme e por esse motivo havia muitas plantas menores do que o tamanho adequado para a avaliação. Isto foi um problema porque quanto menor a planta, mais fortes eram os sintomas observados nelas, o que poderia levar à perda de um possível tolerante caso ele fosse uma destas plantas. Para reduzir este viés, separamos as plantas em tamanhos similares para compará-las dentro de um mesmo padrão.

A avaliação diária das mais de 10.000 plantas M2 foi bastante onerosa, pois era necessário olhar com muita atenção cada uma delas. Quando uma planta sem sintomas era identificada, imediatamente ela era marcada com caneta e sua posição na bandeja era esquematiza (figura 5E).

Deste total de pouco mais de 10.000 plantas avaliadas, 28 delas foram selecionadas como potencialmente tolerantes, sendo numeradas como *Cd1* até *Cd28* e transferidas para uma bandeja com maior espaçamento entre elas (figura 5F). Nestas bandejas, as 28 plantas cresceram até gerar frutos e sementes, as quais deram origem à geração M3 ou progênies M3. Das 28 plantas selecionadas, 5 mostraram-se inférteis e não produziram sementes. Assim, no total obtivemos 23 progênies M3 para nova avaliação de tolerância. Porém, a quantidade de sementes produzidas por cada planta foi muito pequena, ficando entre 2 a 36 sementes no total de cada planta. O resumo da quantidade de plantas obtidas em cada etapa da seleção é apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Número de indivíduos obtidos em cada uma das etapas da seleção de mutantes tolerantes ao Cd

Etapas do processo de seleção	**Totais**
Sementes mutagenizadas	11.500
Plantas M1 obtidas	7.820
Plantas M2 férteis	6.180
Lotes contendo sementes de 12 progênies M2	503
Progênies M2 avaliadas	1.200
Total aproximado de indivíduos M2 avaliados	10.000
Plantas M2 selecionadas como potenciais tolerantes	28
Plantas selecionadas e inférteis	5
Progênies M3 avaliadas para confirmação de tolerância	23
Progênies M4 tolerantes selecionadas para avaliação	1
Outros mutantes selecionados	4

Figura 5 - Seleção de mutantes tolerantes ao Cd. A) semeadura e desenvolvimento das plântulas em bandejas contendo substrato; B) transplante para sistema de hidroponia com aeração realizada por meio de mangueiras acopladas a pedrinhas porosas de aquário; C) desenvolvimento de mais de 10.000 plantas M2 no sistema de hidroponia; D) aparecimento de clorose nas folhas devido à aplicação do Cd (25 µM de $CdCl_2$); E) identificação de mutantes com ausência de clorose nas folhas; F) desenvolvimento das plantas selecionadas em solução nutritiva sem a presença de Cd

2.3.2 Avaliação das progênies M3 potencialmente tolerantes

Do total de mutantes selecionados, somente a progênie *Cd23* mostrou-se sensivelmente mais tolerante que as plantas não mutantes. Porém, as plantas M3 desta progênie não apresentaram uniforme quanto à tolerância, pois de um total de 25 indivíduos, 11 mostraram pouco ou nenhum sintoma de toxidez ao Cd e os outros 14 mostraram sintomas leves (figura 6). Uma das explicações possíveis é que a planta C*d23* M2 seria heterozigota para a mutação ou mutações que levaram à tolerância, e por isso a característica estaria segregando, embora não em proporções mendelianas, provavelmente pelo número de 25 plantas ser pequeno. Porém, ainda não sabemos se a tolerância do mutante *Cd23* é decorrente da presença de uma ou mais mutações (monogênica ou poligênica), não sendo possível comprovar essa hipótese no presente momento. Por esse motivo, quando mencionamos a expressão "mutante *Cd23*" estamos nos referindo à planta mutante e não a uma única mutação.

Outra característica identificada é que o mutante *Cd23* não se desenvolve tão bem como a cv MT usada como controle não mutante, o que pode ser obervado na figura 6, na qual fica evidente que as plantas da progênie *Cd23* são menores que o controle, embora apresentem menos sintomas. Isto provavelmente ocorre devido ao escape de outras mutações que ainda não foram eliminados pelo sistema de seleção, fato ainda corriqueiro em todos os procedimentos de mutagênese e seleção (AZEVEDO; ARRUDA, 1995). Por esse motivo futuramente será necessário realizar o processo de "limpeza genética" por meio de retrocruzamentos, para tentar isolar o(s) mutante(s) e eliminar a provável carga genética das plantas.

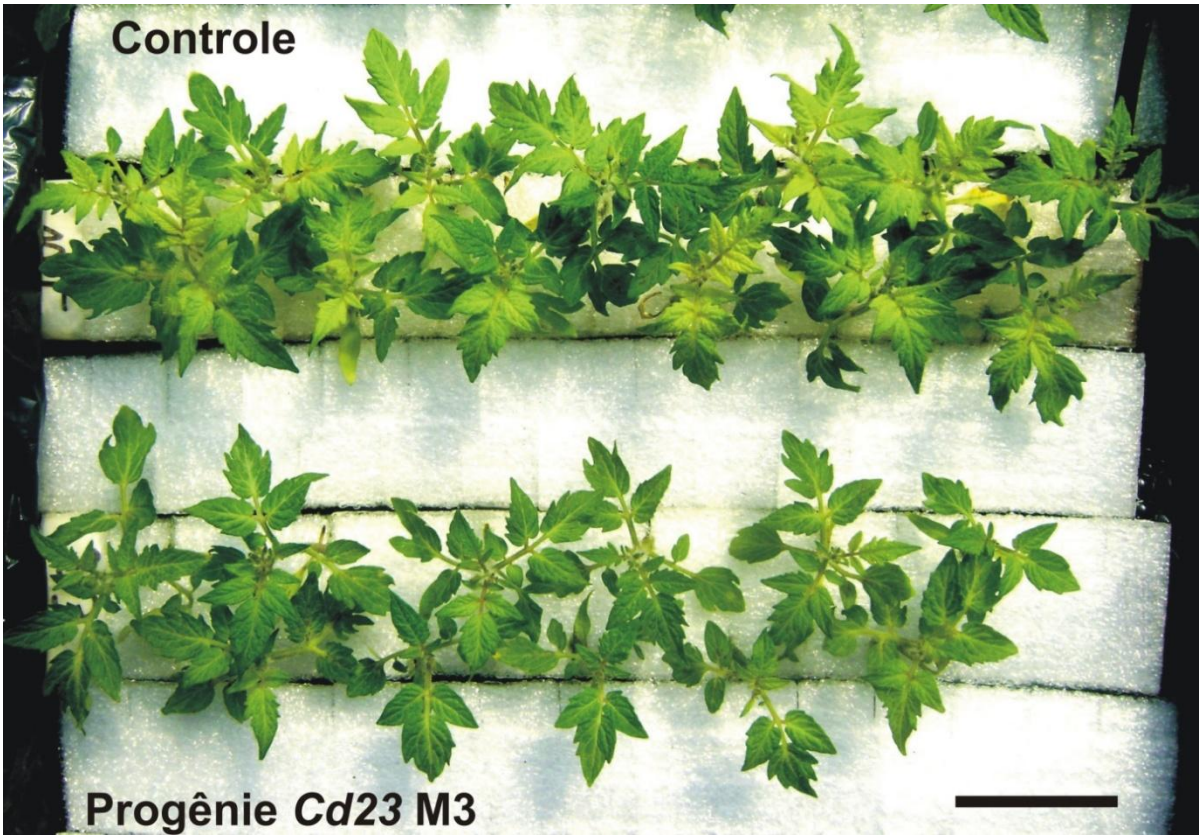

Figura 6 - Plantas da progênie *Cd23* M3 (esquerda) mostrando poucos ou nenhum sintoma de tolerância a 25 µM de $CdCl_2$, comparadas com o controle não mutante apresentando sintomas de clorose nas folhas jovens. Barra = 50 mm

2.3.3 Confirmação de tolerância do mutante *Cd23*

Para a confirmação de tolerância do mutante selecionado, foi montado um novo experimento para avaliar a taxa de crescimento em um período determinado, assumindo que, em última análise, o crescimento seria o principal parâmetro de tolerância considerado.

Foram usadas a progênie *Cd23* M4 e o controle não mutante (cv MT), os quais foram semeados em substrato e transplantados para hidroponia, conforme descrito no item 2.2.3. A única diferença é que desta vez as plantas foram acondicionadas em placas de isopor com o auxílio de pequenos pedaços de espuma. O espaçamento utilizado foi de 60 x 60 mm, sendo consideradas 4 repetições compostas por parcelas de 2 plantas, dispostas em delineamento inteiramente casualizado. Foram coletadas 4 repetições de cada genótipo para estimar a massa seca no tempo inicial (ms_0), a qual foi usada para subtrair do valor final da massa seca de cada tratamento.

As plantas cresceram por 7 dias em solução contendo 0, 25 e 100 µM de $CdCl_2$, sendo então coletadas e desidratadas até massa seca constante, dada em mg/planta. O índice de tolerância para cada dose de Cd foi estimado usando a fórmula:

$$IT = \frac{(ms_{f_i\ Cádmio} - ms_o)}{(ms_{f\ Controle} - ms_o)}$$

Onde:

IT = Índice de Tolerância

$ms_{f_i\ Cádmio}$ = Massa seca final da *i*-ésima planta exposta ao Cd

$ms_{f\ Controle}$ = Massa seca média final das plantas controle

ms_o = Massa seca média inicial das plantas

Os valores de IT podem variar de *0* até *1*, onde *0* indica a máxima sensibilidade e *1* indica a máxima tolerância. Tal índice será discutido no próximo capítulo. Na figura 7A podemos notar que as plantas mutantes crescem naturalmente menos em relação ao controle, apresentando menor massa seca em relação a este na dose 0 µM de $CdCl_2$. Porém, quando *Cd23* e MT são expostos ao Cd é possível observar que há uma tendência de menor redução da massa seca no mutante *Cd23*, quando este é comparado com seu controle e com o controle não mutante (figura 7A). Contudo, as principais diferenças em resposta ao Cd só aparecem quando calculamos o Índice de Tolerância para cada genótipo exposto às diferentes doses deste metal, onde fica mais evidente que o mutante *Cd23* leva uma pequena vantagem sobre a cv MT não mutante (figura 7B).

Em ambas as doses de Cd (25 e 100 µM de $CdCl_2$), o mutante *Cd23* apresentou IT significativamente maior que o controle não mutante (figura 7B). Isso aconteceu porque este índice leva em consideração a taxa de crescimento *per se* de cada genótipo, e como foi mostrado na figura 7A, o mutante *Cd23* embora cresça menos que o controle, é menos afetado pelo Cd, apresentando menor redução relativa em seu crescimento. Com base nisso, podemos classifica-lo como sendo um mutante mais tolerante ao Cd.

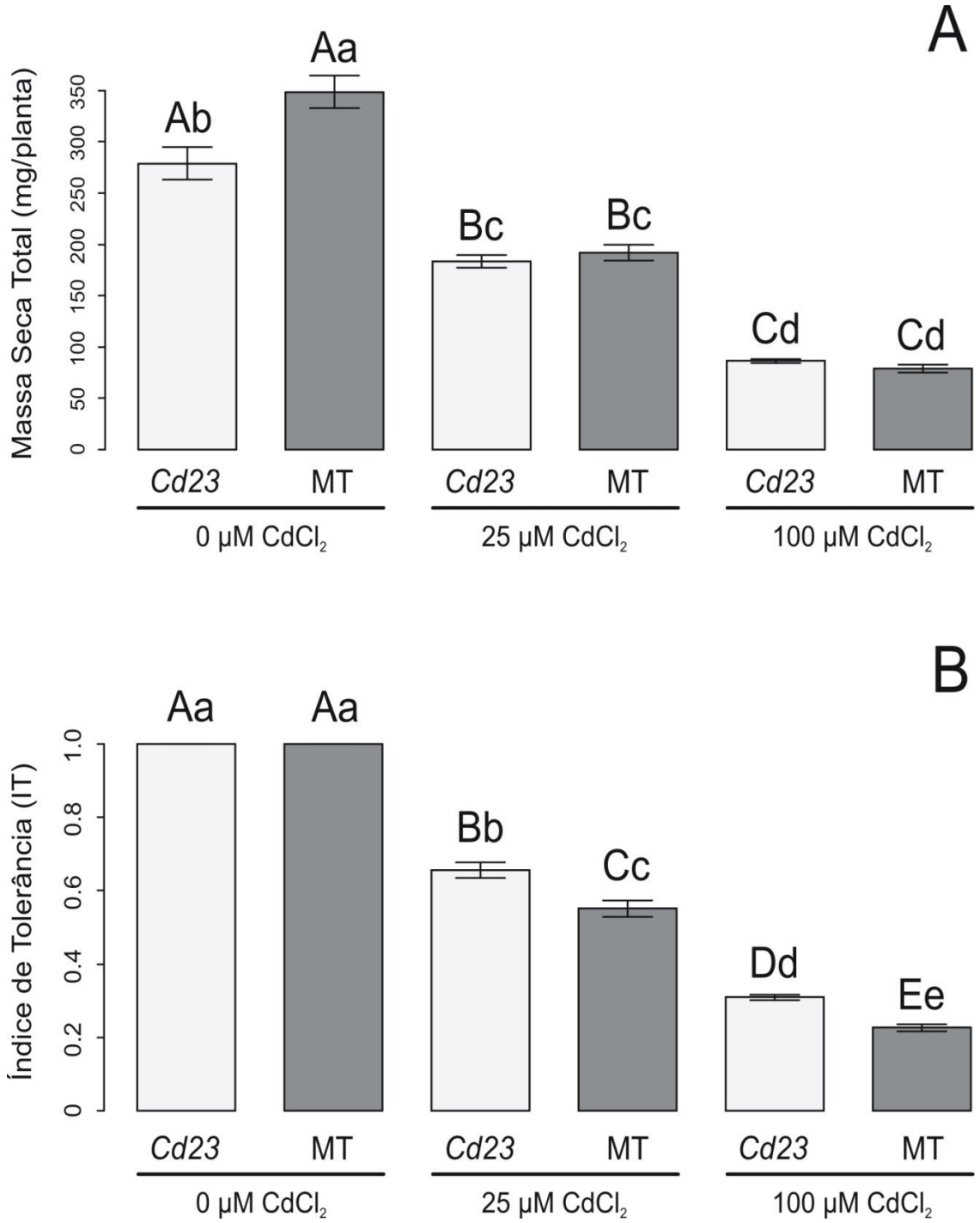

Figura 7 - Acúmulo de massa seca e IT da cv MT e do mutante *Cd23*. A) redução na massa seca do mutante *Cd23* e da cv MT em relação a doses crescentes de $CdCl_2$. Nota-se que a massa seca de *Cd23* é significativamente menor que a da cv MT, na ausência de Cd; B) Índice de Tolerância de *Cd23* e MT para as diferentes doses de Cd, evidenciando melhor desempenho do mutante em presença deste metal. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

2.3.4 A tolerância do mutante *Cd23*

Uma vez que obtivemos um mutante de tomateiro com resposta diferenciada ao Cd, precisamos agora que entender o que torna essas plantas mais tolerantes. Várias abordagens poderiam ser usadas, mas nesse primeiro momento vamos avaliar de forma geral as alterações no metabolismo das plantas, por meio do estudo do perfil proteico de folhas e raízes do mutante *Cd23* e do controle não mutante (cv MT), na ausência e presença de Cd. Supondo a hipótese de que foi gerada carga genética nas plantas mutantes, estudos em nível molecular e bioquímico mais aprofundados só seriam justificados após o processo de "limpeza genética" por meio de retrocruzamentos, o qual está em andamento. Contudo, as alterações de maior magnitude em nível de expressão gênica e/ou ativação e inativação de genes, seja devido à presença de carga genética ou alterações decorrentes da própria tolerância, podem ser observadas por meio da alteração na quantidade e qualidade de proteínas de ambos os genótipos estudados (MT e *Cd23*).

2.3.5 Perfil de proteínas (SDS-PAGE)

Conforme exposto acima, a desuniformidade no desenvolvimento das plantas mutantes *Cd23* seria devida à presença de carga genética, o que pode prejudicar a avaliação precisa do impacto real desta(s) mutação(ões) sobre a tolerância das plantas. Para verificar essa hipótese e avaliar as diferenças de maior magnitude, fizemos uma avaliação do perfil proteico de folhas e raízes do mutante *Cd23* e do controle MT, ambos expostos às doses de 25 µM de $CdCl_2$, considerando que esta dose proporciona perto de 50% de redução no crescimento das plantas (figura 7A).

Na figura 8 é possível observar claramente várias alterações no perfil de proteínas entre a cv MT e o mutante *Cd23*, tanto em folhas como em raízes. As principais variações são relativas à variações na expressão de algumas proteínas no mutante *Cd23* e na cv MT. No entanto, podemos notar que existem algumas diferenças qualitativas entre as próprias proteínas, principalmente me folhas do *Cd23*, onde aparece pelo menos uma nova banda no mutante *Cd23*, a qual não existe na cv MT. Outro resultado interessante é em relação ao perfil proteico nas raízes. No caso do mutante *Cd23* notamos que a distribuição de proteínas de raízes ao longo do gel aparece "borradas". Este padrão geralmente é encontrado em tecidos sob estresse por metal, podendo ser causado pela degradação de parte das proteínas da amostra, pelo própria presença do metal. Assim, para realizar mais aprofundados sobre os

mecanismos de tolerância do mutante *Cd23* será necessário realizar o processo de "limpeza genética" neste mutante, para isolar o efeito alteração genética responsável pelo aumento de tolerância ao Cd nessas plantas de tomateiro.

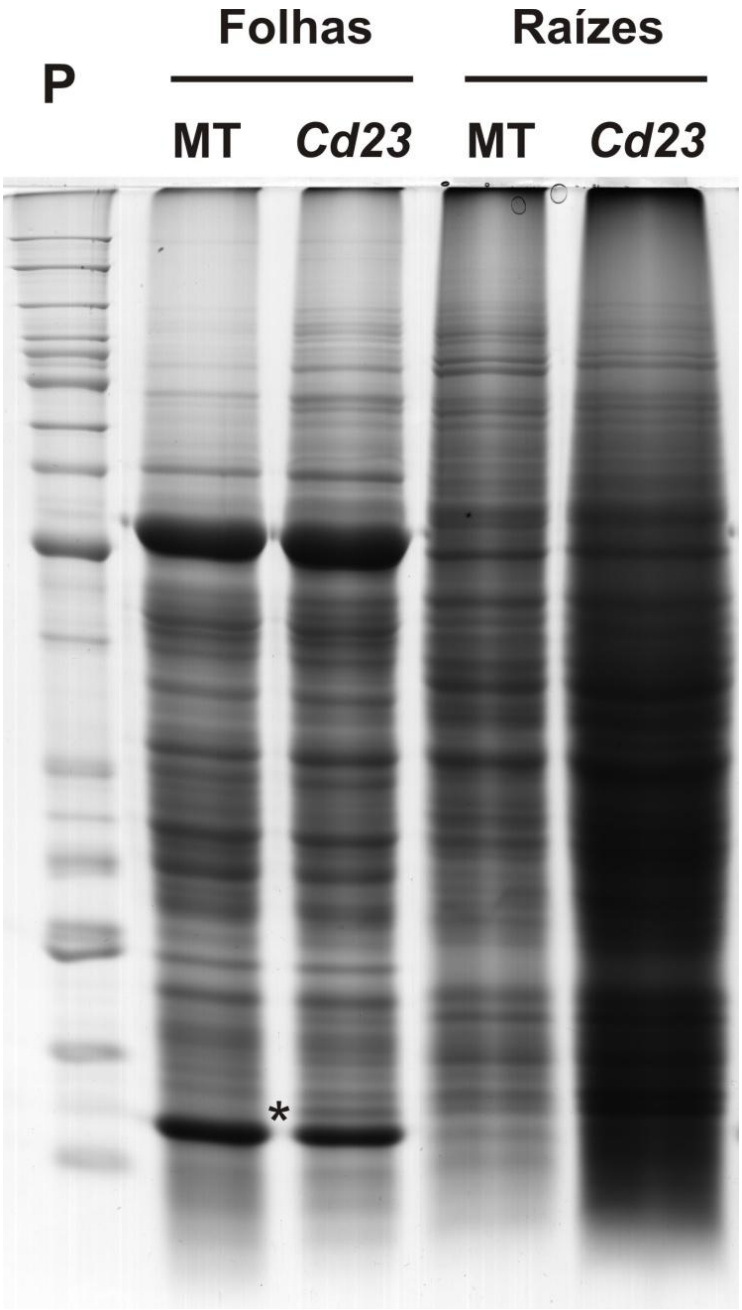

Figura 8 - Perfil proteico de folhas e raízes do mutante *Cd23* e cv MT, em SDS-PAGE (P = Padrão), cujas plantas foram expostas a 25 µM de $CdCl_2$ por 7 dias. É possível observar várias diferenças no padrão de proteínas de folhas e raízes entre *Cd23* e MT, sendo as principais delas relativas à mudança de intensidade nas bandas. Contudo, podemos também encontrar diferenças entre os próprios tipos de proteínas encontrados entre *Cd23* e MT. * Indução de nova banda

2.4 Considerações Finais

A metodologia usada neste trabalho para seleção de mutantes com respostas diferenciadas a metais pesados, foi eficiente para selecionar um mutante de tomateiro tolerante ao Cd, o qual chamamos de *Cd23*. O mutante *Cd23* apresentou grande variação na taxa de crescimento, provavelmente devido à segregação dos demais genes afetados pelo processo de mutagênese, os quais compõem a carga genética deste mutante. Algumas das alterações em nível de proteínas, causadas pelo processo de mutagênese, puderam ser observadas pelo estudo do perfil proteico do mutante *Cd23* e da cv MT. Esta avaliação mostrou a ocorrência de diversas alterações tanto na quantidade quanto na qualidade das proteínas de *Cd23* e MT, o que ajuda a explicar a magnitude das diferenças de desenvolvimento observadas, além de comprovar a própria ocorrência de mutações no DNA do mutante selecionado. Embora o mutante *Cd23* naturalmente se desenvolva menos que o controle não mutante na ausência de Cd, o IT mostrou que *Cd23* possui um grau de tolerância significativamente maior que a cv MT, quando ambos são expostos a diferentes doses de Cd.

Com relação à metodologia desenvolvida para a seleção de mutantes em sistema de hidroponia, consideramos que esta foi eficiente para cultivar um grande número de plantas por unidade de área. Porém, este método de seleção só permite o cultivo e seleção de plantas em larga escala desde que estas sejas realizadas nas fases iniciais do crescimento de cada espécie. Assim, este sistema pode ser usado com eficiência para o cultivo e seleção de plântulas tolerantes a outros metais pesados em diversas espécies, cujas plântulas possam ser fixadas na manta de polietileno expandido. Para tanto, é necessário considerar 1) a solução nutritiva e pH adequados para o crescimento de cada espécie; 2) o espaçamento em que as plântulas serão cultivadas; 3) a dose do metal pesado que causa sintomas nas plântulas em determinado estágio de avaliação; 4) os sintomas característicos de toxidez para cada metal em relação à espécie a ser estudada, bem como 5) o tempo de exposição para que estes sintomas apareçam. Além disso, este é um sistema que minimiza a quantidade de resíduos gerados, bastando deixar a solução nutritiva secar para coletar o residual de metais e sais precipitados.

Finalmente, podemos concluir que o sistema de cultivo e seleção utilizado neste trabalho, foi satisfatório para identificar e selecionar plantas de tomateiro tolerantes ao Cd. Porém, a elevada carga genética gerada no mutante selecionado fez com que as plantas se mostrassem bastante desuniformes nos experimentos realizados, impossibilitando uma conclusão definitiva sobre o grau de tolerância do mutante *Cd23*. Tal estudo só poderá ser

concluído após o processo de isolamento desta mutação (ou mutações), por meio de retrocruzamentos com as plantas não mutantes da mesma cultivar (cv MT).

Referências

ADU-AMPOMAH, Y.; OWUSU, G. K.; SACKEY, S.; PADI, B.; ABDUL-KARIMU, A. Use of gamma rays to induce mutants resistant to cocoa swollen shoot disease in Theobroma cacao L. **Plant Breeding**, Westport, v. 115, p. 74-76, 1996

AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, P. Dominant and recessive mutations conferring resistance to S-2-aminoethyl-L-cysteine in maize. **Journal of plant physiology**, Piracicaba, v. 145,v. 321-326, 1995.

AZEVEDO, R. A.; ARANA, J. L.; ARRUDA, P. Biochemical genetics of the interaction of the lysine plus threonine resistant mutant Ltr*1 with opaque-2 maize mutant. **Plant Science**, Limerick, v. 70, p. 81-90, 1990.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BENAVIDÉS, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 21-34, 2005.

BHAGWAT, B. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using chemical mutagens. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 73, p. 11-22, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v.72, p. 248-54, 1976.

BRENNECKE, K.; NETO, A. J. S.; LUGLI, J.; LEA, P.; AZEVEDO, R. A. Aspartate kinase in the maize mutants ASK1-LT19 and OPAQUE-2. **Phytochemistry,** New York, v.41, p. 707-712, 1996.

BUTELLI, E.; TITTA, L.; GIORGIO, M.; MOCK, H. P.; MATROS, A.; PETEREK, S.; SCHIJLEN EGW, M.; HALL, R. D.; BOVY, A. G,; LUO, J.; MARTIN, C. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nature biotechnology**, New York, v. 26, p. 1301-8, 2008.

CARVALHO, R. F.; AIDAR, S. T.; AZEVEDO, R. A.; DODD, I. C.; PERES, L. E. P. Enhanced transpiration rate in the high pigment 1 tomato mutant and its physiological significance. **Plant biology**, Stuttgart, v. 13, p. 546-50, 2011.

COBBETT, C. S.; MAY, M. J.; HOWDEN, R.; ROLLS, B. The glutathione-deficiente, cadmium-sensitive *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ-glutamylcysteine synthetase. **The Plant Journal,** Malden, v. 16, p. 73-78, 1998.

FERREIRA, R. R.; FORNAZIER, R. F.; VITÓRIA, A. P.; LEA, P.; AZEVEDO, R. A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 327-342, 2002.

FORNAZIER, R. F.; FERREIRA, R. R.; PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; SMITH, J.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures : Effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** Dordrecht, v. 71, p.125-131, 2002.

FOURCAUD, T.; ZHANG, X.; STOKES, A.; LAMBERS. H,; KÖRNER, C. Plant growth modeling and applications: the increasing importance of plant architecture in growth models. **Annals of botany**, London, v. 101, p. 1053-63, 2008.

GABRIELSON, K. M.; CANCEL, J. D.; MORUA, L. F.; LARSEN, P. B. Identification of dominant mutations that confer increased aluminium tolerance through mutagenesis of the Al-sensitive *Arabidopsis* mutant, *als3-1*. **Journal of experimental botany,** Oxford, v. 57, p. 943-51, 2006.

GIAVENO, C. D.; MIRANDA FILHO, J. B. Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 847-850, 2000.

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant physiology and biochemistry,** Paris, v. 44, p. 420-429, 2006.

GONÇALVES, J. F.; ANTES, F. G.; MALDANER, J.; PEREIRA, L. B.; TABALDI, L. A.; RAUBER, R.; ROSSATO, L. V.; BISOGNIN, D. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. D. M.; NICOLOSO, F. T. Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v. 47, p. 814-21, 2009.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. The Isolation of Antioxidant Enzymes from Mature Tomato (cv. Micro-Tom) Plants. **HortScience,** Amsterdam, v. 43, p. 1608-1610, 2008.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ANTUNES, A. M.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, p.321-333, 2008.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P.; PERES, L. E. P.; MEDICI LO, L. E. A. P. J.; AZEVEDO, R. A. Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, p. 387-394, 2009.

HA, S. B.; SMITH, A. P.; HOWDEN, R.; DIETRICH, W. M.; BUGG, S.; O'CONNELL, M. J.; GOLDSBROUGH, P. B.; COBBETT, C. S. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **The Plant cell**, Rockville, v. 11, p.1153-64, 1999.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Univ. California agric. Exp. Sta., 1950, 32p.
HOSSAIN, M.; ZHOU, M.; MENDHAM, N. A reliable screening system for aluminium tolerance in barley cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research,** Victoria, v. 56, p. 475-482, 2005.

HOWDEN, R.; GOLDSBROUGH, P. B.; ANDERSEN, C. R.; COBBETT, C. S. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. **Plant physiology**, Washington, v. 107, p. 1059-66, 1995.

JANSEN, M.; SCHAFFRATH, U. The barley mutant *emr2* shows enhanced resistance against several fungal leaf pathogens. **Plant Breeding**, Westport, v. 128, p. 124-129, 2009.

KOCH, A. C.; RAMGAREEB, S.; SNYMAN, S. J.; WATT, M. P.; RUTHERFORD, R. S. Pursuing imazapyr herbicide tolerance in sugarcane: Screening plants produced in vitro through somaclonal variation and mutagenesis. **South African Journal of Botany,** Pretoria, v. 76, p. 396-396, 2010.

KUMAR, K.; GILL, M.; KAUR, H.; CHOUDHARY, O.; GOSAL, S. *In Vitro* Mutagenesis and Somaclonal Variation Assisted Salt Tolerance in "Rough Lemon" (*Citrus jambhiri* Lush.). **European Journal of Horticultural Science**, Angers, v. 75, p. :233-238, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature,** London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANG, N.; BUU, B. Induction of salt tolerance in high yielding traditional rice cultivars through mutagenesis and somaclonal variation. **Sabrao Journal of Breeding and genetics**, Nakhon Pathom, v. 40, p.141-146, 2008.

LIMA, J. E.; CARVALHO, R. F.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. Micro-MsK: a tomato genotype with miniature size, short life cycle, and improved *in vitro* shoot regeneration. **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 753-757, 2004.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, p. 376-385, 2009.

MA, J. F.; ZHENG, S. J.; LI, X. F.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, H. A rapid hydroponic screening for aluminium tolerance in barley. **Plant and Soil**, The Hague, v. 191, p.133-137, 1997.

MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, I.; INAMURA, M.; BAN, Y.; KOBAYASHI, Y.; YIN, Y-GEN.; SAITO, T.; KUWATA, C.; IMANISHI, S.; NISHIMURA, S. Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar 'Micro-Tom'. **Plant biotechnology,** Sheffield, v. 24, p. 39-44, 2007.

MEISSNER, R.; JACOBSON, Y.; MELAMED, S.; LEVYATUV, S.; SHALEV, G.; ASHRI, A.; ELKIND, Y.; LEVY, A. A new model system for tomato genetics**. The Plant Journal**, Malden, v. 12, p. 1465-1472, 1997.

MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; GRATÃO, P. L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L. O.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany,** Elmsford, v. 71, p. 306-320, 2011.

NAWROT, M.; SZAREJKO, I.; MALUSZYNSKI, M. Barley mutants with increased tolerance to aluminium toxicity. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 345-356, 2001.

PATHIRANA, R. Gamma Ray-Induced Field Tolerance to Phytophthora Blight in Sesame. **Plant Breeding**, Westport, v. 108, p. 314-319, 1992.

PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 239, p.123-132, 2002.

PINO, L. E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M. S.; SCOTTON, D. C.; BORGO, L.; QUECINI, V. FIGUEIRA, A.; PERES, L. E. P. The *Rg1* allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato "Micro-Tom" model system. **Plant methods**, Seattle, v. 6, p. 1-11, 2010.

PINO-NUNES, L.; FIGUEIRA, A. DE O.; TULMANN-NETO, A.; ZSÖGÖN, A.; PIOTTO, F. A., SILVA, J., BERNARDI, W.; PERES, L. E. P. Induced Mutagenesis and Natural Genetic Variation in Tomato "Micro-Tom." **Acta horticulturae**, The Hague, v. 821, p. 63-72, 2009.

SALEEM, M. Y.; MUKHTAR, Z.; CHEEMA, A. A.; ATTA, B. M. Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). **Internation journal of environmental science and technology**, Iowa City, v. 2, p.141-145, 2005.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, p. 591-611, 1965.

TAMAS, L.; BUDIKOVA, S.; SIMONOVICOVA, M.; HUTTOVA, J.; SIROKA, B.; MISTRIK, I. Rapid and simple method for Al-toxicity analysis in emerging barley roots during germination. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, p. 87-93, 2006.

TSYGANOV, V. E.; BELIMOV, A. A.; BORISOV, A.Y.; SAFRONOVA, V. I.; GEORGI, M.; DIETZ, K. J.; TIKHONOVICH, I. A. A chemically induced new pea (*Pisum sativum*) mutant *SGECdt* with increased tolerance to, and accumulation of cadmium. **Annals of botany,** London, v. 99, p. 227-237, 2007.

TULMANN-NETO, A.; CAMARGO, C. E. de O.; CASTRO, J. L. D.; FILHO, A. W. P. F. Evaluation of "Anahuac" wheat mutant lines for aluminum tolerance. **Euphytica,** Wageningen, v.120, p. 339-343, 2001.

VITÓRIA, A. P.; RODRIGUEZ, A. P. M.; CUNHA, M.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Structural Changes in Radish Seedlings Exposed to Cadmium. **Biologia Plantarum,** Praha, v. 47, p.561-568, 2003.

WATANABE, S.; MIZOGUCHI, T.; AOKI, K.; KUBO, Y.; MORI, H.; IMANISHI, S.; YAMAZAKI, Y.; SHIBATA, D.; EZURA, H. Ethylmethanesulfonate (EMS) mutagenesis of *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom for large-scale mutant screens. **Plant Biotechnology**, Sheffield, v. 24, p. 33-38, 2007.

ZHANG, J.; SUN, W.; LI, Z.; LIANG, Y.; SONG, A. Cadmium fate and tolerance in rice cultivars. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 29, p. 483-490, 2009.

ZHU, M. Mutation induced enhancement of Al tolerance in barley cell lines. **Plant Science,** Limerick, v. 164, p. 17-23, 2003.

3 PARÂMETROS PARA DETERMINAÇÃO DE TOLERÂNCIA AO CÁDMIO EM CULTIVARES DE TOMATEIRO

Resumo

A resposta de plantas aos metais pesados tem sido cada vez mais estudada em decorrência do aumento dos problemas relacionados à contaminação de solos por esses metais, podendo ocasionar quedas na produtividade e qualidade dos alimentos, além dos riscos relacionados ao consumo destes. No entanto, a maior parte das pesquisas envolvendo metais como Cd têm sido voltadas paras as respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas a este metal, sendo escassos trabalhos com foco na tolerância a este elemento. Mais escassos ainda, são os estudos de tolerância voltados às hortaliças, grupo este de plantas alimentícias, em que a probabilidade de ocorrência de contaminação por Cd é elevada. Desta forma, visando determinar parâmetros para o estudo de tolerância ao Cd em tomateiro, que além representar uma das hortaliças de maior importância econômica no Brasil e no mundo, representa também uma planta modelo, avaliou-se 5 cultivares geneticamente distintas de tomateiro, submetendo-as a 8 doses de $CdCl_2$ em solução nutritiva, por meio da taxa de crescimento, medida pelo incremento de massa seca; o acúmulo de Cd nos tecidos e a clorose nas folhas. Nossos resultados evidenciaram que houve resposta diferenciada em relação a maior tolerância e sensibilidade ao Cd pelas cultivares. Com base nos dados de massa seca, foi possível elaborar um Índice de Tolerância (IT), o qual mostrou-se bastante eficiente para identificar as diferenças de tolerância ao Cd, das cultivares de tomateiro. O IT foi mais eficiente quando calculado para as plantas submetidas às doses que reduzem em aproximadamente 50% o crescimento destas. Observamos também que as principais variações no padrão de acúmulo de Cd são decorrentes da retenção deste metal nas raízes. Este padrão de acúmulo foi similar ao verificado na magnitude de variação entre os ITs e a taxa de crescimento das raízes, evidenciando que estes fatores devem estar associados. Por outro lado, a ocorrência sintomática de clorose nas folhas não foi eficiente para identificar genótipos de tomateiro mais tolerantes ao Cd. Finalmente, o somatório destes resultados sugere que as principais diferenças de tolerância entre as cultivares sejam devidas a mecanismos de tolerância envolvendo principalmente o sistema radicular dos tomateiros.

Palavras-chave: Índice de tolerância; Clorose; Metais pesados; Diversidade genética

Abstract

Plant response to heavy metals have been studied due to the increasing problems related to soil contamination by these metals, which can cause yield losses, reduction in food quality, and risks related to its consumption. However, most research involving metals such as Cd has been directed to biochemical and physiological responses of plants to this metal, but there are few studies focused on its tolerance. Studies involving other vegetables tolerance are rare, although plants such as tomato and similar vegetables are very affected by soil contamination with Cd. The objective of this study was to determine parameters to study Cd-tolerance in tomato, which is economically one of the most important vegetable crops in Brazil and in the world. Additionally, tomato is an important plant model. Then, we evaluated five genetically distinct cultivars, growing in eight doses of $CdCl_2$ in the nutrient solution. We evaluated the growth rate, measured by the increase of dry mass, Cd accumulation in tissues and leaf chlorosis. Our results indicated that each cultivar responded differently to Cd, since we identified cultivars more tolerant to this metal than others. Based on the data of dry matter,

it was possible to develop a Tolerance Index (TI), which was very effective for identifying differences in Cd-tolerance among the tomato cultivars. The TI was more effective when calculated the dose which causes plant growth reduction of approximately 50%. We also observed that the main variations in the pattern of Cd accumulation were due to the retention of this metal in the roots. This accumulation pattern was similar to that founded in TI variation and growth rate of roots, showing that these traits may be associated. The symptoms of leaf chlorosis was not efficient to determinate a Cd-tolerance rank among tomato cultivars. Finally, these results suggest that the main differences in Cd-tolerance in tomato plants are related to tolerance mechanisms of plant the root system.

Keywords: Tolerance index; Chlorosis; Heavy metals; Genetic diversity

3.1 Introdução

O conhecimento da interação entre plantas e metais pesados é importante não só em termos de preservação ambiental, mas também para reduzir os riscos decorrentes da introdução destes metais na cadeia alimentar (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005). Tal interação pode ser entendida como a capacidade de uma espécie vegetal de absorver e acumular um determinado metal, associada à magnitude dos efeitos causados por este, em termos de desenvolvimento, distúrbios no metabolismo e, em última análise, sobre a própria capacidade da espécie em completar seu ciclo reprodutivo. Se pensarmos nestas espécies como sendo culturas agrícolas, podemos correlacionar os efeitos da interação entre metais e plantas por meio do próprio impacto na produtividade destas, o que vai depender do grau de tolerância a metais pesados entre essas espécies e entre cultivares de uma mesma espécie. Cultivares diferentes são geneticamente distintas entre si, sendo que tais divergências genéticas compõem a variabilidade entre os acessos das espécies. Assim, espera-se que plantas geneticamente diferentes possuam respostas distintas ao estresse causado por metais pesados.

A maior parte dos trabalhos sobre a resposta de culturas agrícolas à presença de metais pesados no solo tem o Alumínio como principal alvo de estudos. Ainda assim, são raras as pesquisas voltadas para a avaliação de diferentes acessos de uma mesma espécie cultivada, quanto à tolerância desta ao referido metal. Dentre os trabalhos disponíveis, geralmente o foco principal está voltado para avaliação de tolerância ao Alumínio entre acessos de grandes culturas como trigo (STODART et al., 2007; ZHOU et al., 2007; HU et al., 2008; RAMAN et al., 2009), cevada (GALLARDO et al., 1999; DAI et al., 2011; MA et al., 1997), centeio (HEDE et al., 2002), feijão-guandu (CHOUDHARY; SINGH; IQUEBAL, 2011), milho (KHAN; McNEILLY, 1998), sorgo (RINGO et al., 2010), alfafa (NARASIMHAMOORTHY

et al., 2007; PAN; ZHU; CHENG, 2008), soja (VILLAGARCIA et al., 2001), entre outras, dada a relevância deste metal como limitante da produção agrícola. Mais raros ainda são os trabalhos com outros metais, tais como o Cádmio (Cd), cuja importância como contaminante ambiental vem crescendo a cada ano, devido ao aumento nas atividades industriais (GRATÃO et al., 2005) e antrópicas (OSKARSSON et al., 2004).

Embora existam vários estudos sobre o desenvolvimento de espécies vegetais expostas ao Cd (HART et al., 1998; ARAO; SUGIYAMA; TAKAHASHI, 2003; WANG et al., 2011), ainda entendemos pouco sobre a tolerância das plantas a este metal, cujos estudos geralmente são realizados usando plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (DOMÍNGUEZ-SOLÍS et al., 2004), *Arabidopsis harelli* (COURBOT et al., 2007), *Medicago truncatula* (SAEIDI; RICKAUER; GENTZBITTEL, 2012), entre outras. A tolerância pode ser estudada sob vários aspectos, que englobam parâmetros fisiológicos e bioquímicos relacionados ao efeito do estresse causado pelo Cd. Porém, quando estudamos conjuntamente vários genótipos de uma mesma espécie, podemos encontrar diferenças marcantes na morfologia de cada um deles, o que muitas vezes limita a comparação entre cultivares. Outro fator a ser considerado é o estágio fenológico das plantas. É natural que plantas adultas e bem desenvolvidas suportem doses de um determinado metal bem mais elevadas que as doses que afetam as plântulas.

Além dos problemas encontrados em razão das diferenças morfológicas entre cultivares, temos que levar em consideração o próprio sistema em que as plantas são avaliadas. Quando pensamos em estudos de toxidez de espécies cultivadas aos metais pesados, imediatamente associamos o cultivo destas em um solo contaminado. De fato, a situação ideal para avaliação das respostas de diferentes acessos a metais pesados seria o cultivo no próprio solo contaminado com o metal de interesse. Por outro lado, ao passo que nos aproximamos da situação real reduzimos as variáveis que podem ser controladas, tornando mais difícil ainda a avaliação dos efeitos tóxicos de um metal entre diferentes cultivares. Tal problema é ainda mais acentuado quando trabalhamos com espécies tais como o tomateiro, o qual possui grande variabilidade morfológica embora sua base genética seja bastante restrita (MILLER; TANKSLEY, 1990). Neste caso, o agrupamento de cultivares morfologicamente semelhentes pode ajudar na avaliação quanto à tolerância entre acessos, porém, isso acaba tornando mais difícil ainda encontrar acessos que sejam contrastantes quanto à tolerância a um determinado estresse, pois reduzimos ainda mais a fração da diversidade genética disponível para tal.

Se por um lado o tomateiro apresenta algumas limitações para tais estudos com tolerância, por outro temos que ele é considerado uma excelente planta modelo, tanto para pesquisas básicas, quanto aplicadas (RICK; YODER, 1988). De forma geral, o tomateiro possui fácil

adaptação em uma ampla gama de ambientes, ciclo de vida curto, insensibilidade ao fotoperíodo, alta fertilidade e homozigozidade, bom potencial produtivo, facilidade no controle da polinização e hibridação, condição diplóide com genoma relativamente pequeno (950 Mbp) (ARUMUGANATHAN; EARLE, 1991; PETERSON; PEARSON; STACK, 1998), facilidade para regeneração e reprodução da planta inteira (McCORMICK et al., 1986; FILLATTI, 1987), aptidão para desenvolver haplóides (ZAGORSKA et al., 1998) e disponibilidade de uma ampla gama de mutantes (MENDA et al., 2004) e estoques gênicos incluindo espécies selvagens (http://tgrc.ucdavis.edu). Além disso, o tomateiro possui mapas genéticos bem estruturados e altamente saturados (FOOLAD, 2007), sendo uma das poucas espécies que reúne esforços de uma cooperação internacional para sequenciamento de seu genoma (http://www.sgn.cornell.edu). Além disso, os efeitos da toxicidade do Cd em tomateiro têm sido estudados tanto em cultivares comerciais (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009), quanto na cultivar modelo Micro-Tom (GRATÃO et al., 2008).

Embora o tomateiro seja considerada uma importante planta modelo, praticamente não existem estudos sobre a tolerância ao Cd desta espécie, sendo que a maior parte dos trabalhos voltados para a avaliação de alterações fisiológicas e bioquímicas em resposta à exposição a este metal. Finalmente, considerando a relevada importância do tomateiro como cultura agrícola e planta modelo, este trabalho teve como objetivo determinar parâmetros para avaliar a tolerância ao Cd entre diferentes cultivares, sendo tais parâmetros relacionados ao desenvolvimento geral e capacidade de acúmulo deste metal nas plantas, onde propomos a utilização de um Índice de Tolerância (IT), elaborado com o intuito de reduzir o possível viés causado pelas diferenças morfológicas dos acessos desta espécie.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal

Foram usadas 19 cultivares de tomateiro oriundas de várias partes do mundo, cedidas gentilmente pelo Sr. Etienne Vernet, coordenador da Kokopelli Seeds no Brasil. As amostras de sementes foram multiplicadas em 2009, sendo obtidos lotes de sementes com a mesma idade fisiológica, mesma fitossanidade e mesmo potencial de germinação. As cultivares usadas neste trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 - Cultivares de tomateiro originárias de vários países do mundo

Cultivar	**Origem**
Azure (AZ)	Rússia
Banana Legs (BL)	Estados Unidos da América
Calabash Rouge (CR)	México (Chiapas)
Coeur de Boeuf Jaune (CBJ)	Estados Unidos da América (Virginia)
Corrogo (COR)	Senegal
Early cherry (EC)	Não informado
Géante D´Orenburg (GO)	Rússia (Sibéria)
High Country (HC)	Estados Unidos da América
Immune (IM)	Tchecoslováquia
Olena Ukrainien (OU)	Ucrânia
Olirose de St Domingue (OD)	Haiti (St Domingue)
Persimmon (PE)	Rússia
Prize of the Trial (PT)	Estados Unidos da América
Pusa Ruby (PR)	Índia
Sebastopol (SE)	Estados Unidos da América (Califórnia)
Solymari (SO)	Hungria
Tasty Evergreen (TE)	Não informado
Tecoh Tepee (TT)	Estados Unidos da América
Tropic Two Orders (TTO)	Estados Unidos da América (Florida)

3.2.2 Estágio de avaliação e cultivo em solução nutritiva

Estudos preliminares mostraram que a avaliação em estágio de plântula é bastante adequada, pela facilidade na obtenção de indivíduos uniformes e manuseio destes, somado à vantagem da rapidez na instalação dos experimentos. Além disso, o tomateiro cresce rapidamente, chegando a dobrar sua massa total em poucos dias de cultivo. As sementes das cultivares foram germinadas em bandejas de germinação contendo 72 células, com vermiculita expandida como substrato, o qual além de permitir uma boa retenção de umidade e aeração, pode ser removido facilmente das raízes, permitindo a lavagem sem causar danos significativos nas mesmas. Toda a nutrição na fase inicial de crescimento foi fornecida via irrigação com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) adaptada para tomateiros, à 10% da concentração adotada para plantas adultas. Em aproximadamente 14 dias após a

germinação, as plântulas foram transferidas para hidroponia (pH = 6,0 ± 0,1), contendo 10% da solução nutritiva total, sendo aumentada em mais 10% a cada dois dias (2º, 4º e 6º dias - 20%, 30% e 40%), sendo que no 7º dia, a solução foi trocada por outra contendo concentração de 50% do total de sais, acrescida de $CdCl_2$ em concentrações apresentadas no item 3.2.3.

Todo o cultivo hidropônico foi realizado em bandejas de plástico revestidas com sacos pretos, para evitar a entrada de luz. Cada bandeja recebeu 12 litros de solução nutritiva, a qual foi aerada por meio de compressor com um sistema de mangueiras de ar comprimido, acopladas a pequenas pedras porosas comumente usadas em aquários ornamentais. As plântulas foram acondicionadas em um suporte feito de placa de isopor, com a ajuda de pequenos pedaços de espuma. O espaçamento adotado foi de 80 x 80 mm entre plantas (64 cm^2/planta).

Experimentos preliminares mostraram que um período de exposição ao Cd de 4 a 7 dias é suficiente para obter respostas diferenciadas a este metal, em termos de acúmulo de massa seca e estresse oxidativo. Por esse motivo, as avaliações foram feitas 7 dias após a aplicação do metal.

3.2.3 Curva de Dose-Resposta ao $CdCl_2$

Inicialmente foi montado um experimento para a avaliação geral das 19 cultivares deste trabalho, usando a dose de 50 µM de $CdCl_2$. Contudo, somente 5 destas foram selecionadas quanto a maior estabilidade morfológica para a segunda etapa dos estudos, evitando dessa forma possíveis viés nos resultados obtidos.

Para entendermos melhor a magnitude do efeito do Cd nas plantas, fizemos uma curva de dose-resposta com as concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 µM de $CdCl_2$, expondo plântulas de tomateiro (com 21 dias de idade) por 7 dias a este metal. Este experimento foi composto das 5 cultivares pré-selecionadas (Calabash Rouge, Olena Ukrainien, Olirose de St Domingue, Pusa Ruby e Solymari) com 3 repetições de 2 plantas por parcela, em delineamento inteiramente casualizado.

3.2.4 Parâmetros avaliados

3.2.4.1 Massa seca e quantificação de Cd

Ao final dos 7 dias de exposição ao Cd, as plantas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em sacos de papel, sendo desidratas em estufa a 60 ºC até massa constante. No momento da aplicação, foram coletas 6 plantas de cada cultivar, as quais compuseram a massa seca média do tempo zero (T_0) do experimento. As plantas foram pesadas individualmente, avaliando-se a massa seca total, do sistema radicular e da parte aérea, sendo posteriormente desidratadas e separadas em raízes, caules e folhas, e então preparadas para a quantificação de Cd em cada tecido. A quantificação deste metal foi feita usando metodologia analítica de espectrometria de emissão ótica (ICP OES), em parceria com o Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP).

3.2.4.2 Determinação indireta de clorofila total (SPAD)

A terceira folha de cada planta, contando do ápice para a base, foi analisada para a determinação do teor de clorofila total, com o uso do aparelho portátil SPAD 502 (MINOLTA CORP. RAMSEY, NJ, EUA). Tais folhas não se encontravam completamente expandidas, contudo, as avaliações preliminares indicaram efeitos mais evidentes de clorose neste estágio. Foram feitas 3 leituras na porção mediana lateral (evitando as nervuras) do folíolo central de cada folha, sendo a média destas leituras calculadas automaticamente pelo equipamento. Todas as todas as 6 plantas que compunham os tratamentos foram mensuradas aos 7 dias após a aplicação do Cd.

3.2.5 Análises histológicas

Análises anatômicas por microscopia de luz foram realisadas no terço mediano do folíolo terminal (R1) das terceiras folhas de 3 plantas de cada cultivar de tomateiro, a contar do ápice para a base, expostas às concentrações de 0 e 50 µM de $CdCl_2$. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (1965), seguida de desidratação crescente em série etílica (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Posteiormente as amostras foram inclusas em resina de hidroxietilmetacrilato (LEICA-HISTORESIN) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos com as amostras foram cortados em secções transversais com

aproximadamente 5 µm de espessura em micrótomo rotativo. Os cortes foram corados com azul de toluidina (0,05%) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973). Finalmente as lâminas histológicas foram confeccionadas em resina sintética (Entellan®), analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz (ZEISS-JENEMED2) sendo as imagens capturadas na mesma escala com câmera SAMSUNG (SDC-313).

3.2.6 Determinação do Índice de Tolerância (IT)

O índice de tolerância foi determinado pela fórmula:

$$IT = \frac{(ms_{f_i\ Cádmio} - ms_o)}{(ms_{f\ Controle} - ms_o)}$$

Onde:

IT = Índice de Tolerância
$ms_{f_i\ Cádmio}$ = Massa seca final da *i*-ésima planta exposta ao Cd
$ms_{f\ Controle}$ = Massa seca média final das plantas controle
ms_o = Massa seca média inicial das plantas

3.2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

Devido à condição de alta uniformidade das condições de cultivo em casa de vegetação e sistema de hidroponia, os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado ou em delineamento fatorial inteiramente casualizado, conforme o experimento em questão. Todos os tratamentos continham 3 repetições compostas de 2 plantas por parcela. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade e erro. Os parâmetros dos modelos, tais como homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos resíduos, foram checados pelo teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Todas as análises foram realisadas usando o software R versão 2.14.2.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Pré avaliação e seleção das cultivares para experimentos com Cd

Uma avaliação preliminar com os 19 cultivares (tabela 1) foi realisada, expondo-as à dose de 50 µM de $CdCl_2$, por 4 dias. As principais dificuldades de avaliação observadas foram relativas a: 1) diferenças no hábito de crescimento, sendo que algumas cultivares eram de crescimento determinado (*self pruning - sp*) e a maioria era de crescimento indeterminado (*Self pruning - Sp*); 2) grandes diferenças na taxa de crescimento devido à presença do gene *dwarf* (*d*), que causa nanismo nos indivíduos; 3) arquitetura das plantas muito diferente, havendo algumas cultivares que emitiam muitos brotos laterais, ou apresentavam folhas com formato muito contrastantes ao das demais, ou ainda, florescimento muito precoce; 4) elevada susceptibilidade a algumas enfermidades, tais como a Requeima-do-Tomateiro (*Phytophthora infestans*), Murcha-Bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) e Oídio (*Oidium lycopersici*), as quais também afetam a taxa de crescimento das plantas. Desta forma, foram selecionadas para os experimentos deste trabalho, somente as cultivares Calabash Rouge (CR), Olena Ukrainien (OU), Olirose de St Domingue (OD), Pusa Ruby (PR) e Solymari (SO), tendo em vista o aproveitamento da diversidade genética existente entre elas, mas também garantindo relativa uniformidade de desenvolvimento para tornar as avaliações mais precisas.

3.3.2 Caracterização dos efeitos causados pelo Cd em plantas de tomateiro

A consequência mais marcante da absorção de Cd pelas plantas foi a redução do crescimento, tanto das raízes quanto da parte aérea, a qual pode ser observada na figura 1, onde plantas de tomateiro foram submetidas à doses crescentes de $CdCl_2$. Além da redução no crescimento, as plantas expostas ao Cd apresentaram clorose nas folhas e tecidos jovens, sendo este efeito mais evidente nas doses entre 10 e 25 µM de $CdCl_2$. Nas doses de 50 e 100 µM de $CdCl_2$, visualmente houve reduzida expansão dos tecidos foliares, tornando-os mais adensados, o que de certa forma pode ter mascarado a clorose nas folhas das plantas destes tratamentos. No capítulo 1, foi demonstrado que plantas de tomateiro da cv MT, expostas a uma dose baixa de Cd (10 µM de $CdCl_2$) por um longo período (30 dias), apresentaram clorose acentuada nos tecidos jovens. Assim, é possível que em doses elevadas as plantas sofram com danos severos às raízes, o que de certa forma reduziria a translocação do Cd para a parte aérea, bem como a translocação de água e outros nutrientes, afetando então a expansão

celular de forma geral, reduzindo dessa forma, a manifestação da clorose nas doses mais elevadas deste metal.

Outro sintoma bastante evidente do Cd nas plantas, foi o curvamento ou enrolamento das folhas para baixo, sendo que a intensidade deste efeito variou entre as cultivares, existindo muito provavelmente uma correlação entre esta intensidade e o grau de tolerância de cada uma delas (figura 1), onde as plantas aparentemente mais sensíveis evidenciaram maior curvamento/enrolamento das folhas. Este sintoma, assim como a redução do crescimento e a clorose são bastante conhecidos em plantas sob os efeitos tóxicos do Cd (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005).

Figura 1 - Efeito do Cd sobre plantas de tomateiro da cultivar Calabash Rouge (CR), após 7 dias de exposição à doses crescentes de $CdCl_2$

Além dos sintomas gerais já conhecidos e descritos do Cd nas plantas, observou-se também a ocorrência de manchas necróticas ao longo da nervura central e das nervuras secundárias das folhas mais velhas das cultivares (figura 2). A ocorrência destas necroses foi mais intensa na cultivar CR, a qual apresentou este sintoma mesmo em doses mais baixas de Cd. Nas plantas das cultivares do tratamento com 100 µM de $CdCl_2$, a necrose foi tão agressiva que chegou a ocasionar a queda das folhas mais velhas, em poucos dias após a aplicação do metal.

De forma geral, os sintomas aqui observados podem ser decorrentes dos danos que o Cd causa sobre vários processo fisiológicos, tais como a transpiração, translocação de seiva e nutrientes pelo floema, respiração celular, além de alterações gerais em organelas e danos nas membranas celulares (PRASAD, 1995). O Cd possui estrutura muito similar a de outros elementos que são micronutrientes de plantas, tais como Fe, Ni e Cu, podendo interagir e competir pelos mesmos sítios de absorção destes na membrana plasmática (SALT et al., 1995; BACCOUCH; CHAOUI; EL FERJANI, 1998; MOCQUOT et al., 1996), ocasionando a redução na absorção destes micronutrientes em função da absorção de Cd. A competição pelos sítios de absorção entre estes cátions pode conduzir, por exemplo, a clorose pela deficiência de Fe nos tecidos das plantas (HAGHIRI, 1973). Contudo, não é possível concluir se os efeitos tóxicos deste metal observados nas cultivares de tomateiro são decorrentes da deficiência de outros elementos ou se são relativos ao próprio efeito danoso do Cd sobre o aparato metabólico celular, pois provavelmente esses sintomas de toxidez são causados por diferentes formas de ação combinadas, cuja resultante evidenciam os efeitos gerais aqui observados (figuras 1 e 2).

Figura 2 - Manchas necróticas ao longo da nervura central e de nervuras secundárias do folíolo central de folha da cultivar Olena Ukrainien (OU)

3.3.3 Estudo do efeito do Cd sobre o desenvolvimento das cultivares de tomateiro

Como observado, a redução no crescimento representou a característica mais evidente do efeito do Cd sobre as plantas de tomateiro. Por esse motivo, a taxa de crescimento foi escolhida como um dos principais parâmetros para avaliar a tolerância das plantas expostas a este metal. Para tanto, no presente trabalho o desenvolvimento geral dos indivíduos foi mensurado em termos de miligramas de massa seca acumulada por planta, em um determinado período, representado neste experimento pelo período de 7 dias.

As cultivares usadas neste trabalho são geneticamente diferentes entre si, possuindo também características morfológicas distintas umas das outras, além de algumas sensíveis diferenças no potencial de crescimento *per se* de cada uma delas. Para reduzir o grau de viés causado por tais diferenças, a taxa de crescimento foi calculada pela diferença da avaliação dos pesos de massa seca inicial e final das plantas de cada tratamento ($\Delta_{Crescimento} = massa\ seca\ final - massa\ seca\ inicial$). Esses valores foram usados para estimar a tendência geral na redução de crescimento de cada cultivar, obtidos por meio de análise de regressão, cujas equações e coeficientes de determinação ajustados (R^2 ajustado) são apresentados na tabela 2. Para escolher qual o melhor modelo de regressão a ser adotado, foram testados modelos com até sete níveis de regressão, determinando-se o mais adequado pelo Critério de Informação de Akaike (AKAIKE, 1974). Em todos os casos, os coeficientes de determinação ajustados foram relativamente elevados, podendo-se afirmar que os modelos relativos à cada cultivar explicam satisfatoriamente as variâncias das tendências de redução no crescimento em função do aumento nas concentrações de $CdCl_2$.

Tabela 2 - Fórmulas da análise de regressão das variações dos pesos de massa seca das cultivares, em função de doses crescentes de $CdCl_2$

Cultivar	Fórmula de Regressão	R^2
Calabash Rouge	$y_{CR} = 660{,}66 - 21{,}94x + 0{,}294x^2 - 0{,}0013x^3$	0,95
Olena Ukrainien	$y_{OU} = 613{,}00 - 14{,}43x + 0{,}182x^2 - 0{,}0009x^3$	0,94
Olirose de St Domingue	$y_{OD} = 486{,}21 - 13{,}04x + 0{,}220x^2 - 0{,}0013x^3$	0,81
Pusa Ruby	$y_{PR} = 570{,}30 - 10{,}95x + 0{,}137x^2 - 0{,}0007x^3$	0,88
Solymari	$y_{SO} = 549{,}40 - 10{,}32x + 0{,}132x^2 - 0{,}0007x^3$	0,93

y_i = Massa Seca (mg/planta) da cultivar i; x = dose de $CdCl_2$; $p < 0{,}01$ para todas as equações

Na figura 3A são apresentadas as curvas de regressão dos valores relativos à taxa de crescimento no período de 7 dias em diferentes doses de Cd. Podemos notar que as 5 cultivares estudadas respondem de forma diferenciada ao Cd. As cultivares PR e SO mostraram menor redução do crescimento com o aumento das doses do metal, enquanto OD e OU apresentaram um tendência geral intermediária de redução da massa seca. Já a cv CR mostrou ser a mais sensível de totais, sendo muito afetada até mesmo nas menores concentrações de Cd.

Com base nas equações de regressão, foi possível estimar o intervalo de confiança da média da dose que reduz em 50% o crescimento das plantas (DR50), que neste caso de DR50 = 36,96 µM de $CdCl_2$. Assim, observou-se que a faixa de doses (Intervalo de Confiança - IC) que vai de 20,76 a 53,15 µM de $CdCl_2$ (figura 3A*), reduz o crescimento das plantas em 50% para o grupo de cultivares avaliados ($IC_{95\%}$ = 20,76 a 53,15 µM de $CdCl_2$), desde que repetidas as condições do experimento em hidroponia, em relação ao estágio de desenvolvimento inicial das plantas e tempo de exposição ao metal. Essas informações são especialmente importantes para o delineamento de experimentos futuros. Seguindo essa mesma metodologia, foi possível estimar o IC para as doses nas quais as plantas teriam seu crescimento cessado (figura 3A**). Assim, as plantas de tomateiro teoricamente não cresceriam nas doses que correspondem à faixa de 113,16 a 125,44 µM de $CdCl_2$ ($IC_{95\%}$ = 113,16 a 125,44 µM de $CdCl_2$), onde a média geral seria de 119,30 µM de $CdCl_2$.

Na bibliografia existem trabalhos onde foram utilizadas doses de $CdCl_2$ similares às doses usadas neste experimento, em cultivo hidropônico de plântulas de tomateiro, como por exemplo, Dong, Wu e Zhang (2005) que usaram doses de Cd variando de 0,1 a 10 µM, por um período de 7 a 33 dias. Neste caso, os autores optaram por usar doses reduzidas por um período de exposição mais longo. Já López-Millán et al. (2009) expuseram plântulas de tomateiro à doses de 0, 10 e 100 µM de $CdCl_2$, por 10 a 12 dias, de forma similar ao que foi realizado neste trabalho. Assim, a combinação entre dose, estágio de desenvolvimento das plantas e período de exposição ao metal, precisam ser considerados conjuntamente para que a melhor escolha seja feita, de acordo com os objetivos estabelecidos. Neste trabalho, temos como objetivo a avaliação de tolerância entre diferentes genótipos de tomateiro. Por esse motivo, pode-se considerar que a faixa de doses utilizada (0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 µM de $CdCl_2$), combinada com o tempo de exposição de 7 dias, usando plântulas de tomateiro de 21 dias de idades (30 dias no total), foi adequado para identificar as diferenças de tolerância entre as cultivares. Finalmente, consideramos que a faixa de doses correspondente ao $IC_{95\%}$ = 20,76

a 53,15 µM de $CdCl_2$ é a mais adequada para o estudo de tolerância de plântulas de tomateiro ao Cd.

3.3.4 Relação entre Cd e clorose em plantas de tomateiro

A clorose nos tecidos jovens das plantas é o segundo principal sintoma do efeito do Cd, sendo as folhas em desenvolvimento as mais afetadas. Por esse motivo, o grau de clorose em folhas jovens, ainda não completamente expandidas foi avaliado, aos 7 dias após a aplicação do metal (plântulas de 30 dias), usando-se para esse fim as mesmas plantas que foram mensuradas quanto à variações na massa seca.

Os resultados aqui apresentados foram expressos em unidades SPAD (relativas ao equipamento usado para a coleta dos dados), porém existem trabalhos mostrando alta correlação entre os valores SPAD e a quantidade de clorofila em folhas de tomateiro, expressa em miligramas de clorofila (CL) por grama de tecido fresco (mg/g), como é demonstrado por Rodriguez et al. (1998), que determinou a seguinte fórmula, cujo coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,96$:

$$CL\ (mg/g) = \frac{SPAD - 6,70}{15,11}$$

Contudo, no presente trabalho optou-se pelos valores SPAD para realizar os estudos em questão, salvaguardando dessa forma a possibilidades de diferenças entre as plantas de tomateiro e aquelas usadas por Rodriguez et al. (1998). Seguindo a mesma metodologia de análise de regressão usada para os estudos de redução no peso de massa seca das plantas, foram obtidas as equações de regressão para as variações de clorose mensuradas em unidades SPAD (tabela 3). Neste caso, também observamos valores de coeficientes de determinação ajustados (R^2 ajustado) elevados, mostrando que os modelos propostos explicam bem as variações encontradas em unidades SPAD.

Tabela 3 - Fórmulas da análise de regressão para valores de SPAD das cultivares, em função de doses crescentes de $CdCl_2$

Cultivar	**Fórmula de Regressão**	**R^2**
Calabash Rouge	$y_{CR} = 64{,}26 - 1{,}06x + 0{,}024x^2 - 0{,}0001x^3$	0,88
Olena Ukrainien	$y_{OU} = 69{,}03 - 2{,}33x + 0{,}062x^2 - 0{,}0004x^3$	0,97
Olirose de St Domingue	$y_{OD} = 64{,}06 - 0{,}617x + 0{,}013x^2 - 0{,}00007x^3$	0,87
Pusa Ruby	$y_{PR} = 68{,}34 - 0{,}978x + 0{,}026x^2 - 0{,}0002x^3$	0,74
Solymari	$y_{SO} = 64{,}69 - 1{,}08x + 0{,}032x^2 - 0{,}0002x^3$	0,84

y_i = Valores de SPAD da cultivar i; x = dose de $CdCl_2$; $p < 0{,}01$ para todas as equações

Com base nestes resultados, é possível observar que as curvas apresentam tendência decrescente até uma determinada faixa de doses que correspondem ao intervalo de confiança da média (26,35 µM de $CdCl_2$) para máxima clorose ($IC_{95\%}$ = 21,26 a 31,44 µM de $CdCl_2$) (figura 3B***), a partir do qual os valores de SPAD começam a aumentar novamente (figura 3B). Provavelmente isso acontece porque em doses mais elevadas a expansão das células é bastante reduzida (figura 4), o que poderia causar a falsa impressão de que nas doses maioresmais elevadas, os sintomas seriam menos severos.

Para avaliar de forma geral o potencial da clorose como um parâmetro de determinação da tolerância de tomateiros ao Cd, realizou-se a análise de correlação de Pearson entre a redução de massa seca, a qual mostrou-se como uma característica estável, com os valores de SPAD mensurados nas mesmas plantas. Esses resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Análise de Correlação de Pearson entre a redução do peso de massa seca nas plantas e o aumento da clorose nas folhas, em relação ao aumento crescente nas doses de Cd

Concentração de $CdCl_2$ (µM)	**Coeficiente de Correlação de Pearson (r)**	**p-valor**
0	0,3686	0,5415
5	0,3289	0,5889
10	-0,6328	0,2519
15	-0,6293	0,2553
20	-0,2222	0,7195
25	0,2232	0,7182
50	**0,8762**	**0,0513**
100	0,6347	0,2500

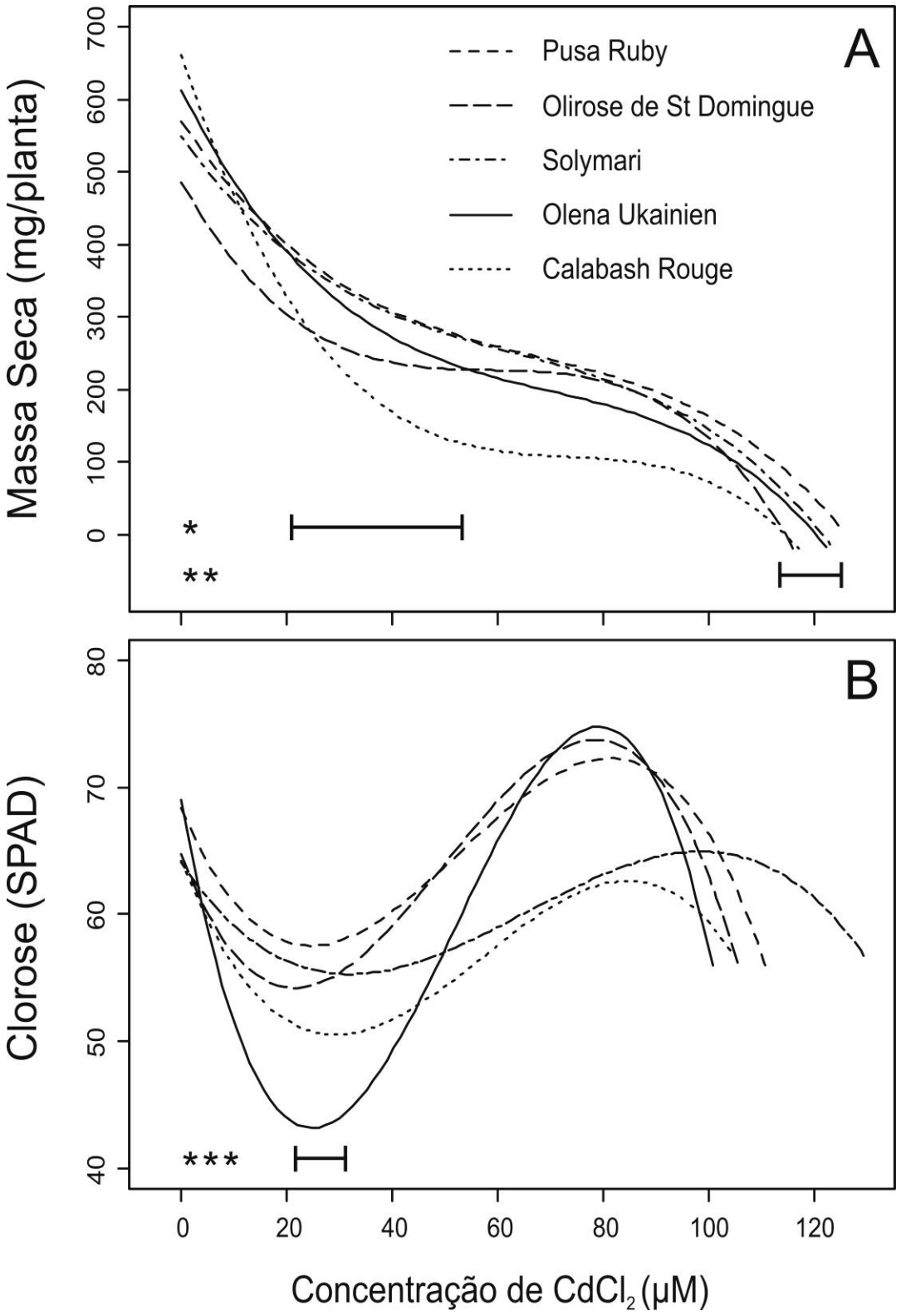

Figura 3 - Resposta de cultivares de tomateiro ao Cd. A) Curvas de regressão da redução do peso de massa seca total (mg/planta) em função do aumento na concentração de Cd. B) Curvas de regressão das variações na clorose de folhas jovens, representadas por valores SPAD. * Intervalo de Confiança ($IC_{95\%}$) para dose de $CdCl_2$ que reduz em 50% o crescimento das plantas. ** Intervalo de Confiança ($IC_{95\%}$) para dose de $CdCl_2$ que cessa o crescimento dos tomateiros. *** Intervalo de Confiança ($IC_{95\%}$) para dose de $CdCl_2$ que leva à máxima clorose em folhas jovens de tomateiro

Dentre os valores de correlação apresentados na tabela 4, somente aquele referente à dose de 50 µM de $CdCl_2$ chegou perto de ser significativo (r = 0,8762; p-valor = 0,0513), ou seja, nesta dose de Cd as cultivares que se desenvolveram melhor foram também, em média, aquelas que apresentaram maiores valores de SPAD.

De maneira geral a clorose, medida em unidades SPAD, tem sido usada como um dos parâmetros de avaliação de toxidez ao Cd em plantas cultivadas, tais como arroz (SHAO et al., 2007; HASSAN; SHAO; ZHANG, 2005), soja (SHAMSI et al., 2008), tabaco (YOSHIHARA et al., 2006), trigo (ZHANG; FUKAMI; SEKIMOTO, 2006) e mesmo em tomateiro (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009; DONG; WU; ZHANG, 2005) e outras solanáceas (THIEBEAULD et al., 2005), onde os autores tem mostrado que quanto maior a dose Cd, maiores são os efeitos de clorose nas folhas das plantas. No entanto, nossos resultados mostraram que em doses elevadas de Cd os valores de SPAD voltaram a aumentar, ficando similares aos valores observados nas plantas não expostas ao Cd.

É possível que esse aumento nos valores de SPAD em folhas de plantas submetidas a doses mais elevadas de Cd, seja devido à redução da expansão das células nestes tecidos, levando ao adensamento das mesmas e provável viés das leituras. Na figura 4, podemos observar cortes anatômicos de folhas de tomateiro, em que para a dose de 50 µM de $CdCl_2$ houve uma redução significativa da espessura do mesofilo (figura 4B) em relação ao controle (figura 4A), ficando evidente o impacto negativo do Cd sobre o desenvolvimento não somente das células do parênquima clorofiliano paliçádico e lacunoso, como também uma sensível redução dos espaços intercelulares do mesofilo, principalmente da região do parênquima lacunoso, característica essa comum em diversas espécies quando submetidas ao Cd (DJEBALI et al., 2010). Além disso, observamos que de forma geral a expansão do limbo foliar nos tratamentos com doses mais elevadas de Cd foi visualmente menor, conforme discutido no item 3.3.2. Dessa forma, a redução na espessura do mesofilo induzida pela presença de Cd, provavelmente seja a principal responsável pelo padrão de variação nos valores SPAD, observados na figura 3B.

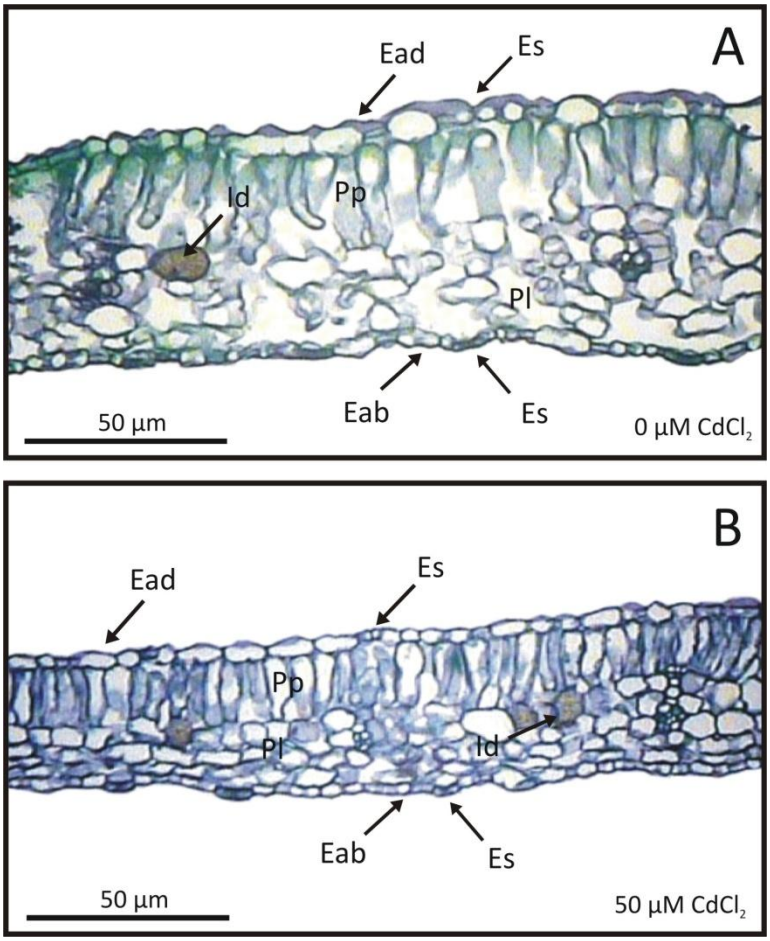

Figura 4 - Corte transversal de folhas de tomateiro da cv CR. A) planta desenvolvida na ausência de Cd. B) planta expostas a 50 µM de $CdCl_2$ por um período de 7 dias. Ead = Epiderme Adaxial; Eab = Epiderme Abaxial; Pp = Parênquima Paliçádico; Pl = Parênquima Lacunoso; Es. = Estômato; Id = Idioblastos

Para termos uma visão geral sobre esses resultados contrastantes com a literatura em relação aos sintomas de clorose nas folhas e sua relação com os efeitos do Cd, é necessário considerar os objetivos dos trabalhos em questão. De fato, o Cd leva à clorose nas folhas, sendo que os valores de SPAD podem ser usados como referencia para quantificar o efeito deste sintoma, desde que haja bom senso na escolha das doses, fase de avaliação, posição em que são tomadas as medidas nas folhas e interpretação dos resultados. Porém, neste trabalho observamos que existe baixa fidelidade entre sintomas de clorose nas folhas e a redução no desenvolvimento das plantas que foram expostas às doses crescentes do metal. Finalmente, em virtude da baixa correlação geral entre estes fatores, consideramos que os valores de SPAD não são adequados para avaliação de tolerância entre diferentes cultivares de tomateiro.

3.3.5 Índice de Tolerância (IT) ao Cd em tomateiro

Embora a taxa de crescimento das plantas seja um bom parâmetro para avaliar a tolerância ao Cd, é necessário considerar que cada cultivar possui seu potencial individual de crescimento. Sendo assim, precisamos fazer um ajuste dessas diferenças entre as cultivares, visando tornar mais precisa a comparação entre elas. Para isso, foi elaborado um Índice de Tolerância (IT), o qual é baseado no acúmulo de massa seca total em determinado período, corrigindo-se pelo potencial individual do próprio genótipo. Este IT é similar ao proposto por Wilkins (1957) para avaliar tolerância ao chumbo. Porém, Wilkins (1957) não levou em consideração os ajustes de correção para as diferenças de crescimento *per se* entre os acessos.

No momento da exposição das plantas ao metal pesado, coleta-se o mesmo número de plantas relativo às repetições e parcelas do experimento. Essas plantas são avaliadas individualmente e usadas para calcular o peso da massa seca média inicial (ms_o). Ao final de um determinado período, todas as plantas são coletadas e avaliadas quanto às suas respectivas massas secas. Para o cálculo do IT, os valores individuais das plantas que não foram expostas ao metal são usados para o cálculo do peso da massa seca média final das plantas controle ($ms_{f\ Controle}$) (dose 0 µM de $CdCl_2$). Já no caso das plantas que foram expostas a alguma das doses do metal, os valores individuais de cada uma delas são usados para obter um IT relativo a cada repetição dos tratamentos ($ms_{f_i\ Cádmio}$). Com isso, é possível usar tais repetições para calcular os desvios em relação à média e aplicar um teste estatístico para concluir sobre a significância ou não das diferenças de tolerância encontradas. Finalmente, chegamos ao IT proposto neste trabalho, o qual é dado pelo seguinte fórmula:

$$IT\ = \frac{\left(ms_{f_i\ Cádmio} - ms_o\right)}{\left(ms_{f\ Controle} - ms_o\right)}$$

Onde:

$IT\ =$ Índice de Tolerância

$ms_{f_i\ Cádmio} =$ Massa seca final da *i*-ésima planta exposta ao Cd

$ms_{f\ Controle} =$ Massa seca média final das plantas controle

$ms_o\ =$ Massa seca média inicial das plantas

Os valores de IT podem variar de *0* a *1*, onde *0* indica a máxima sensibilidade e *1* indica a máxima tolerância. Este IT é calculado individualmente para cada cultivar, mas os resultados dos valores obtidos podem ser comparados entre cultivares. A partir do cálculo deste índice, surge uma segunda questão que está associada à qual dose de Cd deve ser usada para tais estimativas. Visando entender melhor essa questão, temos que estudar os ITs calculados para todas as cultivares expostas a todas as doses de Cd, os quais são apresentados na figura 5.

Podemos notar que até a dose de 25 µM de $CdCl_2$, ocorre uma grande variação dos índices entre as cultivares, ficando difícil identificar uma tendência geral de qual cultivar seria mais tolerante. Contudo, a partir de 25 até 100 µM de $CdCl_2$ os ITs ficam bastante estáveis, praticamente não havendo diferenças significativas no rank de tolerâncias entre os genótipos. Quando alinhamos a faixa de valores de doses de maior estabilidade dos ITs (figura 5*) com a faixa de valores do Intervalo de Confiança para redução de 50% (DR50) no crescimento das plantas (figura 5**), verificamos que a intersecção entre elas, que vai de aproximadamente 25 a 50 µM de $CdCl_2$, apresenta-se como aquela que mais separa os valores de IT entre as cultivares (figura 5 * e **).

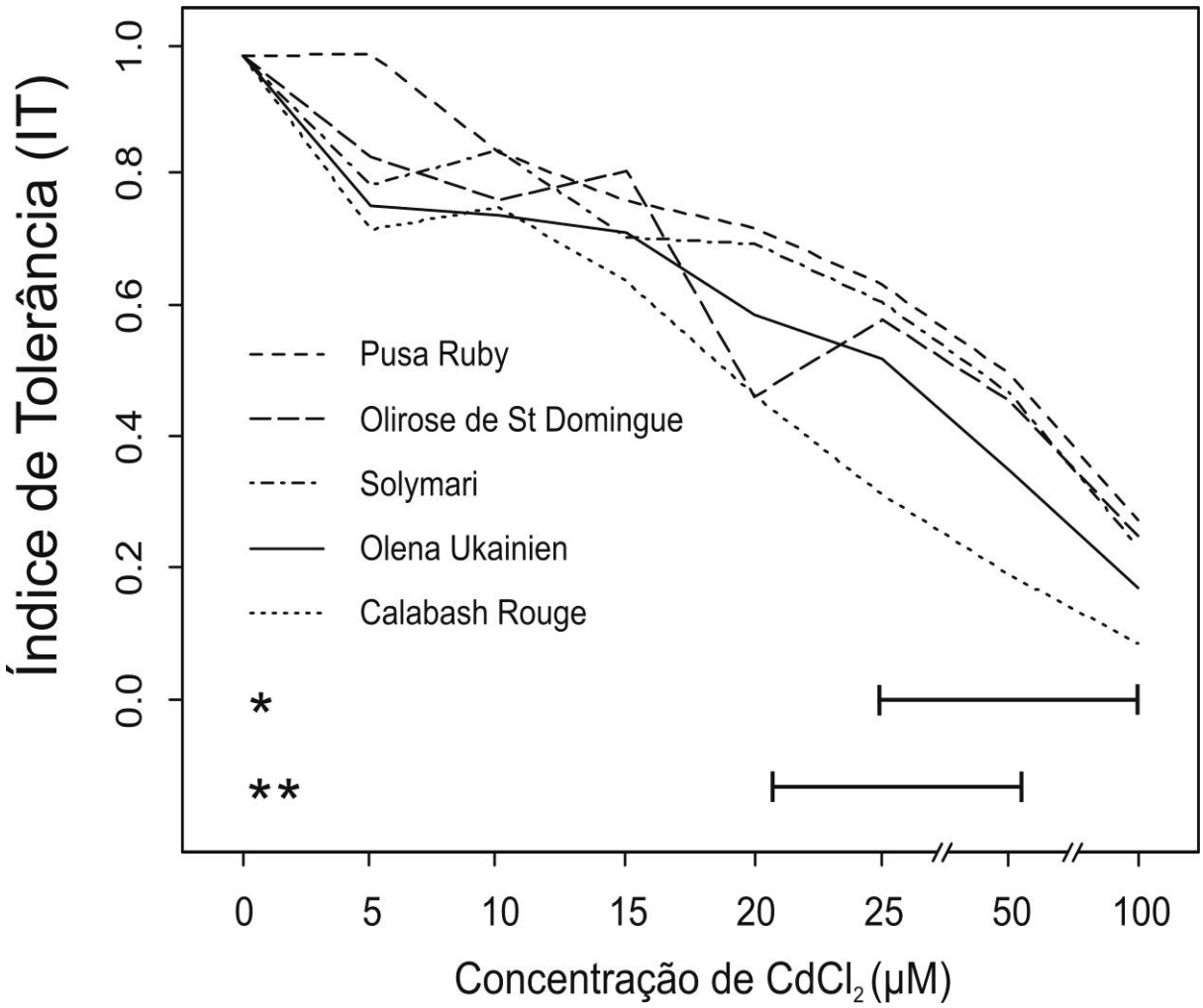

Figura 5 - Índice de Tolerância (IT) das cultivares, em função de doses crescentes de $CdCl_2$. * Faixa de maior estabilidade de diferenças entre os ITs. ** Intervalo de Confiança para a dose que reduz em 50% o crescimento das plantas

Com base nestes resultados, podemos considerar que os ITs mais informativos são os obtidos a partir das doses que reduzem em aproximadamente 50% o crescimento das plantas, sendo que desejamos que o IT médio entre as cultivares avaliadas fique o mais próximo possível de 0,5, pois assim teríamos uma boa separação entre as cultivares, em relação ao grau de tolerância entre elas. Na figura 6A, observamos o cálculo do IT médio (ITm) para cada dose, considerando os genótipos aqui estudados. Nesta figura, verificamos que o ITm = 0,5 fica entre as doses de 25 a 50 µM de $CdCl_2$, o que novamente evidencia que essa faixa de doses é a recomendada para estudos sobre tolerância do tomateiro ao Cd. Como não foram utilisadas doses intermediárias entre 25 a 50 µM de $CdCl_2$, optamos por adotar a dose de 50 µM de $CdCl_2$ para dar sequência a este trabalho, pois a concentração de 25 µM de $CdCl_2$, embora dentro da faixa ideal para estudos, está muito próxima do limite de maior variação dos ITs.

Desta forma, podemos calcular o IT para cada cultivar utilisando a dose de 50 µM de $CdCl_2$ como referência. Pela análise da figura 6B fica evidente que existem diferenças marcantes entre os genótipos avaliados. Observamos que as cultivares OD, PR e SO apresentam ITs relativamente elevado quando comparadas com OU, que apresentou IT intermediário, e CR que aparece como sendo a cultivar mais sensível ao Cd entre as avaliadas. De maneira geral, a dose de 50 µM de $CdCl_2$ foi eficiente para separar as cultivares quanto ao grau de tolerância a este metal.

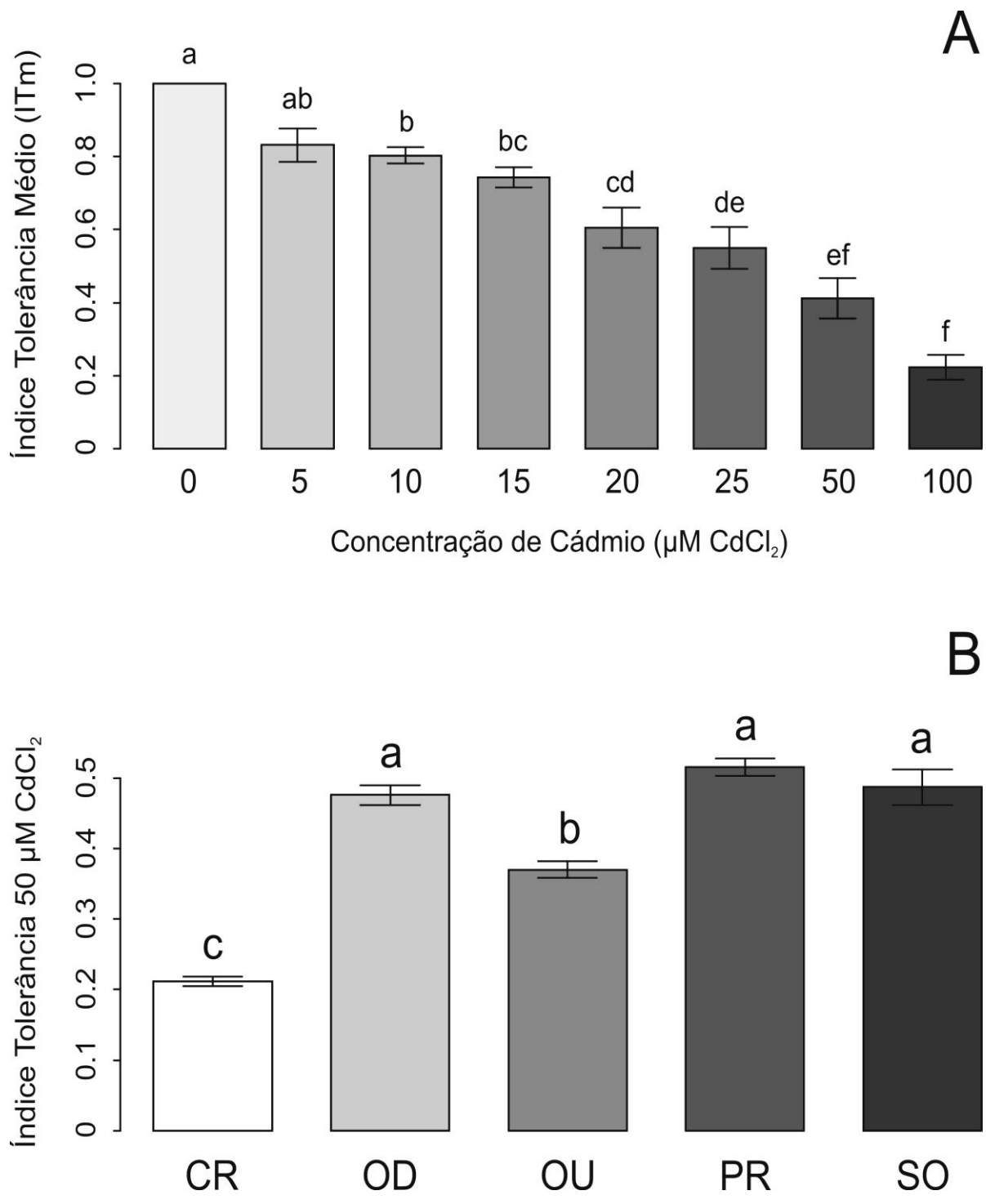

Figura 6 - Estudo do Índice de Tolerância entre cultivares. A) Índice de Tolerância médio das 5 cultivares avaliadas, em função de doses crescentes de $CdCl_2$. B) Índice de Tolerância de cada uma das cultivares, expostas a 50 µM de $CdCl_2$. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.6 Cultivo em solução nutritiva x solos contaminados

Neste trabalho, procuramos simular a exposição de plantas de tomateiro ao Cd, com a maior fidelidade possível em relação ao cultivo desta espécie no campo. Para tanto, a escolha das doses usadas para tais estudos teve como referência a tabela de "Valores orientados para solo e água subterrânea do Estado de São Paulo" da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) (2005), em qual são apresentados valores de referência, alerta e intervenção para vários metais e outras substâncias. Na tabela 5, são apresentados os valores relativos ao metal pesado Cd.

Tabela 5 - Valores orientados para solo e água subterrânea do Estado de São Paulo, segundo a CETESB (2005)

Metal	Solo (mg/kg)				
	Referência	Alerta	Intervenção		
			Agrícola APMax*	Residencial	Industrial
Cd	< 0,5	1,3	3	8	20

*Área de Proteção Máxima

Na tentativa de estabelecer um paralelo entre as doses utilizadas em hidroponia e os valores orientados pela CETESB (2005) para Cd no solo em mg/kg, apresentamos a tabela 6, na qual os valores de Cd são expressos em mg/L de solução nutritiva, relativas às concentrações deste metal utilizadas neste trabalho.

Tabela 6 - Valores totais de Cd em solução nutritiva relativos às diferentes concentrações utilizadas

Unidade	---------- Concentração de Cd em Solução Nutritiva ----------							
µM de $CdCl_2$	0	5	10	15	20	25	50	100
mg/L de Cd	0	0,32	0,64	0,96	1,28	1,60	3,2	6,4

Com base na tabela 6, verificamos que a dose de 50 µM de $CdCl_2$ (3,2 mg/L de Cd) selecionada para este estudo, está muito próxima do valor de intervenção de 3 mg/kg de Cd em solos agrícolas, quando assumimos uma equivalência aproximada entre o volume de 1 kg solo e o volume de 1 L de solução. Por fim, temos que a dose de Cd selecionada para os

estudos em hidroponia reflete com bastante fidelidade o nível deste metal a que plantas de tomateiro seriam expostas na ocasião do transplante em solos contaminados (≥ 3 mg/kg de Cd).

3.3.7 Taxa de crescimento das cultivares expostas ao Cd

Como comentado no item 3.3.2, o principal efeito do Cd sobre as plantas de tomateiro é a redução no crescimento dos indivíduos. Neste trabalho, vamos assumir que as variações no acúmulo de massa seca dos tomateiros representa, em última análise, o quanto as plantas foram afetadas pela presença do Cd. Todas as avaliações foram feitas em estágio de plântula, sendo mensurados os pesos da massa seca do sistema radicular e da parte aérea (caule e folhas), as quais compuseram o peso da massa seca total de cada repetição.

Na figura 7A, verificamos que na ausência de Cd, as cultivares não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso da massa seca do sistema radicular. Quando expostas ao metal, houve uma redução do peso da massa seca do sistema radicular de todas as cultivares, sendo que tal redução somente foi significativa para as cultivares CR e OU. Já em relação ao peso da massa seca da parte aérea, também foram verificadas diferenças significativas entre as cultivares, onde as cultivares CR e OU foram as que mais cresceram na ausência de Cd (figura 7B). Contudo, na presença do metal todas as cultivares apresentaram uma elevada redução no acúmulo de massa seca da parte aérea, dentre as quais podemos destacar a cv CR, em qual a redução de crescimento foi altamente significativa em relação as demais.

O acúmulo de massa seca total seguiu o mesmo padrão de variação da parte aérea, onde foram apenas acentuadas algumas diferenças (figura 7C). De maneira geral, notamos que as cultivares CR e OU, embora sejam as que mais se desenvolvem na ausência de Cd, são também as mais afetadas na presença do mesmo. Por outro lado, as cultivares OD, PR e SO não possuem um crescimento tão vigoroso, mas acabaram sendo menos afetadas pelo Cd, dentre as quais verifica-se uma leve vantagem geral da cv PR, que apresentou os maiores valores de massa seca do sistema radicular, da parte aérea e total, na presença deste metal.

É interessante notar o padrão de inversão de acumulo de massa seca da cv CR. Esta cultivar teve crescimento bastante vigoroso na ausência de Cd, chegando a ser a cv que mais acumulou massa seca de forma geral. No entanto, a mesma mostrou-se bastante sensível ao metal, pois foi significativamente mais afetada que as demais. Esse resultado é coerente com o fato de a cv CR ter apresentado o menor IT entre as 5 cultivares estudadas.

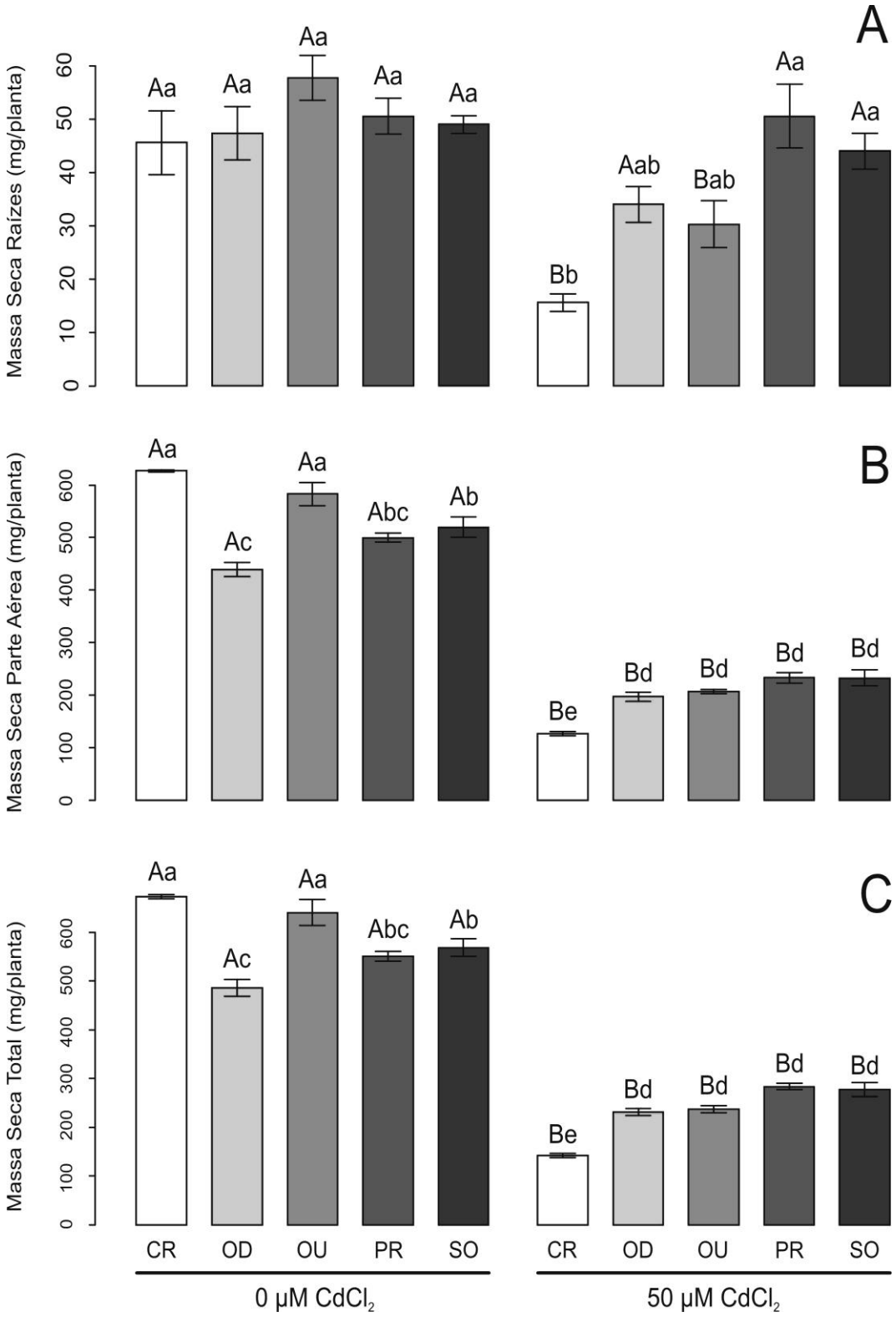

Figura 7 - Acúmulo de massa seca das cultivares na ausência e presença de Cd. A) massa seca do sistema radicular. B) massa seca da parte aérea. C) massa seca total. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.8 Acúmulo relativo de Cd nos tecidos

As plantas utilisadas para avaliação do peso de massa seca foram separadas em raízes, caules e folhas para quantificação de Cd em cada um destes tecidos. A quantificação de Cd para o controle (0 µM de $CdCl_2$) não será apresentada nos gráficos, pois não foram encontrados valores significativos deste metal nos tecidos de raiz (1,31 ± 0,19 µg/g), caule (0,18 ± 0,11 µg/g) e folhas (0,48 ± 0,07 µg/g). Entretanto, para o tratamento com 50 µM de $CdCl_2$, foram encontradas diferenças significativas no acúmulo de Cd entre as cultivares avaliadas, nas raízes, caules e folhas (figura 8), sendo que o maiores valores foram encontrados nas raízes, de forma similar ao que é observado para diversas outras plantas (RAMOS et al., 2002; GREGER; LÖFSTEDT, 2004; UTMAZIAN et al., 2007).

Em relação às raízes, as cultivares CR e OD foram as que mais acumularam Cd neste tecido, enquanto a cv OU foi a que apresentou menor acúmulo. As demais mostraram-se com valores intermediários (figura 8A). Nos caules, a cv CR foi única que apresentou quantidades de Cd significativamente maiores em relação às demais, para as quais esses valores de acúmulo foram muito similares (figura 8B). O acúmulo de Cd nas folhas só foi significativamente diferente entre as cultivares CR e PR, sendo que as demais apresentaram valores intermediários (figura 8C). De forma geral, observa-se uma tendência de maior acúmulo de Cd na cv CR tanto em raízes, caule e folhas, indicando que provavelmente o metal está sendo absorvido com mais facilidade por esse genótipo.

O somatório das quantidades de Cd nos tecidos nos mostra a quantidade total de Cd acumulado, considerando uma amostra da planta toda, a partir do qual, podemos verificar com maior clareza as diferenças entre os genótipos (figura 9A). Observamos que a cv CR, que destacou-se como a menos tolerante, foi a que mais acumulou Cd de forma geral, enquanto a cv OU foi a que menos acumulou Cd nos tecidos. As demais apresentaram valores intermediários.

A maior concentração de Cd ocorreu nas raízes das plantas, como esperado, uma vez que esse órgão é o responsável pela absorção do metal, ficando em contato com este. É necessário agora verificar qual fração do total de Cd absorvido pelas raízes é translocada para a parte aérea das plantas (caule e folhas), por meio do cálculo do Índice de Translocação (ITr), o qual é dado pela fórmula:

$$ITr = \frac{Acúmulo\ de\ Cd\ Parte\ Aérea}{Acúmulo\ de\ Cd\ Total} \times 100$$

O ITr das cultivares é apresentado na figura 9B.

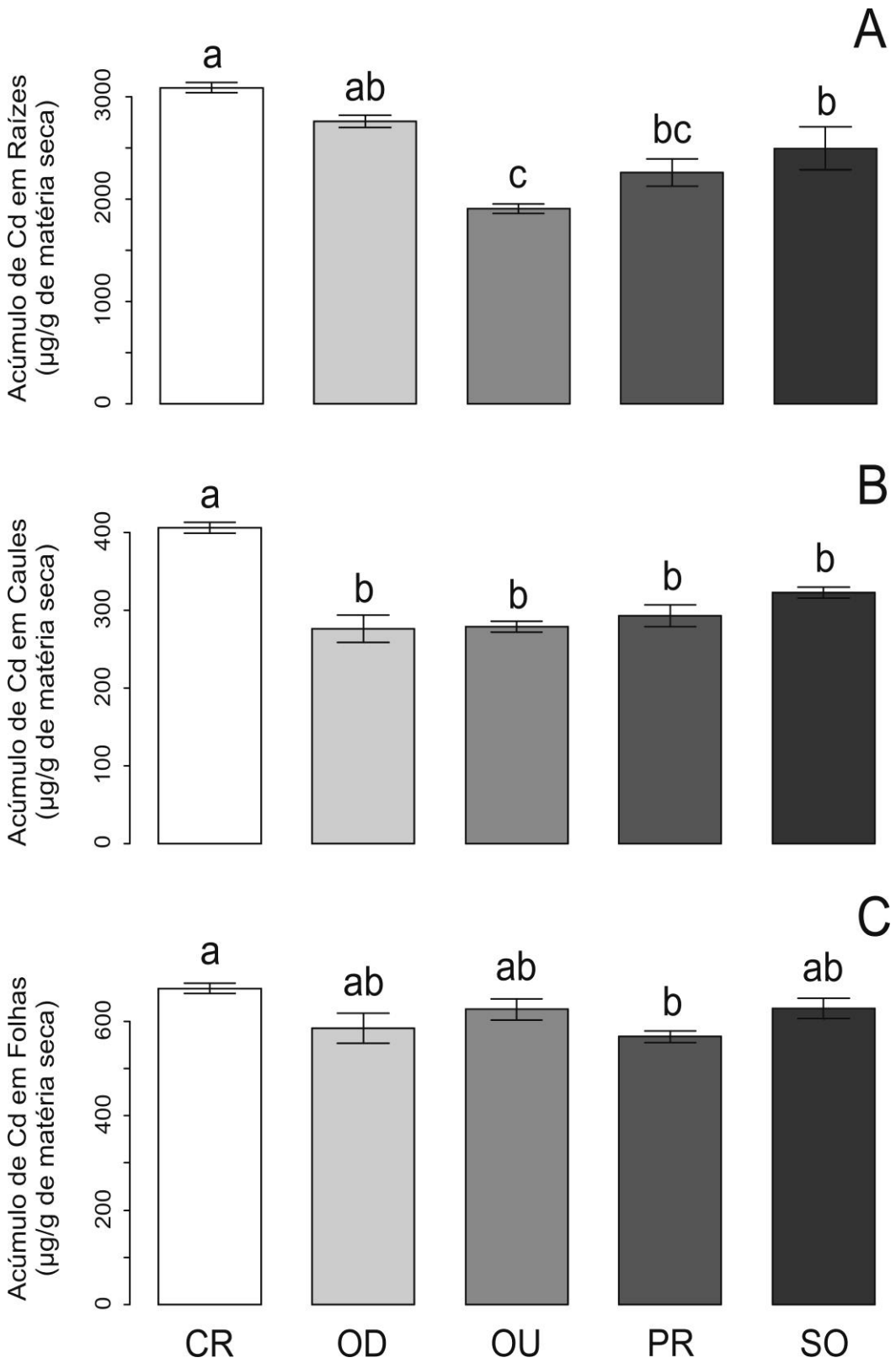

Figura 8 - Acúmulo de Cd em diferentes tecidos de cultivares de tomateiro. A) acúmulo de Cd nas raízes. B) acúmulo de Cd no caule. C) acúmulo de Cd nas folhas. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

O ITr representa uma medida relativa que evidencia a distribuição do metal entre sistema radicular e a parte aérea da planta. Assim, cada genótipo provavelmente possui uma diferente capacidade de absorver e translocar Cd para os tecidos. A figura 9 evidencia e destaca que as cultivares possuem comportamentos distintos, sem correção ($r = -0,48$; $p>0,05$) entre o ITr e o acúmulo total de Cd nas cultivares avaliadas. Embora tenham sido identificadas diferenças significativas no ITr entre as cultivares, a magnitude de tais diferenças é relativamente baixa. A maior diferença em relação às demais cultivares foi observada na cv OU, que apresentou o maior ITr, sendo a que menos acumulou Cd nos tecidos (figura 9). O próprio ITr pode auxiliar a explicar o menor acúmulo e menor tolerância da cv OU, uma vez que o metal foi translocado com maior facilidade para a parte aérea, é provável que os danos nestes tecidos também tenham sido maiores, ocasionando o menor desenvolvimento da planta como um todo, o que o explica a grande redução na massa seca desta cv quando comparado a seu controle, conduzindo, consequentemente a um baixo IT.

Esse padrão de reposta também foi observado na cv CR. Porém, neste caso, esta cv destacou-se como sendo a mais sensível ao Cd, e foi a que mais acumulou Cd de forma geral, sendo que os maiores valores foram encontrados em raízes e caule. Tanto na cv OU quanto na cv CR, a maior sensibilidade ao Cd parece estar relacionada à maior absorção deste pelas raízes, sendo que aparentemente elas são menos seletivas quanto à entrada deste metal.

De forma oposta, vemos que a cv PR que mostrou-se a mais tolerante é cv que menos acumulou Cd nos tecidos de folhas, sendo também uma das que menos acumulou Cd nas raízes. Assim, a maior tolerância da cv PR poderia estar associada à menor absorção de Cd pelas raízes, que seriam então mais seletivas a este cátion. Já as cultivares OD e SO aparentemente seguem um padrão similar ao padrão descrito para a cv PR.

De modo complementar, o acúmulo e translocação de Cd para os tecidos das plantas precisa ser estudado em relação ao próprio crescimento destas, visando determinar a quantidade total do metal acumulada em cada órgão, correlacionando tais resultados com o incremento de massa seca dos indivíduos.

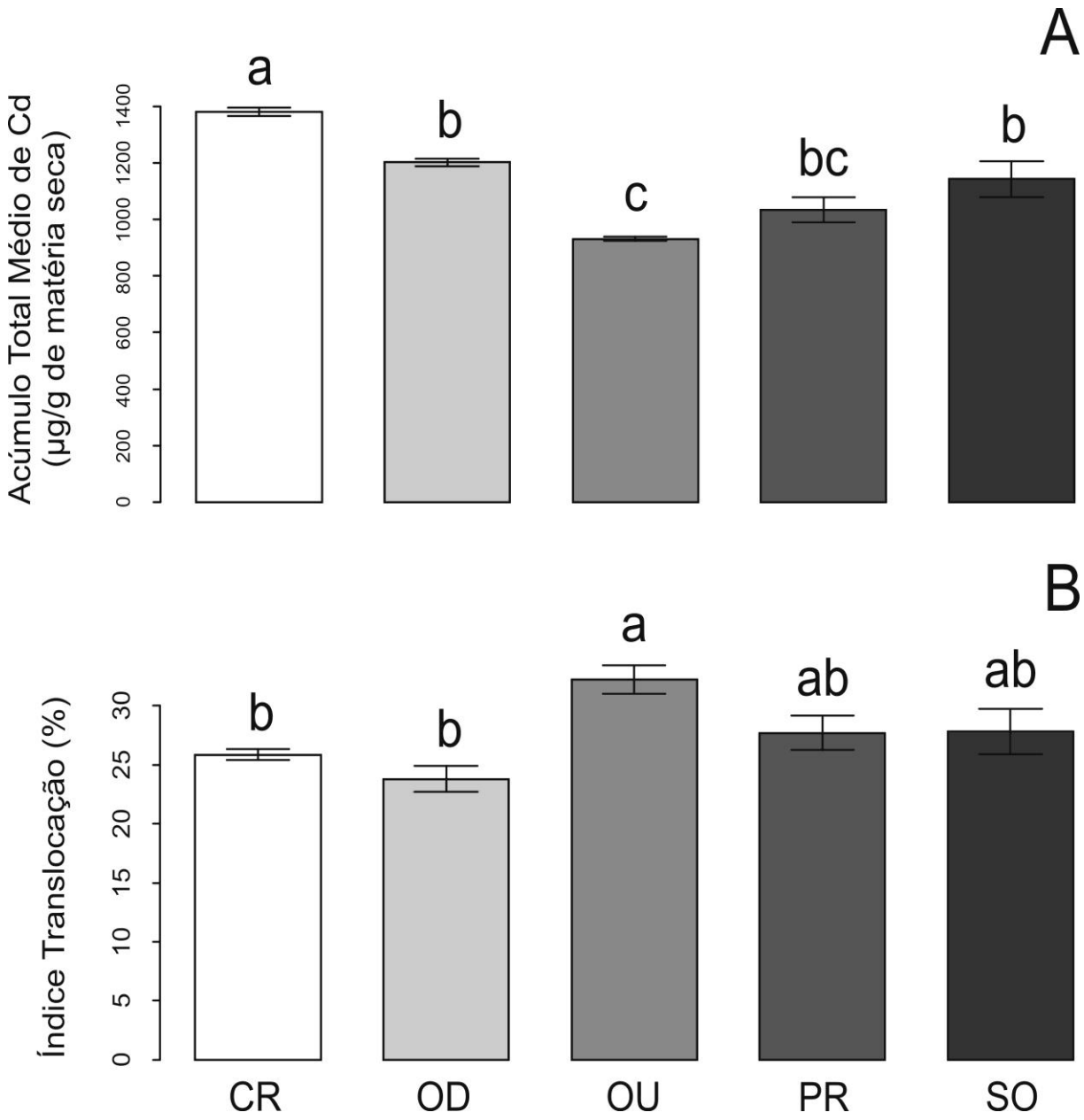

Figura 9 - Quantificação do Cd nas plantas. A) Acúmulo total de Cd nas plantas. B) Índice de translocação do Cd para parte aérea. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.9 Acúmulo total de Cd nos tecidos

A análise de acúmulo de Cd nos tecidos foi realisada considerando a mesma quantidade destes em cada amostra (µg de Cd/mg de tecido). No entanto, torna-se necessário saber qual a quantidade de Cd que realmente foi fixada em todo sistema radicular e na parte aérea, usando os dados de massa seca e acúmulo do metal nestes órgãos. Finalmente, estes resultados são apresentados na figura 10.

A cv CR foi a que mais acumulou Cd por unidade de tecido de raízes (figura 8A), mas também foi a cv que mais sofreu com o efeito do Cd neste órgão, pois a redução na biomassa do sistema radicular foi extremamente significativa nessa cultivar, em relação às demais. Crescendo menos, a quantidade total de Cd fixada nestes tecidos foram bem menores (figura 10A), embora a quantidade total por unidade de tecido tenha sido elevada. Da mesma forma, a cv OU também apresentou menor acúmulo no total de Cd no sistema radicular em relação às demais cultivares (figura 10A). Porém, as raízes da cv OU se desenvolveram significativamente mais na presença do Cd, quando comparadas com as raízes da cv CR (figura 7A), o que explica o fato da cv OU ser a que apresentou menor acúmulo Cd por unidade de tecido (figura 8A). De forma análoga, as cultivares PR e SO foram as que mais acumularam Cd em todo so sistema radicular (figura 10A), o que já era esperado, uma vez que as raízes dessas cultivares foram as que mais cresceram na presença do metal.

Já em relação à parte aérea, as cultivares PR e SO também foram as que mais acumularam Cd (figura 10B), embora o acúmulo do metal no sistema radicular também tenha sido maior em comparação com as demais (figura 10A). Novamente, a cv CR foi a que menos acumulou Cd na parte aérea, provavelmente devido ao fato de as raízes serem bastante afetadas pelo metal, reduzindo assim além da absorção, também a translocação deste para os outros órgãos. Por fim, o acúmulo total de Cd (figura 10C) seguiu o mesmo padrão do acúmulo no sistema radicular, onde as cultivares OD, PR e SO foram as que mais absorveram e acumularam Cd na planta toda, em contraste com as cultivares CR e OU que acumularam relativamente menos Cd.

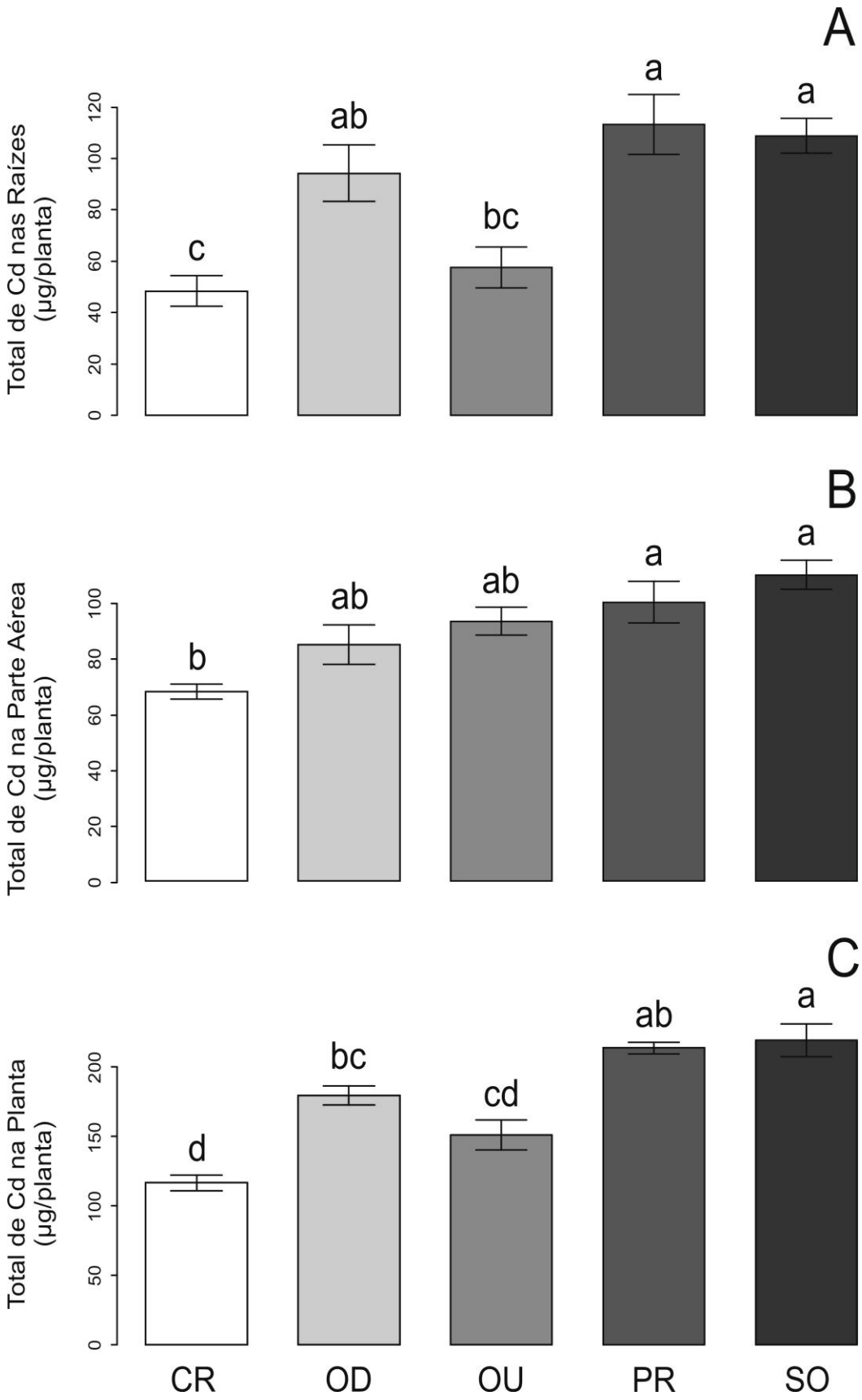

Figura 10 - Acúmulo total de Cd nas plantas. A) Acúmulo total de Cd no sistema radicular. B) Acúmulo total de Cd na parte aérea. C) Acúmulo total de Cd na planta. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Notoriamente, o acúmulo total de Cd nas plantas (µg/planta) seguiu praticamente o mesmo padrão de tolerância entre as cultivares (figura 6B). Provavelmente, as cultivares OD, PR e SO possuem mecanismos de tolerância, de tal forma que a maior parte do metal fica retido nas raízes, pois essas 3 cultivares foram as que mais acumularam Cd nesse órgão. Adicionalmente, temos que estas 3 mesmas cultivares também foram as únicas que não apresentaram redução significativa no pedo da massa seca do sistema radicular quando expostas ao Cd, ou seja, as raízes continuaram a crescer quase normalmente na presença do metal, fato este que não ocorreu com as cultivares CR e OU, que mostraram-se como menos tolerantes. Já em relação ao acúmulo total deste metal na parte aérea das plantas, era esperado que as cultivares mais tolerantes acumulassem um pouco mais de Cd nestes tecidos, pois em geral elas também cresceram e se desenvolveram mais, acumulando mais massa seca, o que levou, consequentemente, ao sensível aumento no total de metal acumulado na parte aérea destas cultivares.

Quando comparamos a anatomia de raízes de cv mais sensível (CR) e das mais tolerante (PR), verificamos que a cv mais sensível sofreu alterações nas células da endoderme (figura 11A), as quais são responsáveis pela barreira do fluxo radial apoplastico de água e íons para o xilema, bem como de elementos tóxicos, incluindo o Cd (GIERTH et al, 1999; SEREGIN, KOZHEVNIKOVA, 2008). A ruptura das células da endoderme na presença de Cd pode ser um indicativo, bem como pode auxiliar a explicar o fato de as raízes da cv CR serem tão afetadas por esse metal. Além disso, danos à endoderme certamente reduzem a ccapacidade seletividade ao Cd, facilitando sua translocação via xilema, para a parte aérea das plantas, ocasionando danos ainda maiores nestes órgaos. Por outro lado, observamos que os tecidos de raízes da cv PR (mais tolerante ao Cd), não sofreu qualquer tipo de alteração ou lesão na presença do metal, o que também possibilida explicar sua maior tolerância.

O somatório destes resultados nos fornece evidências de que as diferenças na tolerância entre as cultivares pode ser devida, em grande parte, a mecanismos de tolerância presentes no sistema radicular. Uma vez que a raiz é o órgão com maior contato com os metais pesados presentes no solo, formando a primeira linha de defesa das plantas contra esses elementos tóxicos, por meio de mecanismos de absorção seletiva realizadas pela endoderme (WHITE, 2001) e produção de exudatos (VERKLEIJ; SCHAT, 1990; WAGNER, 1993) que interagem com metais presentes no solo ou solução nutritiva. As diferenças morfológicas e a produção de exutatos radiculares, provavelmente devem conferir diferentes graus de sensibilidade ao Cd entre cultivares.

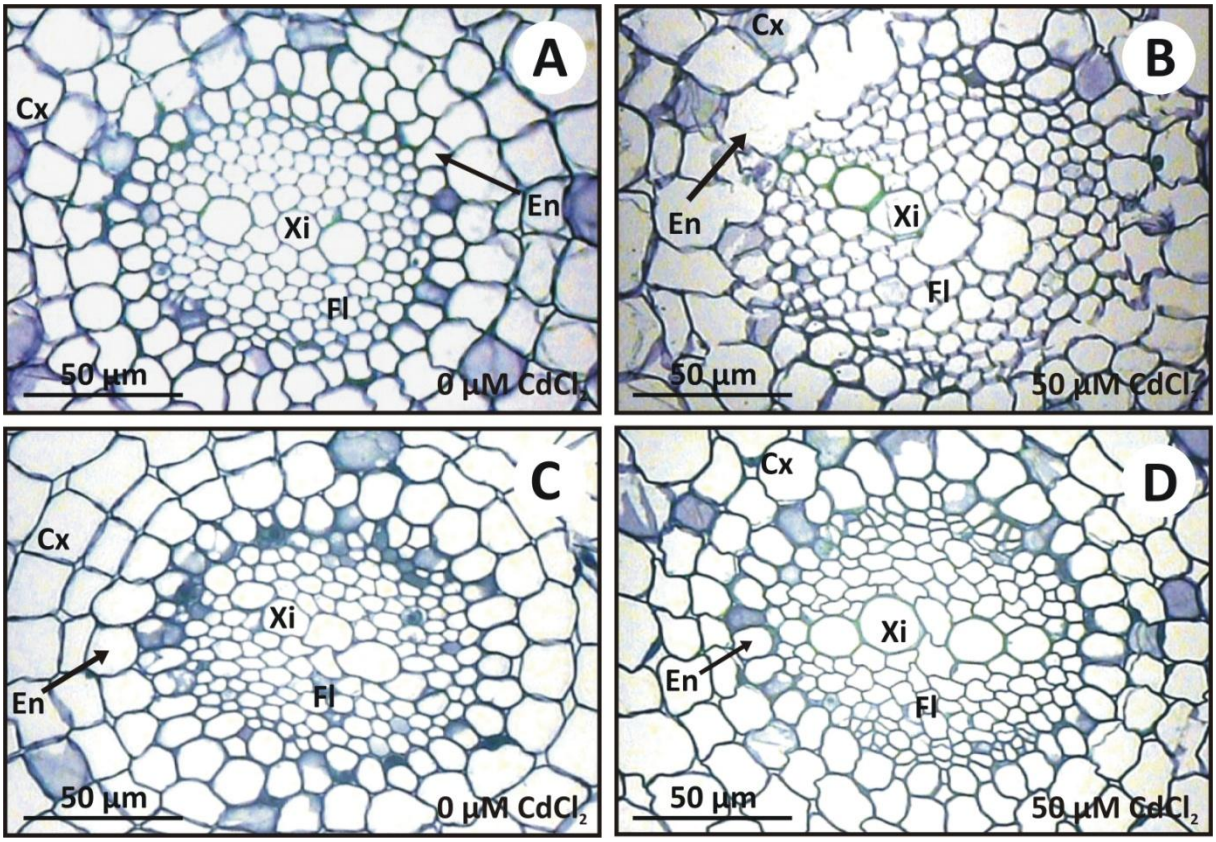

Figura 11 - Cortes transversais de raízes de tomateiro, das cultivares CR (A e B) e PR (C e D), na ausência (A e C) ou presença de 50 µM de $CdCl_2$ (B e D), evidenciando rachaduras na endoderme das raízes da cv CR exposta ao metal (B). Cx = Córtex; En = Endoderme; Fl = Floema; Xi = Xilema

A tolerância ou sensibilidade ao Cd nas plantas de tomateiro seria, assim, função da ação conjunta de mecanismos fisiológicos e moleculares, envolvidos na absorção e acúmulo deste metal. Embora o estudo de tais mecanismos não tenham sido contemplados neste trabalho, a avalição de tolerância ao Cd entre cultivares, nos permitiu identificar acessos mais tolerantes e mais sensíveis a este metal, os quais podem ser aplicados em trabalhos visando estudar com mais detalhes os fatores envolvidos na resposta de tolerância Cd em tomateiro.

3.4 Conclusões

Os parâmetros para determinação da tolerância ao Cd em cultivares de tomateiro dependem da fase de desenvolvimento das plantas, da dose utilizada de metal e do tempo de exposição dos indivíduos a este fator estressante. Assim, nosso estudo sobre tolerância ao Cd em cultivares de tomateiro permitiu concluir:

1) As cultivares de tomateiro avaliadas apresentaram diferentes níveis de tolerância ao Cd, indicando a existência de variabilidade genética suficiente para selecionar acessos mais tolerantes ou mais sensíveis a este metal.

2) A avaliação em fase de plântulas com 20 a 30 dias, sob cultivo em solução nutritiva, mostrou-se eficiente para detectar diferenças de tolerância entre cultivares.

3) O Índice de Tolerância (IT) proposto neste trabalho foi eficiente para identificar diferenças entre cultivares genética e morfologicamente distintas. O IT é mais informativo quando calculado com base nas variações de redução no peso da massa seca de plantas expostas a doses que, em média, reduzem o crescimento das plantas em 50%, onde o IT médio ficaria perto ITm = 0,5. Neste estudo, a faixa de doses mais adequada foi a de 20,76 a 53,15 µM de $CdCl_2$, cuja média ideal seria de 36,96 µM de $CdCl_2$ (DR50).

4) Existem fortes evidências que indicam que as diferenças de tolerância entre as cultivares estão ligadas à interação do sistema radicular com o metal em questão, sendo que o desenvolvimento das raízes, o acúmulo de Cd nestes tecidos e o Índice de Tolerância seguiram o mesmo padrão de resposta à presença deste metal. Adicionalmente, a constatação de lesões na endoderme da cv CR, em presença de Cd, sugere que a maior sensibilidade desta cultivar, pode ser devida à redução na seletividade de absorção a este metal. Assim, as variações no desenvolvimento da parte aérea seriam uma consequência secundária dos efeitos primários causados no sistema radicular.

5) A avaliação sintomática de clorose (mensurada em unidades SPAD) não foi eficiente como parâmetro para determinar as variações de tolerância entre cultivares de tomateiro, expostas a doses mais elevadas de Cd.

6) Com base no Índice de Tolerância, foi possível selecionar dois acessos contrastantes quanto à resposta ao Cd, os quais podem ser utilizados em estudos visando entender os mecanismos morfológicos, genéticos, fisiológicos e bioquímicos de tolerância do tomateiro a este metal pesado.

Referências

AKAIKE, H. A. New look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, New York, v.19, p.716-723, 1974.

ARAO, T.; SUGIYAMA, N. A. M.; TAKAHASHI, M. Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. **Plant and Soil**, The Hague, v. 251, p. 247-253, 2003.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 9, p. 415-415, 1991.

BACCOUCH, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v.36, p. 689-694, 1998.

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 21-34, 2005.

CETESB. **Valores orientados para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo**. São Paulo, 2005. 4 p.

CHOUDHARY, A. K.; SINGH, D.; IQUEBAL, M. A. Selection of pigeonpea genotypes for tolerance to aluminium toxicity. **Plant Breeding,** Westport, v. 130, p. 492-495, 2011.

COURBOT, M.; WILLEMS, G.; MOTTE, P.; ARVIDSSON, S.; ROOSENS, N.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VERBRUGGEN, N. A Major Quantitative Trait Locus for Cadmium Tolerance in *Arabidopsis halleri* Colocalizes with HMA4, a Gene Encoding a Heavy Metal ATPase. **Plant Physiology**, Washington, v. 144, p. 1052-1065, 2007.

DAI, H.; SHAN, W.; ZHAO, J.; ZHANG, G.; LI, G.; WU, F. Difference in response to aluminum stress among Tibetan wild barley genotypes. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science,** New York, v. 174, p. 952-960, 2011.

DJEBALI, W.; HÉDIJI, H.; ABBES, Z.; BARHOUMI, Z.; YAAKOUBI, H.; OULILA ZOGHLAMI, L.; CHAÏBI, W. Aspects on growth and anatomy of internodes and leaves of cadmium-treated *Solanum lycopersicum* L. plants. **Journal of Biological Research**, Thessaloniki, v. 13, p. 75-84, 2010.

DOMÍNGUEZ-SOLÍS, J. R.; LÓPEZ-MARTÍN, M. C.; AGER, F. J.; YNSA, M. D.; ROMERO, L. C.; GOTOR, C. Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana.* **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 2**,** p. 469- 476, 2004.

DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Effect of cadmium on growth ond photosynthesis of tomato seedling. **Journal of Zhejiang University Science**, Zheda Road v. 10, p. 974-980, 2005.

FILLATTI, J. J.; KISER, J.; ROSE, R.; COMAI, L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. **Nature Biotechnology**, New York, v.5, n.7, p.726-730, 1987.

FOOLAD, M. R. Genome mapping and molecular breeding of tomato. **International journal of plant genomics**, Nasr City, v.1, p. 1-52, 2007.

GALLARDO, F.; BORIE, F.; ALVEAR, M.; VON BAER, E. Evaluation of aluminum tolerance of three barley cultivars by two short-term screening methods and field experiments. **Soil Science and Plant Nutrition,** Tokyo, v. 45, p. 713-719, 1999.

GIERTH. M.; STELZER. R.; LEHMANN, H. An analytical microscopical study on the role of the exodermis in apoplastic Rb+(K+) transport in barley roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 207, p. 209-218, 1999.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ANTUNES, A. M.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R.A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress**. Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, p. 321-333, 2008.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Warwick, v.32, p.481-494, 2005.

GREGER, M.; LÖFSTEDT, M. Comparison of Uptake and Distribution of Cadmium in Different Cultivars of Bread and Durum Wheat. **Crop Science**, Madison, v.44, p.501-507, 2004.

HAGHIRI, F. Cadmium uptake by plants. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 2, p. 93-95, 1973.

HART, J. J.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. A.; SULLIVAN, L. A.; KOCHIAN, L. V. Characterization of Cadmium Binding, Uptake, and Translocation in Intact Seedlings of Bread and Durum Wheat Cultivars. **Plant physiology**, Washington, v. 116, p. 1413-1420, 1998.

HASSAN, M. J.; SHAO, G.; ZHANG, G. Influence of Cadmium Toxicity on Growth and Antioxidant Enzyme Activity in Rice Cultivars with Different Grain Cadmium Accumulation. **Journal of Plant Nutrition,** New York, v. 28, p.1259-1270, 2008.

HEDE, A. R.; SKOVMAND, B., RIBAUT, J. M.; LEÓN, D. G.; STOLEN, O. Evaluation of aluminium tolerance in a spring rye collection by hydroponic screening. **Plant Breeding,** Westport, p. 121, p. 241-248, 2002.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Univ. California agric. Exp. Sta., 1950, 32 p.

HU, S. W.; BAI, G. H.; CARVER, B. F.; ZHANG, D. D. Diverse Origins of Aluminum-resistant Sources in Wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.118, p. 29–41, 2008.

KHAN, A. A.; McNEILLY. Variability in aluminium and manganese tolerance among maize accessions. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.45, p.525-531, 1998.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

LÓPEZ-MILLÁN, A.-F.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.65, p.376-385, 2009.

MA, J. F.; ZHENG, S. F.; LI, X. F.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, H. A rapid hydroponic screening for aluminium tolerance in barley. **Plant and Soil**, The Hague, v. 191**, p.** 133-137, 1997.

McCORMICK, S.; NIEDERMEYER, J.; FRY, J.; BARNASON, A.; HORSCH, R.; FRALEY, R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens.* **Plant Cell Reports**, Berlin, v.5, p.81-84, 1986.

MENDA, N.; SEMEL, Y.; PELED, D.; ESHED, Y.; ZAMIR, D. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 861-872, 2004.

MILLER, J. C.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of philogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, p. 437-448, 1990.

MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H.; MENCH, M. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities. **Plant and Soil**, The Hague, v. 182, p. 287-300, 1996.

NARASIMHAMOORTHY, B.; BOUTON, J. H.; OLSEN, K. M.; SLEDGE, M. K. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminum tolerance in diploid alfalfa**.** **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, p. 901–913, 2007.

OSKARSSON, A.; LINDEN, A.; OLSSON, I. M.; PETERSSON, K. Cadmium in food chain and health effects in sensitive population groups. **BioMetals**, London, v.17, p.531‑534, 2004.

PAN, X. B.; ZHU, C.; CHENG, C. Assessment of techniques for screening alfalfa cultivars for aluminium tolerance. **Euphytica**. Wageningen, v. 164, p. 541-549, 2008.

PETERSON, D. G.; PEARSON, W. R.; STACK, S. M. Characterization of the tomato (*Lycopersicon esculentum*) genome using in vitro and in situ DNA reassociation. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 346-356, 1998.

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

RAMAN, H.; RAHMAN, R.; LUCKETT, D.; RAMAN, R.; BEKES, F.; LÁNG, L.; BEDO, Z. Characterization of genetic variation for aluminium resistance and polyphenol oxidase activity in genebank accessions of spelt wheat. **Breeding Science,** Tokyo, v. 59, p. 373-381, 2009.

RAMOS, I., ESTEBAN, E., LUCENA, J. J., GÁRATE, A. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. **Plant Science**, Limerik, v.162, p.761-767, 2002.

RICK, C. M.; YODER, J. I. Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives. **Annual review of genetics,** Palo Alto, v. 22, p. 281-300, 1988.

RINGO, J. H.; MNENEY, E. E.; ONKWARE, A. O.; WERE, B. A.; TOO, E. J.; OWUOCHE, J. O.; GUDU, S. O. Tolerance to aluminium toxicity in tanzanian sorghum genotypes. **African Crop Science Journal**, Grahamstown v. 18, p. 155-164, 1988.

RODRIGUEZ, M. N. R.; GONZÁLEZ, G. A.; SANTELISES, A. A.; BARRA. J. D. E.; RINCÓN, J. A. S. Estimación de la concentración de nitrogenio y clorofila em tomate mediante un medidor portátil de clorofila. **Revista Terra**, Chanpingo, v. 16, p.135-141, 1998.

SAEIDI, G.; RICKAUER, M.; GENTZBITTEL, L. Tolerance for cadmium pollution in a core-collection of the model legume, *Medicago truncatula* L. at seedling stage. **Australian Journal of Crop Science**, London, v. 6, p. 641-648, 2012.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Biotechnical and Histochemistry**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

SALT, D. E.; PRINCE, R. C.; PICKERING, I. J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Washington, v.109, p.1427-1433, 1995.

SEREGIN, I. V., IVANOV, V. B. Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 44, p. 791-796, 1997.

SHAMSI, I. H.; WEI, K.; ZHANG, G. P.; JILANI, G. H.; HASSAN, M. J. Interactive effects of cadmium and aluminum on growth and antioxidative enzymes in soybean. **Biologia plantarum**, Praha, v. 52, p. 165-169, 2008.

SHAO, G.; CHEN, M.; WANG, W.; MOU, R.; ZHANG, G. Iron nutrition affects cadmium accumulation and toxicity in rice plants. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 53, p. 33–42, 2007.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, p. 591-611, 1965.

STODART, B. J.; RAMAN, H.; COOMBES, N.; MACKAY, M. Evaluating landraces of bread wheat *Triticum aestivum* L. for tolerance to aluminium under low pH conditions. **Genetic Resources and Crop Evolution,** Dordrecht, v. 54, p.759-766, 2007.

THIEBEAULD, O.; SOLER, S.; RAIGÓN, M. D.; PROHENS, J.; NUEZ, F. Variation among Solanaceae crops in cadmium tolerance and accumulation. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 25, p. 237-241, 2005.

UTMAZIAN, M. N. S.; WIESHAMMER, G.; VEGA, R.; WENZEL, W. W. Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. **Environmental Pollution**, Barking, v.148, p.155-165, 2007.

VERKLEIJ, J. A. C., SCHAT, H. In: Mechanisms of metal tolerance in higher plants. in Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. In: SHAW, A. J. (ed.) **Heavy Metal Tolerances in Plants:** Evolutionary Aspects, Florida: CRC Press, 1990. p. 179-193.

VILLAGARCIA, M. R.; CARTER JR., T. E. ; RUFTY, T. W.; NIEWOEHNER, A. S.; JENNETTE, M. W.; ARRELLANO, C. Genotypic Rankings for Aluminum Tolerance of Soybean Roots Grown in Hydroponics and Sand Culture**. Crop Science,** Madison, v. 41, p. 499-1507, 2001.

WAGNER, G. J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in agronomy**, San Diego, v.51, p.173-212, 1993.

WANG, X.; SONG, Y.; MAC, Y.; ZHUO, R.; JIN, L. Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (Medicago sativa L.). **Environmental Pollution,** Barking, v. 159, p. 3627-3633, 2011.

WHITE, P. J. The pathways of calcium movement to the xylem. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.891-899, 2001.

WILKINS, D. A. A technique for measurement of lead tolerance in plants. **Nature**, London, v.180, p.37-38, 1957.

YOSHIHARA, T.; HODOSHIMA, H.; MIYANO, Y.; SHOJI, K.; SHIMADA, H.; GOTO, F. Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 365–373, 2006.

ZAGORSKA, N. A.; SHTEREVA, L. A.; KRULEVA, M. M.; SOTIROVA, V. G.; BARALIEVA, D. L.; DIMITROV, B. D. Induced androgenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). III. Characterization of the regenerants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 22, p. 449-456, 2004.

ZHANG, G.; FUKAMI, M.; SEKIMOTO, H. Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. **Journal of Plant Nutrition,** New York, v. 23, p. 1337-1350, 2006.

ZHOU, L. L.; BAI, G. H.; CARVER, B.; ZHANG, D. D. Identification of new sources of aluminum tolerance in wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v.297, p.105-118, 2007.

4 ANÁLISE COMPARATIVA DO METABOLISMO OXIDATIVO ENTRE CULTIVARES DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.) CONTRASTANTES QUANTO À TOLERÂNCIA AO CÁDMIO

Resumo

As diferenças de tolerância ao Cádmio (Cd) encontradas entre cultivares de tomateiro provavelmente são devidas a uma série de diferenças que são relativas a alterações em nível celular, envolvendo a expressão diferencial de determinados genes, resultando em alterações no metabolismo, fisiologia e morfologia das plantas, que em conjunto vão determinar o grau de tolerância das cultivares ao fator estressante em questão. Neste trabalho, avaliamos as diferenças no metabolismo oxidativo das cultivares Calabash Rouge (CR) e Pusa Ruby (PR), caracterizadas como sendo mais sensível e mais tolerante ao Cd, respectivamente, expondo estes tomateiros às doses de 0, 25 e 100 µM de $CdCl_2$. Assim, foram quantificadas as concentrações de H_2O_2 e malondialdeído (MDA), em tecidos de folhas e raízes de ambas as cultivares, além da avaliação do perfil proteico e da atividade de SOD, CAT e GR, as quais são enzimas chave no sistema antioxidante celular. Adicionalmente, foram também avaliadas as taxas de crescimento, Índice de Tolerância (IT) e acúmulo de Cd nas plantas. Nossos resultados confirmaram as diferenças de tolerância entre as cultivares CR e PR, sendo a cv PR maior apresentou IT em ambas as doses de Cd. Foi observada também uma tendência de maior acúmulo de Cd nos tecidos de folhas, caules e raízes da cv CR. Quanto ao perfil de proteínas das cultivares, foi possível identificar diversas alterações que refletiam as próprias diferenças genéticas entre as cultivares, havendo porém, grandes variações entre elas na presença do Cd. Umas alterações mais marcantes nas proteínas, foi relativa à redução acentuada na Rubisco em tecidos de folhas da cv CR, mostrando que essa cultivar foi severamente afetada pelo Cd. A cv CR também apresentou maiores níveis de H_2O_2 e MDA, do que a cv PR, o que indica maiores níveis de estresse nesta cultivar. Por outro lado, a dose de 25 µM de $CdCl_2$ não foi suficiente para causar estresse oxidativo significativo na PR, mais tolerante ao Cd. Como consequência do estresse, houve aumento nas atividades das enzimas SOD, CAT e GR, as quais mostram também variações no padrão de isoformas em resposta ao estresse causado pelo Cd. Dentre essas enzimas, a diferença mais marcante foi a ausência de alteração na atividade da GR em folhas de cv PR, mesmo na dose mais alta de Cd. De forma geral, não encontramos evidências indicando que as diferenças de tolerância ao Cd observadas entre as cultivares PR e CR estejam associadas à maior eficiência do metabolismo oxidativo referente à atividade das enzimas SOD, CAT e GR. Porém, tais diferenças nas atividades enzimáticas e níveis de H_2O_2 podem indicar uma reposta de sinalização celular, a qual poderia estar relacionada a ativação de fatores de transcrição que induziriam às diferentes respostas na tolerância ao Cd aqui observadas.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes; Estresse oxidativo; Metais pesados; Estresse abiótico

Abstract

The differences in Cd-tolerance found among tomato cultivars probably are due to a number of differences, which are related to changes at the cellular level, involving the differential expression of genes, resulting in changes in metabolism, physiology, and morphology of plants. All changes together can be determinate the degree of tolerance of cultivars to heavy metal Cd. In this study, we evaluated the differences in the oxidative metabolism of cultivars Calabash Rouge (CR) and Pusa Ruby (PR), characterized as being

more sensitive and more tolerant to Cd, respectively, which were available in 0, 25 and 100 µM of $CdCl_2$. Thus, we quantified the concentrations of H_2O_2 and malondialdehyde (MDA) in tissues of leaves and roots of both cultivars, and evaluating the protein profile and activity of SOD, CAT and GR, which are key enzymes in cellular antioxidant system. We also evaluated the rates of growth, Tolerance Index (IT) and Cd accumulation in plants. Our results confirmed the differences in tolerance between cultivars CR and PR, because cv PR show IT higher then cv CR in both treatments with Cd. The Cd accumulation in the leaves tissues, stems and roots was higher in cv CR. The protein profile of the cultivars, showed several changes that reflected their own genetic differences between cultivars. A large difference was found in the presence of Cd related to Rubisco expression. Expression of Rubisco in leaf tissues of cv CR was severely affected by Cd under both doses of this heavy metal. The cv CR also showed higher levels of H_2O_2 and MDA compared to the cv PR, indicating higher levels of stress in CR cultivar. Moreover, the dose of 25 µM of $CdCl_2$ was not enough to cause significant oxidative stress in the PR, which is more tolerant to Cd. As a consequence of stress, an increase in the activity of SOD and CAT, GR, were observed show, accompanied of variations in pattern of isoforms in response to stress caused by Cd. Among these enzymes, the most striking difference was the absence of change in GR activity in leaves of cv PR, even in the highest dose of Cd. Overall, we found no evidences indicating that differences in Cd-tolerance, among cultivars PR and CR, are associated with a higher efficiency of oxidative metabolism on the activity of SOD, CAT and GR. However, these differences in enzyme activity and levels of H_2O_2 may indicate a response of cell signaling, which could be related to activation of transcription factors to induce different responses in Cd-tolerance system.

Keywords: Antioxidant enzymes; Oxidative stress; Heavy metals; Abiotic stress

4.1 Introdução

Todas as culturas agrícolas e demais espécies de plantas, ao crescerem em condições de campo, estão sujeitas ao efeito de interações com diversos fatores ambientais, tais como falta ou excesso de água, temperaturas muito elevadas ou muito reduzidas, excesso ou falta de nutrientes no solo, severidade de ataque de insetos e doenças, presença de elementos tóxicos no solo, entre outros. Quando esses fatores ocorrem nas proporções ideais para cada espécie vegetal, estas podem desenvolver seu potencial máximo de crescimento. Contudo, quando um ou mais destes fatores é fortemente alterado, as plantas são negativamente afetadas, tendo seu crescimento reduzido. Por esse motivo, é bastante comum encontrarmos diferenças no desenvolvimento e rendimento de produção das diversas culturas agrícolas, o qual é dado pela forma como estas respondem às variações de tais fatores, que dependendo da magnitude, pode causar o que chamamos de estresse vegetal.

Podemos definir o estresse em plantas como sendo a resposta a qualquer fator que limite o desenvolvimento dos indivíduos de forma temporária ou definitiva. Sendo assim, as plantas estão constantemente sujeitas a diversos tipos de estresse, sejam eles de origem biótica

ou abiótica (GRATÃO et al., 2008), os quais podem ter origens diversas, resultando em diferentes respostas metabólicas e fisiológicas nas plantas. Contudo, a resposta geral e mais evidente do efeito do estresse nos vegetais é a redução no crescimento, que é reflexo do impacto do fator estressante sobre o metabolismo das plantas. Isso acontece porque, uma vez sob estresse, os indivíduos precisam realocar recursos de seu metabolismo para combater o estresse e evitar que tais fatores levem à morte da planta (SKIRYCZ; INZÉ, 2010). Além disso, os próprios fatores estressantes, tais como metais pesados, podem agir causando danos sobre enzimas e proteínas importantes para o metabolismo celular, prejudicando o desenvolvimento dos indivíduos (HALL et al., 2002). Na ausência do estresse, as plantas cresceriam normalmente, pois seu metabolismo não sofreria de forma direta ou indireta com os efeitos danosos causados por um determinado agente estressante.

No caso do estresse causado pelo Cd, as plantas se desenvolvem menos por que este metal, ao ser assimilado pelos tecidos vegetais e entrar nas células das plantas, afeta várias proteínas e enzimas do metabolismo celular. Dentre elas, os principais alvos seriam as proteínas e enzimas que possuem em sua estrutura grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto. O Cd pode então oxidar esses grupos, destruindo as ligações dissulfeto, o que leva à desnaturação da proteína, tendo como consequência a redução ou perda da atividade enzimática (VAN ASSCHE; CLIJTERS, 1990). Além disso, o Cd pode afetar diretamente as enzimas que possuem algum metal semelhante a ele em sua estrutura (tamanho e cargas similares), substituindo estes metais nas enzimas (por exemplo, o Zinco), o que resulta na inibição da atividade enzimática (SHAW et al., 2004). Na verdade, o estresse é uma resposta geral relacionada a eventos que ocorrem em nível celular, afetando negativamente a estrutura e o aparato metabólico celular. Isso acontece porque as células possuem um equilíbrio em seu potencial redox, o qual mantém a homeostase celular, por meio de uma série de reações de oxidação e redução, que estão envolvidas tanto na sinalização celular quanto no processo de defesa contra moléculas danosas gerada pelo próprio metabolismo celular (MITTLER, 2002).

Assim, quando falamos em estresse em nível celular, estamos nos referindo ao desequilíbrio no potencial redox da célula, causado pela produção excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que são conhecidos como radicais livres. As EROs, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e oxigênio "singlet" (O_2^1), são produzidas de forma contínua em qualquer sistema vivo, como resultado da própria fotossíntese, respiração e outros processos importantes do metabolismo celular (ASADA, 1999). Por outro lado, as células possuem um sistema antioxidante enzimático e não

enzimático que transforma as EROs em elementos não nocivos, visando a proteção contra os possíveis danos celulares causados por essas moléculas (GRATÃO et al., 2005). O estresse pode acontecer quando as EROs são produzidas em quantidades muito elevadas, superando a capacidade do sistema antioxidante de eliminar esses elementos. Assim, o excesso de EROs leva ao estresse oxidativo, que consequentemente pode levar à danos nas estruturas celulares.

Naturalmente, plantas com diferentes níveis de tolerância a um determinado tipo de estresse, devem possuir diferentes respostas no metabolismo antioxidativo, seja pela alteração na atividade das enzimas antioxidantes e produção de metabólitos secundários (GILL; TUTEJA, 2010) ou por meio de mecanismos envolvendo a sinalização celular para ativação de genes de tolerância, mediada pelo próprio desequilíbrio no potencial redox das células (MITTLER, 2002). Por esse motivo, a proposta deste trabalho foi investigar o efeito do Cd sobre o metabolismo antioxidante das células, avaliando de forma conjunta as alterações fisiológicas e bioquímicas que afetam o desenvolvimento de cultivares de tomateiro contrastantes quanto à tolerância a este metal. Para tanto, avaliamos de forma conjunta, os parâmetros de crescimento, indicadores de estresse oxidativo e atividade das principais enzimas do sistema antioxidante celular, com o objetivo de entender melhor as principais alterações metabólicas que possam ajudar na compreensão dos mecanismos relacionados à maior ou menor tolerância de plantas de tomateiro ao Cd.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material vegetal

Foram utilizadas plântulas das cultivares Pusa Ruby (PR) e Calabash Rouge (CR), caracterizadas como sendo mais tolerante e mais sensível, respectivamente, ao Cd.

4.2.2 Estágio de avaliação e cultivo em solução nutritiva

As sementes das cultivares foram semeadas e germinadas em vermiculita em bandejas de germinação contendo 72 células. A nutrição na fase inicial de crescimento foi fornecida via irrigação com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) adaptada para tomateiros, à 10% da concentração adotada para plantas adultas. Em aproximadamente 14 dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para hidroponia (pH = 6,0 ± 0,1), contendo 10% da solução nutritiva total, a qual foi sendo aumentada em mais 10% a cada dois dias. Passados

7 dias de adaptação, a solução foi trocada por outra contendo concentração de 50% do total de sais, acrescida de Cd nas concentrações de 0, 25 e 100 µM de $CdCl_2$. O cultivo hidropônico foi feito em bandejas de plástico revestidas com sacos pretos, para evitar a entrada de luz. Cada bandeja recebeu 12 litros de solução nutritiva, a qual foi aerada usando um sistema de mangueiras de ar comprimido (gerado por um compressor de ar) acopladas a pequenas pedras porosas. As plântulas foram acondicionadas em um suporte feito de placa de isopor, com a ajuda de pequenos pedaços de espuma. O espaçamento adotado foi de 80 x 80 mm entre plantas (64 cm²/planta). A avaliação das plantas foi realizada 4 dias após a exposição ao metal

4.2.3 Massa seca e quantificação de Cd

Ao final dos 4 dias de exposição ao Cd, as plantas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em sacos de papel, sendo desidratas em estufa a 60 ºC até massa constante. No momento da aplicação, foram coletas 12 plantas de cada cultivar, as quais compuseram a massa seca média do tempo zero (T_0) do experimento. Todas as demais plantas do experimento, foram pesadas individualmente, avaliando-se a massa seca total, das raízes e da parte aérea. Estas mesmas plantas, após desidratadas, foram separadas em raízes, caules e folhas, e preparadas para a quantificação de Cd em cada tecido. A quantificação deste metal foi feita usando metodologia analítica de espectrometria de emissão ótica (ICP OES), encomendada ao Laboratório de Fertilizantes e Resíduos, Centro de P&D de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

4.2.4 Determinação do Índice de Tolerância (IT)

O índice de tolerância foi determinado pela fórmula:

$$IT = \frac{\left(ms_{f_i\ Cádmio} - ms_o\right)}{\left(ms_{f\ Controle} - ms_o\right)}$$

Onde:

IT = Índice de Tolerância

$ms_{f_i\ Cádmio}$ = Massa seca final da i-ésima planta exposta ao Cd

$ms_{f\ Controle}$ = Massa seca média final das plantas controle

ms_o = Massa seca média inicial das plantas

4.4.5 Delineamento experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram realizados em delineamento em delineamento fatorial inteiramente casualizado, com 6 repetições compostas de 2 plantas por parcela. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de probabilidade e erro. Os parâmetros dos modelos, tais como homogeneidade de variâncias e distribuição normal dos resíduos, foram checados usado o teste de Bartlett (BARTLETT, 1937) e Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965). Todas as análises foram realisadas usando o software R versão 2.14.2.

4.2.6 Extração e determinação de proteínas solúveis

Amostras de folhas e raízes de ambas as cultivares submetidas aos tratamentos (0, 25 e 100 µM de $CdCl_2$) foram coletadas e maceradas com nitrogênio líquido até formar uma farinha homogênea. Esse material foi usado para extração de proteínas (realizada a 4 ºC) utilizando um tampão de extração (1 g de tecido de folhas / 3 mL de tampão e 1 g de tecido de raízes / 2 mL de tampão). Os materiais vegetais foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% (p/v) de polivinilpirrolidona insolúvel (PVPP). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por

30 minutos à 4 ºC. O sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e estocado em freezer a -80 °C para análises posteriores. A concentração de proteína foi determinada conforme descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.2.7 Variações nos padrões proteicos

As variações nos padrões proteicos foram analisadas por eletroforese em sistema desnaturante, utilizando SDS-PAGE (MARTINS et al., 2011) e corados com Comassie-Blue. A eletroforese em sistemas SDS-PAGE é empregada em estudos de proteínas, o qual utiliza o agente dissociante dodecil sulfato de sódio (SDS) para desnaturá-las em subunidades. Além disso, a mistura de proteína com o tampão da amostra é aquecida para ocorrer a quebra de ligações dissulfeto. Para confecção dos géis desnaturantes (10% poliacrilamida) foi utilizado o seguinte protocolo:

Gel de resolução: 5,0 mL de uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida da Sigma, 5 mL de Tampão TRIS 2,9 M, pH 8,9, 200µL de SDS (10%) e 10,0 mL de água. Como catalisadores foram utilizados 38 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônia (1%).

Gel de empilhamento: após a polimerização do gel de resolução, foi adicionada uma solução composta por 1 mL da solução 40% de acriamida/bis-acrilamida (Sigma) citada anteriormente, 2,5 mL de Tampão TRIS 500 mM, pH 6,8, 100µL de SDS (10%) e 5,5 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 20µL de TEMED e 100µL de persulfato de amônio (1%).

Após polimerização, foram aplicados aos géis de SDS-PAGE os volumes das amostras correspondentes a concentração de 20µg de proteína. O volume da amostra é aplicado juntamente com o tampão de amostra (3,0 mL de H_2O destilada, 1,0 mL de tampão de empacotamento, 1,6 mL de glicerol, 1,6 mL de SDS (10%), 0,4 mL de solução 0,5% de azul de bromofenol e 0,4 mL de mercaptoetanol), na proporção de 1:1. As condições gerais de corrida foram definidas nos ensaios preliminares para obtenção de géis com alta resolução. Os géis foram corridos a uma corrente constante de 15 mA por placa, com tampão de eletrodo constituído por TRIS 250mM, pH 8,3 acrescido de 1,92 M de glicina e 1% de SDS (10%). Posteriormente, os géis foram corados com Comassie-Blue.

4.2.8 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). As amostras frescas de folhas e raízes foram maceradas com de TCA 0,1% na relação de 100 mg/mL (w:v). Após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min, a 4ºC. Do sobrenadante, foi retirado 200 μL ao qual foi adicionado 200 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μL de solução 1 M de iodeto de potássio. Os tubos com a reação foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras permaneceram no escuro por 20 min, porém em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em μmol/g de tecido fresco.

4.2.9 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada pela produção de malonaldeído (MDA), que é um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), usando protocolo adaptado de Health e Packer (1968). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 100 mg/mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. Do sobrenadante, foi retirado 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min a 95 ºC, sendo resfriada no gelo imediatamente após esse período.As amostras foram novamente centrifugadas por mais 10 min a 10.000 rpm, e em seguida foi realizada leitura em espectrofotômetro à 535 e 600 ηm. A quantidade de MDA foi expressa em μmol/g de tecido fresco.

4.2.10 Análises das enzimas antioxidantes

4.2.10.1.1 Atividade da enzima SOD em PAGE não desnaturante

A atividade da SOD foi analisada em PAGE não desnaturante (14%), utilizando como padrão 2 unidades de SOD de fígado bovino (Sigma). Após a separação das proteínas por eletroforese, com corrente constante de 20 mA/placa, a atividade de SOD foi determinada

como descrito por Beuchamp e Fridovich (1971). Após corrida, os géis foram enxaguados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro, a temperatura ambiente, em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NTT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi descartada, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas e coloração do gel.

4.2.10.1.2 Caracterização das isoenzimas de SOD

PAGE nativo foi utilizado para identificação das isoenzimas de SOD. Foi utilizado 40 ug de proteína total para caracterização. A eletroforese ocorreu nas mesmas condições anteriormente descritas para SOD. Após a corrida, o gel foi dividido verticalmente em três partes. Uma delas foi mantida em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda parte foi tratada com 100 mL do tampão fosfato de potássio contendo 1 mM de EDTA e 2 mM de KCN e a última parte foi imersa em uma solução do referido tampão acrescido de 1 mM de EDTA e 70 µL de H_2O_2 a 30%. Todas estas etapas foram realizadas no escuro para prevenir a fotoxidação. Os géis permaneceram por 20 minutos nas soluções, e em seguida foram lavados ligeiramente com H_2O destilada e submetidos a revelação com NBT e riboflavina como descrito anteriormente. Ao final da revelação, as bandas foram analisadas quanto a presença e ausência, conforme o fator inibidor presente nas soluções de tratamento. As isoformas foram classificadas como (AZEVEDO et al., 1998):

- Cu/Zn-SOD quando inativada na presença de KCN e H_2O_2;
- Fe-SOD se a banda foi inativada somente na presença de H_2O_2, sendo resistente ao KCN;
- Mn-SOD se a isoforma era resistente aos dois tratamentos.

4.2.10.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

4.2.10.2.1 Atividade da enzima CAT em espectrofotômetro

A atividade foi determinada em uma solução de reação formada por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (0,03%). A reação foi iniciada com 25 µL de extrato proteico, sendo realizada a leitura à temperatura de 25 °C, e a atividade determinada através da decomposição de peróxido de hidrogênio, através

de alterações na absorbância a 240ηm. Os resultados foram expressos em μmol/min/mg de proteína.

4.2.10.2.2 Atividade da enzima CAT em PAGE não-desnaturante

A eletroforese foi realizada a 4°C e a corrente constante utilizada por placa foi de 15 mA. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 20 μg de proteína dos extratos das amostras (AZEVEDO et al, 1998). Para a revelação foi realizada a lavagem do gel por 45 min em água deionizada (3 x 15 min) e incubação do mesmo por 10 min em solução de H_2O_2 0,003%, à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de $FeCl_3$ 1% (p/v) e $K_2Fe(CN_6)$ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel foi documentado.

4.2.10.3 Atividade da enzima glutationa-redutase (GR)

4.2.10.3.1 Atividade da enzima GR em espectrofotômetro

A atividade da GR foi determinada pelo método de espectrofotometria e também em PAGE não-desnaturante. Inicialmente a atividade foi analisada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 0,5 mL de 5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzóico - DTNB) a 1 mM, 100 μL de glutationa oxidada (GSSG) 1 mM e 100 μL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato e monitorada por 1min através da redução de glutationa oxidada na absorbância de 412 ηm (SMITH; VIERHELLER; THORNE, 1988).

4.2.10.3.2 Atividade da enzima GR em PAGE

A revelação para atividade de GR em PAGE foi determinada utilizando como padrão uma unidade de GR de fígado bovino (Sigma Aldrich). A revelação foi feita lavado-se o gel 2x em água destilada por 15 min e incubado por 30 min a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS (pH 7.5); 10mg de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-brometo de difeniltetrazol); 10mg DPIP (dicloroindolacéti co); 2,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH para

um volume final de solução de 50 mL. Depois de descartar esta solução, o gel foi lavado rapidamente em água deionizada e foi feita a fixação em solução de ácido acético 7% (LEE; LEE, 2000).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Efeito do Cd nas cultivares PR e CR

Conforme descrito no capítulo anterior, os principais efeitos da absorção de Cd pelas plantas de tomateiro são a redução do crescimento (desenvolvimento), clorose nos tecidos jovens, curvamento/enrolamento das folhas e também o aparecimento de manchas necróticas nas folhas. A inibição do crescimento e redução no acúmulo de massa seca (biomassa) nas raízes e parte aérea das plantas, devidas à presença de Cd, foram relatadas em várias espécies (VITORIA; LEA; AZEVEDO, 2001; FERREIRA et al., 2002; WÓJCIK; TUKIENDORF, 2005; GRATÃO et al., 2005).

Na figura 1 podemos observar o impacto do Cd sobre as cultivares Pusa Ruby (PR) e Calabash Rouge (CR), caracterizadas no capítulo anterior como sendo mais tolerante e mais sensível a este metal, respectivamente. Notamos que na dose de 25 µM de $CdCl_2$ as plantas da cv CR (sensível) já apresentaram sintomas severos de toxidez ao Cd, enquanto a cv PR (mais tolerante) sofreu apenas uma pequena redução de crescimento em relação às plantas controle (0 µM de $CdCl_2$). Contudo, na dose de 100 µM de $CdCl_2$ ambas as cultivares foram bastante afetadas pelo metal, embora a cv PR tenha conseguido se desenvolver significativamente mais nessa dose elevada do metal, em comparação com a cv CR. Além da parte aérea, vemos que as raízes da cv PR também se desenvolveram melhor que as raízes da cv CR, nas duas doses de Cd utilizadas neste experimento.

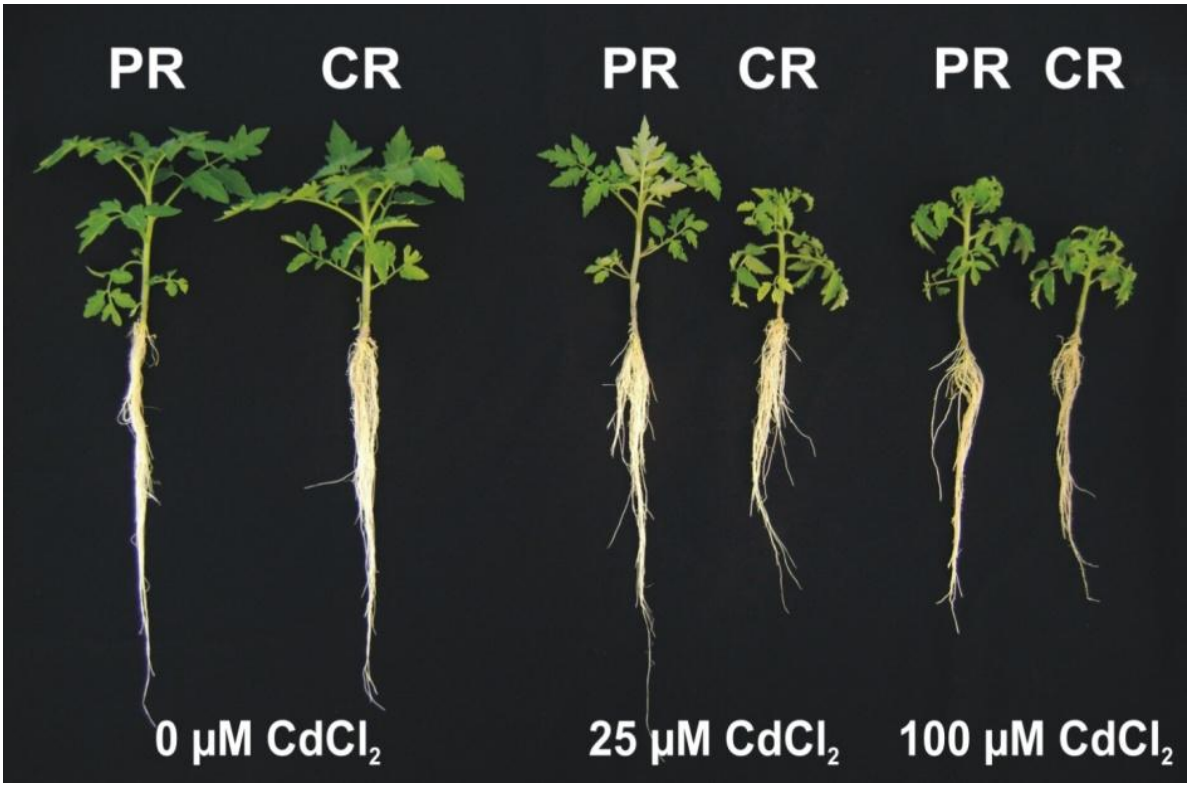

Figura 1 - Efeito do Cd sobre plântulas de tomateiro das cultivares de PR e CR

4.3.2 Parâmetros de desenvolvimento

Neste capítulo, assumimos que o principal parâmetro de desenvolvimento a ser estudado é relativo ao acúmulo de massa seca (mg/planta), em um determinado período, estabelecido em 4 dias. A escolha das doses deste trabalho foi feita com base no Índice de Tolerância (IT) determinado anteriormente no capítulo 2, onde foi demonstrado que a dose de 25 µM de $CdCl_2$ corresponde à faixa de doses que reduz o crescimento das plantas em 50%, proporcionando um IT próximo de 0,5. Já a maior dose de Cd deste experimento foi estabelecida em 100 µM de $CdCl_2$, estando abaixo da faixa de doses onde o crescimento das plantas seria cessado, pois o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de uma dose elevada de Cd, sem afetar totalmente o desenvolvimento das plantas.

Na figura 2A, novamente foi observado um padrão de inversão no acúmulo de massa seca total das plantas das cultivares CR e PR, onde na ausência de Cd, a cv CR cresceu significativamente mais do a cv PR, sendo que na presença de 25 µM e 100 de $CdCl_2$, a cv CR teve seu desenvolvimento extremamente reduzido em comparação com a cv mais tolerante (PR), na qual essa redução foi bem menor. Já na dose de 100 µM de $CdCl_2$, a redução no crescimento de ambas foi bastante acentuado, não havendo diferenças

significativas no acúmulo de massa seca entre as cultivares, embora o desenvolvimento da cv PR tenha sido ligeiramente maior. As diferenças nas taxas de redução de crescimento de ambas as cultivares confirmaram a maior tolerância da cv PR e maior sensibilidade da cv CR ao Cd, sendo que em ambas as doses deste metal (25 e 100 µM de $CdCl_2$) a cv PR apresentou ITs significativamente maiores que a cv CR (figura 2B). De forma geral, podemos dizer que as doses selecionadas para o presente trabalho mostraram-se eficientes para avaliar as diferenças de tolerância entre as cultivares, sendo assim bastante adequadas para estudar os efeitos do Cd sobre o metabolismo oxidativo das cultivares em questão.

Outro ponto que merece destaque é relativo às diferenças entre o acúmulo de massa seca na parte aérea e nas raízes das plantas deste experimento. O desenvolvimento da parte aérea das cultivares submetidas às diferentes doses de Cd, seguiu o mesmo padrão de acúmulo de massa seca total da planta (figura 3A). Já em relação ao sistema radicular, observamos que não houve diferenças significativas na massa seca das raízes das plantas da cv PR submetidas à dose de 25 µM de $CdCl_2$, quando comparadas com as raízes das plantas controle desta mesma cultivar (0 µM de $CdCl_2$). Por outro lado, as raízes da cv CR sofreram uma redução bastante acentuada na presença do Cd (figura 3B).

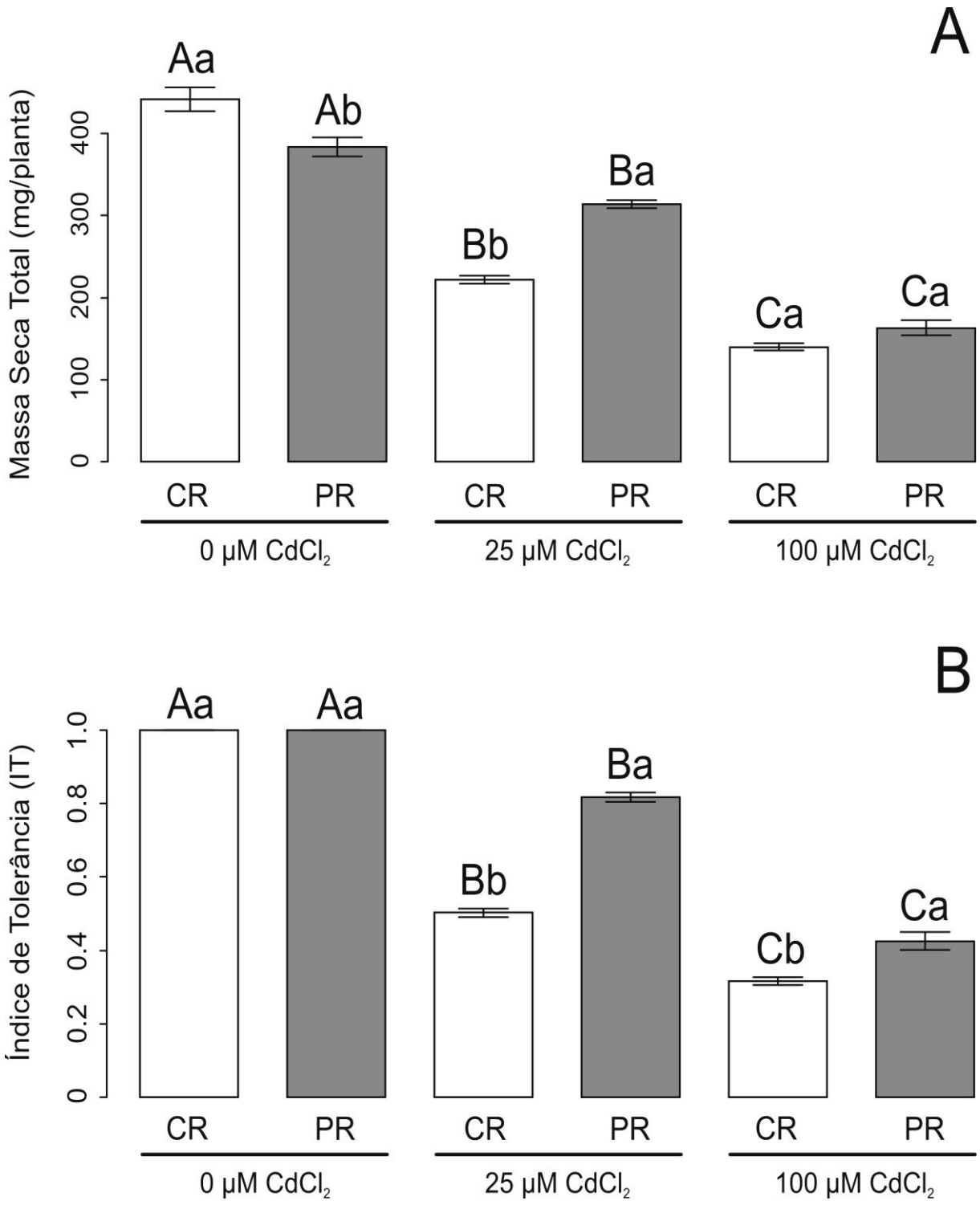

Figura 2 - Efeito do Cd sobre o desenvolvimento das cultivares CR e PR. A) Redução da massa seca das plantas em função de doses crescentes de $CdCl_2$. B) Índice de Tolerância ao Cd das cultivares CR e PR expostas a diferentes concentrações deste metal. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Embora estatisticamente não significativo, o acúmulo de massa seca das raízes da cv PR na dose de 25 µM de $CdCl_2$ foi levemente maior do que a média obtida nas plantas desta cultivar que se desenvolveram na ausência de Cd (figura 3B). No capítulo 2, as principais diferenças no desenvolvimento geral entre as cultivares estudadas, foram atribuídas principalmente aos efeitos do Cd sobre as raízes, havendo evidências de que as diferenças na tolerância de cada uma das cinco cultivares estudadas eram devidas à mecanismos relacionados às respostas do sistema radicular a este metal. Assim, novamente observamos que em uma dose moderada de Cd (25 µM de $CdCl_2$) o sistema radicular da cv PR cresce normalmente, parecendo haver até mesmo um pequeno estímulo pela presença deste fator estressante, o que não acontece com as raízes da cv CR, que foram bastante afetadas pela presença do Cd. Na exposição à dose de 100 µM de $CdCl_2$, as raízes de ambas as cultivares tiveram comportamento semelhante, dado que tal dose é bastante elevada mesmo para uma planta que tenha se mostrado mais tolerante ao metal em questão (figura 3B). Respostas de tolerância envolvendo o melhor desenvolvimento de raízes, geralmente são mais estudadas quanto à tolerância ao Alumínio (HOSSAIN; ZHOU; MENDHAM, 2005; MA et al., 1997; TAMÁS et al., 2006; GIAVENO; MIRANDA FILHO, 2000), não havendo ainda relatos na literatura que comprovem uma correlação entre a maior tolerância ao Cd, com mecanismos de tolerância relativos às raízes das plantas.

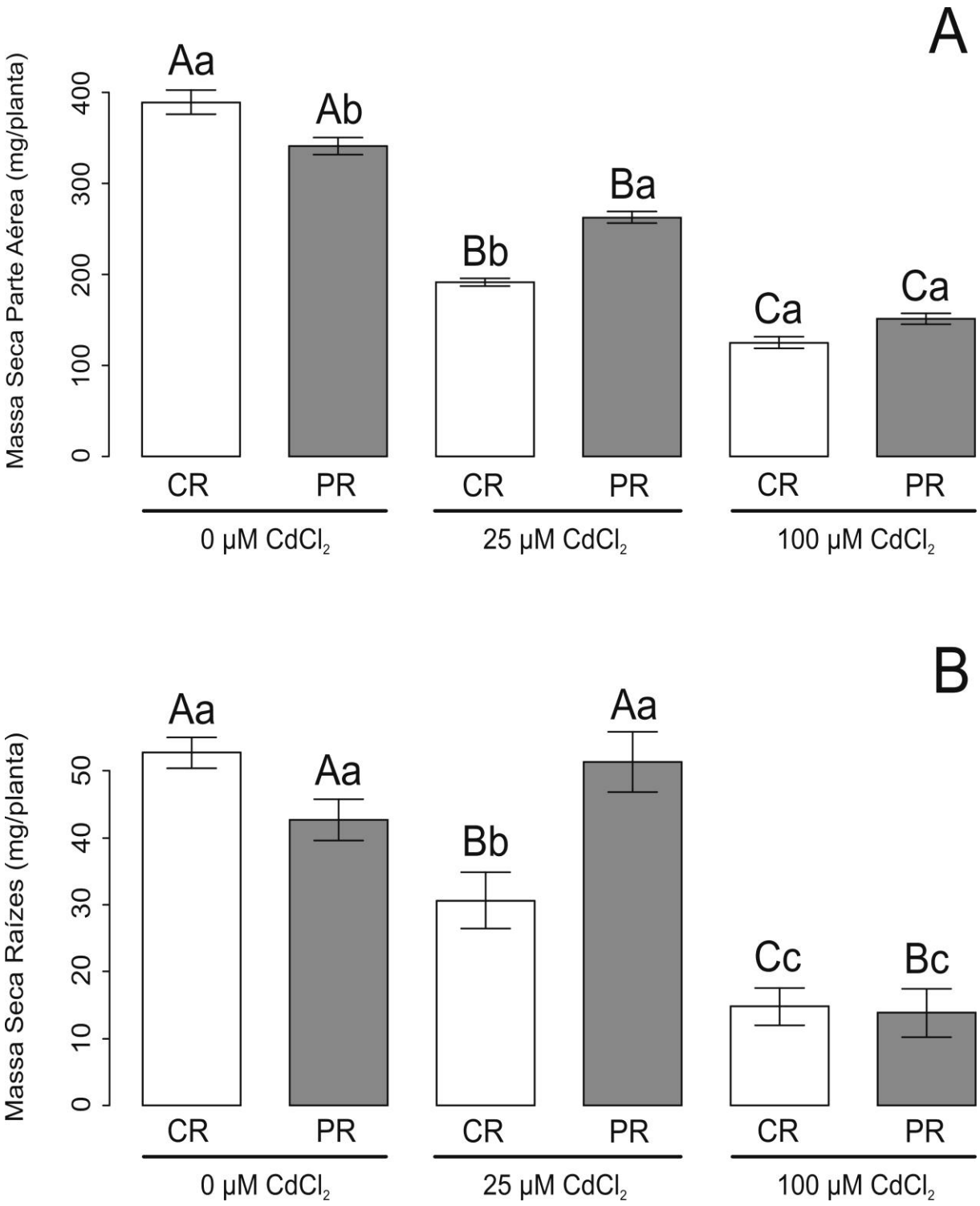

Figura 3 - Efeito do Cd sobre o desenvolvimento das cultivares CR e PR. A) Redução da massa seca da parte aérea das plantas em função de doses crescentes de $CdCl_2$. B) Redução da massa seca das raízes das plantas em função de doses crescentes de $CdCl_2$. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

4.3.3 Acúmulo de Cd nos tecidos

A exposição à doses crescentes de Cd levou ao acúmulo crescente deste metal, nos tecidos de ambas as cultivares (figura 4), havendo maior acúmulo de Cd nas raízes do que na parte aérea das plantas, tal como encontrado em outros trabalhos usando diferentes cultivares de tomateiro expostas a este metal (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009; GRATÃO et al., 2012), e ainda em outras espécies de plantas tais como por exemplo *Crotalaria juncea* (PEREIRA et al., 2002) e rabanete (VITÓRIA; LEA; AZEVEDO, 2001). Porém, tal aumento não foi proporcional à dose utilizada, sendo que provavelmente na dose de 100 µM de $CdCl_2$, todo o metabolismo das plantas, envolvendo a capacidade de absorção de água, nutrientes e do próprio metal, foi negativamente afetado. Assim, nesta dose elevada de Cd as plantas se desenvolveram menos, o que consequentemente levou à menor absorção proporcional do metal.

De forma geral, não houve diferenças significativas no acúmulo de Cd nas raízes entre as cultivares CR e PR, tanto na dose de 25 quanto de 100 µM de $CdCl_2$, embora na dose de 25 µM de $CdCl_2$ a cv CR tenha mostrado um acúmulo sensivelmente maior que a cv PR (figura 4A). Ambas as cultivares também não apresentaram diferenças significativas entre si, quanto ao acúmulo de Cd nos caules (figura 4B). Já em relação ao acúmulo de Cd nas folhas das plantas, a principal diferença entre as cultivares foi observada na dose de 100 µM de $CdCl_2$, na qual houve um acúmulo de Cd significativamente maior na cv CR (figura 4C), a qual também mostrou uma tendência ao maior acúmulo deste metal na dose de 25 µM de $CdCl_2$. Esse resultado é coerente com os resultados observados no capítulo anterior, pois estas duas cultivares foram as únicas que apresentaram diferenças significativas no acúmulo de Cd nas folhas, mostrando novamente que de alguma forma este metal é mais absorvido e mais translocado para a parte aérea da cv CR, podendo este ser um dos fatores que torna esta cultivar mais sensível ao metal em questão.

Os dados de Índice de Translocação (ITr) e de acúmulo total nas plantas não foram apresentados neste capítulo, pois seguiram o mesmo padrão dos resultados obtidos no capítulo anterior. Assim, somente o acúmulo de Cd relativo nos tecidos foi considerado para esta discussão, pois neste capítulo, os resultados das alterações no nível de estresse oxidativo e enzimas do sistema antioxidante celular são mensurados em termos de unidade de tecido, tal como apresentado para o acúmulo de Cd. Estes resultados, podem ajudar a traçar um paralelo entre acúmulo de Cd e o impacto deste metal sobre os principais processos bioquímicos das

células, envolvidos no sistema de defesa antioxidante e na própria diferença de tolerância entre as cultivares aqui estudas.

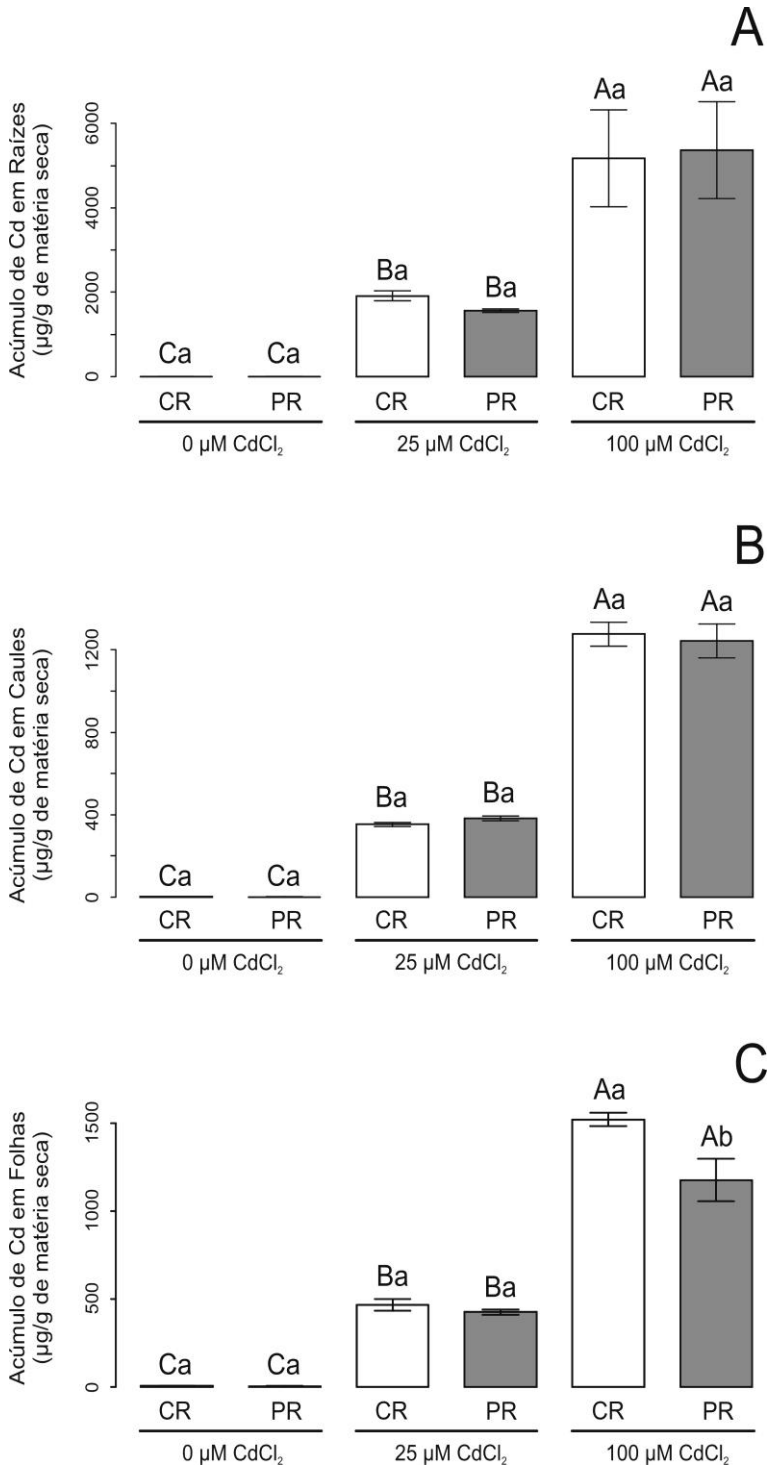

Figura 4 - Acúmulo de Cd nos tecidos vegetais. A) Acúmulo de Cd nas raízes. B) Acúmulo de Cd no caule. C) Acúmulo de Cd nas folhas. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

4.3.4 Estresse oxidativo induzido pelo Cd

Uma vez que constatamos a redução de crescimento nas plantas das cultivares CR e PR em decorrência da absorção de Cd, temos agora que avaliar o impacto deste metal sobre o metabolismo celular, visando entender melhor as diferenças de desenvolvimento entre essas cultivares na presença do fator estressante. Como já foi mencionado anteriormente, o Cd causa estresse oxidativo nas plantas, o qual é consequência de uma série de eventos que ocorrem em nível celular (INZÉ; MONTAGU, 1995; ASADA, 1999; GIL; TUTEJA, 2002), onde as EROs podem causar danos à lipídios, proteínas e ao próprio DNA (McCORD, 2000; AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008). Embora o estresse em si não seja mensurável, é possível quantificar substâncias indicadoras da ocorrência do estresse oxidativo. Dentre estas substâncias, temos que um dos principais indicadores de estresse é a peroxidação lipídica (ROMERO-PUERTAS et al., 2006; MONTEIRO et al., 2011). As EROs em excesso nas células reagem com ácidos graxos insaturados e causam a peroxidação de lipídios na membrana (GRATÃO et al., 2005).

A peroxidação lipídica pode formar vários produtos, dentre os quais o malondialdeído (MDA) é um dos que pode ser facilmente quantificado, sendo assim frequentemente utilizado como indicador da ocorrência de estresse oxidativo (DEWIR et al., 2006). Dentre as EROs, o H_2O_2 é um dos principais responsáveis pela peroxidação lipídica. Porém, ele não é o único capaz de causar danos às membranas das células (HALLIWELL; CHIRICO, 1993), e por esse motivo, não podemos dizer que todo o estresse está sendo avaliado. Como grande parte da peroxidação lipídica e produção de MDA é devida à ação do H_2O_2, vamos inicialmente verificar as alterações nos níveis dessa ERO, em função das doses crescentes de Cd em ambas as cultivares estudadas.

Na figura 5A, vemos que há um aumento significativo na concentração de H_2O_2 nas folhas das cultivares CR e PR. Embora tal aumento tenha sido bastante pronunciado na cv CR, esta não apresentou diferenças significativas na concentração de H_2O_2 entre as doses 0 e 25 µM de $CdCl_2$, pois aparentemente o nível desta ERO já estava relativamente elevado nas plantas controle desta cultivar. Já a concentração de H_2O_2 nas raízes também aumentou devido à presença do Cd, porém, tais aumentos não foram significativos, provavelmente devido à maior variação na quantificação desta ERO nestes tecidos (figura 5B). Contudo, em nenhum dos tratamentos com Cd foram observadas diferenças significativas nos níveis de H_2O_2 entre as próprias cultivares CR e PR, sendo que ambas seguiram o mesmo padrão crescente de concentração desta molécula, em função das doses de Cd.

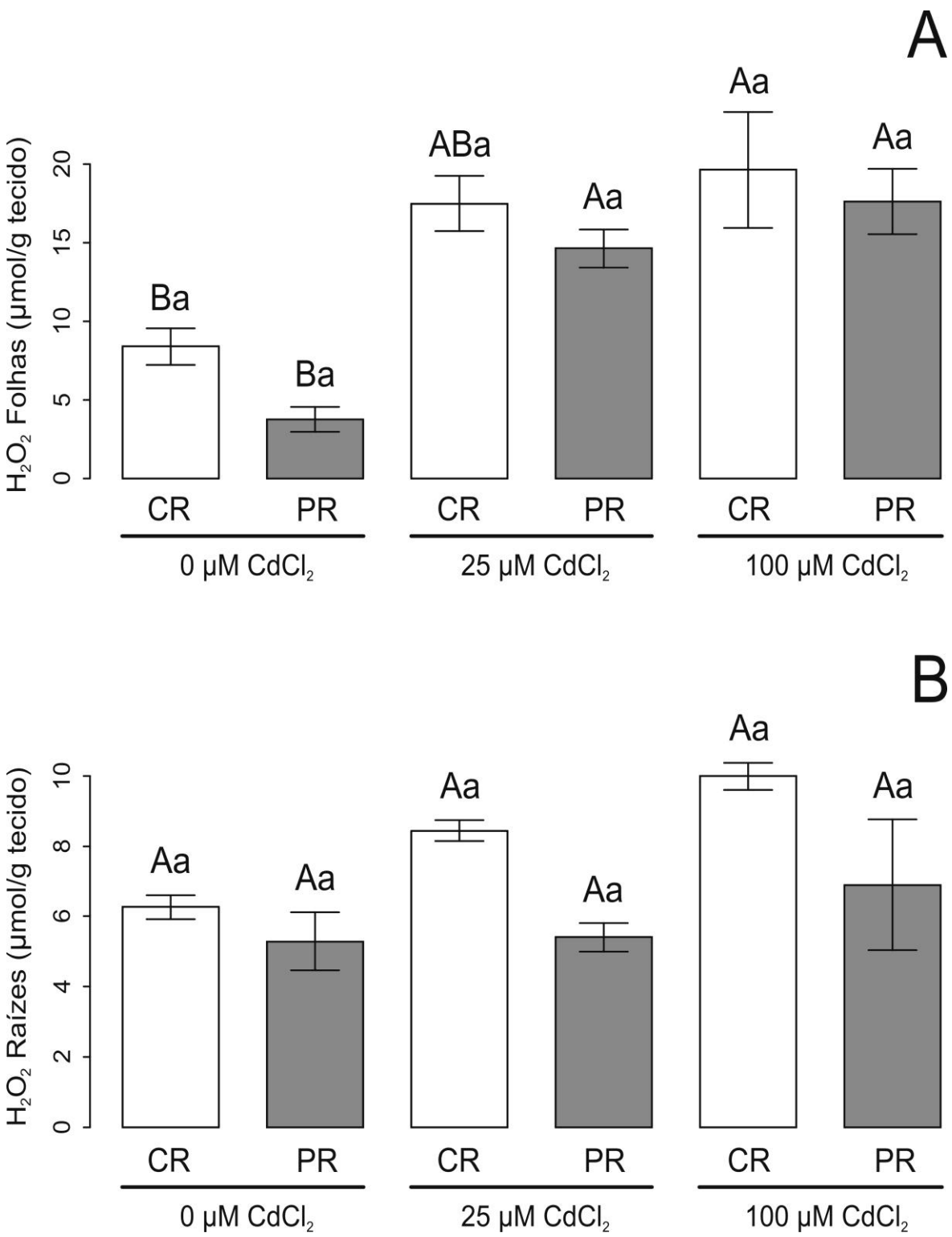

Figura 5 - Concentração de peróxido de hidrogênio nos tecidos das cultivares CR e PR, em função de doses crescentes de Cd. A) Concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas das cultivares. B) Concentração de peróxido de hidrogênio nas raízes das cultivares. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Uma vez constatado o aumento na concentração de H_2O_2 intracelular em folhas e raízes de ambas as cultivares, podemos fazer uma correlação com o nível de estresse nas células, obtido pela quantificação de MDA. Quanto maior a concentração de MDA, maior seria o nível de estresse no tecido em questão. Na figura 6A, fica evidente o aumento da concentração de MDA nas folhas das cultivares CR e PR, em função das doses crescentes de Cd, indicando que a presença deste metal induziu estresse oxidativo em ambas as cultivares. Contudo, a cv PR, caracterizada como sendo mais tolerante ao Cd, não apresentou aumento significativo no nível de estresse nas folhas quando as plantas desta cultivar foram expostas à dose de 25 µM de $CdCl_2$, embora a concentração de H_2O_2 neste tecido tenha aumentado significativamente nesta mesma dose de metal (figura 5A). O estresse nas folhas da cv PR só foi significativo nas plantas expostas à dose de 100 µM de $CdCl_2$. Já a cv CR mostrou ser bastante sensível ao efeito do Cd, pois as concentrações de MDA nas folhas desta cultivar aumentaram proporcionalmente às doses do metal, havendo diferenças significativas do estresse em todas as doses (figura 6A). Em relação ao estresse em raízes, não possível identificar grandes diferenças na quantificação de MDA entre tratamentos com doses crescentes de Cd e nem mesmo diferenças entre as próprias cultivares (figura 6B). Porém, parece haver uma tendência, embora não significativa, de menor concentração de MDA nas raízes de ambas as cultivares, na dose de 100 µM de $CdCl_2$ (figura 6B).

É interessante notar que o aumento na concentração de H_2O_2 nas folhas das plantas da cv PR expostas à dose de 25 µM de $CdCl_2$, não causou estresse oxidativo nestes tecidos, enquanto o aumento de H_2O_2 nas folhas da cv CR, gerou estresse oxidativo, o que é demonstrado pelos maiores níveis de MDA nas folhas desta cultivar (figura 6A). Nem sempre a maior concentração de H_2O_2 em um tecido indica que a planta está mais estressada. O H_2O_2 também possui um papel na sinalização sistêmica de resposta a estresses bióticos, tais como o ataque de patógenos (ALVAREZ et al., 1998), e abióticos como a ocorrência de lesões nos tecidos (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999) e o estresse por alta intensidade luminosa (MULLINEAUX; KARPINSKI, 2002). Assim, a manutenção dos níveis intracelulares de H_2O_2 precisam ser estritamente controlados por mecanismos distintos que façam a fina modulação desta ERO, tanto para a sinalização celular quanto para sua eliminação pelo sistema antioxidante celular, evitando assim, a ocorrência de estresse oxidativo (MITTLER, 2002). Dessa forma, o aumento na concentração de H_2O_2 nas folhas da cv PR, associado aos baixos níveis de MDA nestes tecidos, poderia indicar que a maior produção do H_2O_2 estaria relacionada com a própria sinalização para expressão dos genes de tolerância nesta cultivar.

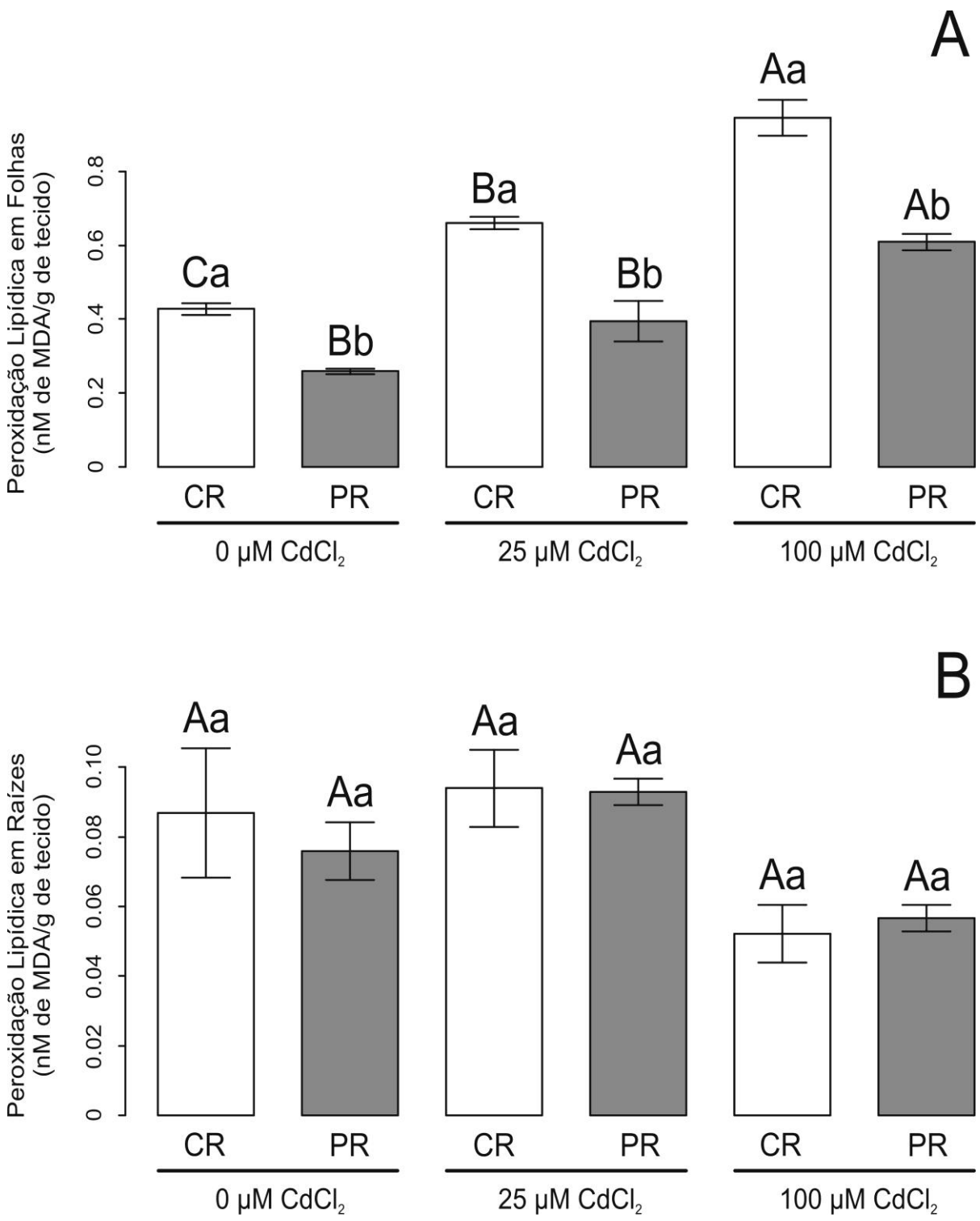

Figura 6 - Concentração de malondialdeído (MDA) nos tecidos das cultivares CR e PR, em função de doses crescentes de Cd. A) Concentração MDA nas folhas das cultivares. B) Concentração de MDA nas raízes das cultivares. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

4.3.5 Alterações no perfil de proteínas causado pela presença de Cd

Embora o grau de polimorfismo genético entre acessos de uma mesma espécie de tomateiro não seja elevado (MILLER; TANKSLEY, 1990), podemos dizer que as cultivares CR e PR são geneticamente diferentes entre si, sendo que tais diferenças certamente estão relacionadas com a maior ou menor tolerância ao Cd entre elas. A resposta de tolerância ao Cd provavelmente envolve um conjunto de alterações gênicas, sejam estas de estímulo ou repressão na expressão de determinados genes, cuja consequência seria a alteração no perfil das proteínas que resultam da expressão gênica diferencial em função dos tratamentos. Dessa forma, o perfil proteico de plantas expostas ao Cd, pode nos dar idéia do tipo e magnitude das variações no metabolismo entre as cultivares CR (mais sensível) e PR (mais tolerante).

Na figura 7, vemos que na ausência do Cd (0 µM de $CdCl_2$) as folhas (figura 7A) e raízes (figura 7B) de plantas das cultivares CR e PR, apresentam algumas diferenças qualitativas no padrão de bandas, as quais refletem parte das próprias diferenças genéticas entre esses dois acessos. Quando estas duas cultivares são expostas ao Cd (25 e 100 µM de $CdCl_2$), notamos que o perfil proteico é bastante alterado, tanto em relação ao aumento nas doses de Cd, quanto na resposta individual de cada uma das delas a este metal (figura 7). O Cd induziu a maior expressão de algumas proteínas e reprimiu a expressão de outras, sendo tais efeitos mais evidentes nas folhas (figura 7A) do que nas raízes (figura 7B). A magnitude destas variações foi diferente para cada cultivar, parecendo haver uma tendência geral de menor intensidade das bandas na cv CR (mais sensível), em folhas e raízes, quando as plantas desta cultivar são expostas ao Cd.

Uma das alterações marcantes na análise do perfil proteico foi a grande redução da banda relativa à subunidade maior da enzima Rubisco, que se encontra na posição de aproximadamente 53 kDa no gel de SDS-PAGE (figura 7A). A Rubisco é a proteína mais abundante nas folhas, sendo uma enzima bifuncional que catalisa duas reações competitivas e essenciais para a vida das células, relacionadas com a fotossíntese e fotorespiração. A Rubisco é uma enzima central para a fixação de carbono pelas plantas, desencadeando uma série de reações que geram carboidratos, proteínas e lipídios, que são fundamentais para o desenvolvimento destes organismos (MANN, 1999). Quando essa enzima sofre algum prejuízo, o metabolismo celular pode ser seriamente afetado.

Uma das principais causas de danos à Rubisco é devida à presença de EROs nos cloroplastos. Em condições normais de homeostase celular, as EROs geradas pela própria fotossíntese, são eliminadas direta ou indiretamente por enzimas de defesa do sistema

antioxidante celular, tais como a Superóxido Dismutase (SOD), Ascorbato Peroxidase (APX), Glutationa Redutase (GR) e outros elementos, no ciclo Ascorbato-Glutationa (FOYER; HALLIWELL, 1976; LIU et al., 2007). Por esse motivo, a inativação de enzimas como a Ascorbato Peroxidase (APX) pode levar ao acúmulo de H_2O_2 nos cloroplastos, causando prejuízos à Rubisco e outras diversas macromoléculas presentes nestas organelas (PIETRINI et al., 2003).

Como visto anteriormente, a presença do Cd induziu o aumento na concentração de H_2O_2 nas folhas de ambas as cultivares, aumentando o nível de estresse nestes tecidos, o que foi indicado pela maior concentração de MDA. Assim, é provável que o aumento na produção de H_2O_2 induzido pelo Cd, tenha levado à danos relativamente altos à expressão da Rubisco nas cultivares CR e PR, prejudicando o desenvolvimento destas como um todo. A produção de Rubisco foi extremamente reduzida na cv CR, mais sensível ao Cd, sendo que a banda correspondente a esta enzima quase não aparece nesta cultivar, em ambas as doses de Cd (25 e 100 µM de $CdCl_2$) (figura 7A). Já a cv PR, mais tolerante ao Cd, teve a produção de Rubisco reduzida proporcionalmente ao aumento na dose deste metal. Contudo, vemos que inibição desta enzima foi muito menor nesta cv tolerante (PR) do que na cv sensível ao Cd (CR) (figura 7A).

Uma das principais diferenças entre essas cultivares é em relação ao acúmulo de Cd nos tecidos. Conforme foi demonstrado, a cv CR acumula mais Cd em folhas do que a cv PR. Isso mostra que de certa forma este metal entra com mais facilidade nas plantas desta cultivar, sendo transportada em maiores quantidades para os tecidos da parte aérea. Assim, é provável que o maior nível de H_2O_2 e consequentemente maior estresse nas folhas dessa cultivar, sejam devidos à presença em maior quantidade de Cd nestes tecidos. Este metal pode causar danos às proteínas por vários mecanismos diferentes. Porém, no caso da Rubisco tem sido demonstrado que o Cd afeta indiretamente esta enzima, inativando o ascorbato (ASC) nos cloroplastos, o que leva à degradação da enzima APX, que é instável em baixos níveis de ASC (LIU et al., 2008). A enzima APX é a principal enzima que degrada o H_2O_2 nos cloroplastos, protegendo a Rubisco e demais macromoléculas da ação danosa desta ERO.

Uma vez que a APX é degradada pela falta ASC, ocorre o acúmulo de H_2O_2 nesta organela, o qual oxida os grupos tiol das subunidades da Rubisco, causando sua inativação. Assumindo que a Rubisco desencadeia uma série de reações importantes para a produção de carboidratos, proteínas e lipídios, podemos dizer que há evidências de que a redução acentuada na expressão geral de proteínas da cv CR em relação a cv PR, seja devida, em parte, à quase ausência ou expressão reduzida da Rubisco nas folhas dessa cultivar. Embora

tenha sido demonstrado que a presença das EROs em excesso nos cloroplastos causa danos à Rubisco (PIETRINI et al., 2003), temos que considerar que parte destes danos podem ser causado pela própria ação direta do Cd sobre a estrutura desta esta enzima, cujos mecanismos ainda não foram bem elucidados.

O padrão de reposta mais acentuado da cv CR em PAGE, provavelmente envolve a ação conjunta de uma gama de fatores, cujo efeito leva às principais alterações observadas no perfil de proteínas das folhas e raízes. Na figura 3B, foi demonstrado que o Cd prejudica muito as raízes da cv CR, reduzindo significativamente seu desenvolvimento, ao passo que as raízes da cv PR são muito menos afetadas pelo metal. Assim, os danos mais severos na estrutura das raízes da cv CR provavelmente prejudicam vários outros processos metabólicos, através da redução na absorção de água e alguns nutrientes para a parte aérea das plantas. Além disso, sabemos também que o Cd pode aumentar a absorção e acúmulo nas raízes de alguns micronutrientes tais como Fe, Zn e Cu (LARBI et al., 2002; LIU; JIANG; GAO, 2003; LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009) e reduzir a absorção e acúmulo de outros, tais como Mn e K (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2009), podendo levar ao excesso ou falta destes elementos nas células, causando desequilíbrio no metabolismo celular. As alterações na absorção de nutrientes pelas raízes em presença de Cd seriam parcialmente explicadas pela modificação na permeabilidade da membrana plasmática causada por esse metal (DONG et al., 2006). Adicionalmente, o Cd também compete pelos mesmos sítios de enzimas que tenham como cofator metais de carga e formas similares a ele, levando à inativação destas enzimas, o que consequentemente altera o metabolismo celular e gera estresse oxidativo, levando à oxidação de várias proteínas (DAS; SENGUPTA; MUKHERJEE, 1997).

Finalmente, temos que as alterações no perfil de proteínas que foram observadas entre as cultivares CR e PR na presença do Cd, seriam devidas a ação direta ou indireta deste metal, sobre vários processos fisiológicos e metabólicos, cujo conjunto e a magnitude destas alterações provavelmente estariam induzindo a maior ou menor tolerância ao Cd observadas entre tais cultivares. Portanto, é necessário que análises mais detalhadas como pelo uso de 2D-PAGE sejam conduzidas para identificar melhor quais proteínas estão sendo mais afetadas e consequentemente rações metabólicas que possam estar sendo alvo da ação do Cd.

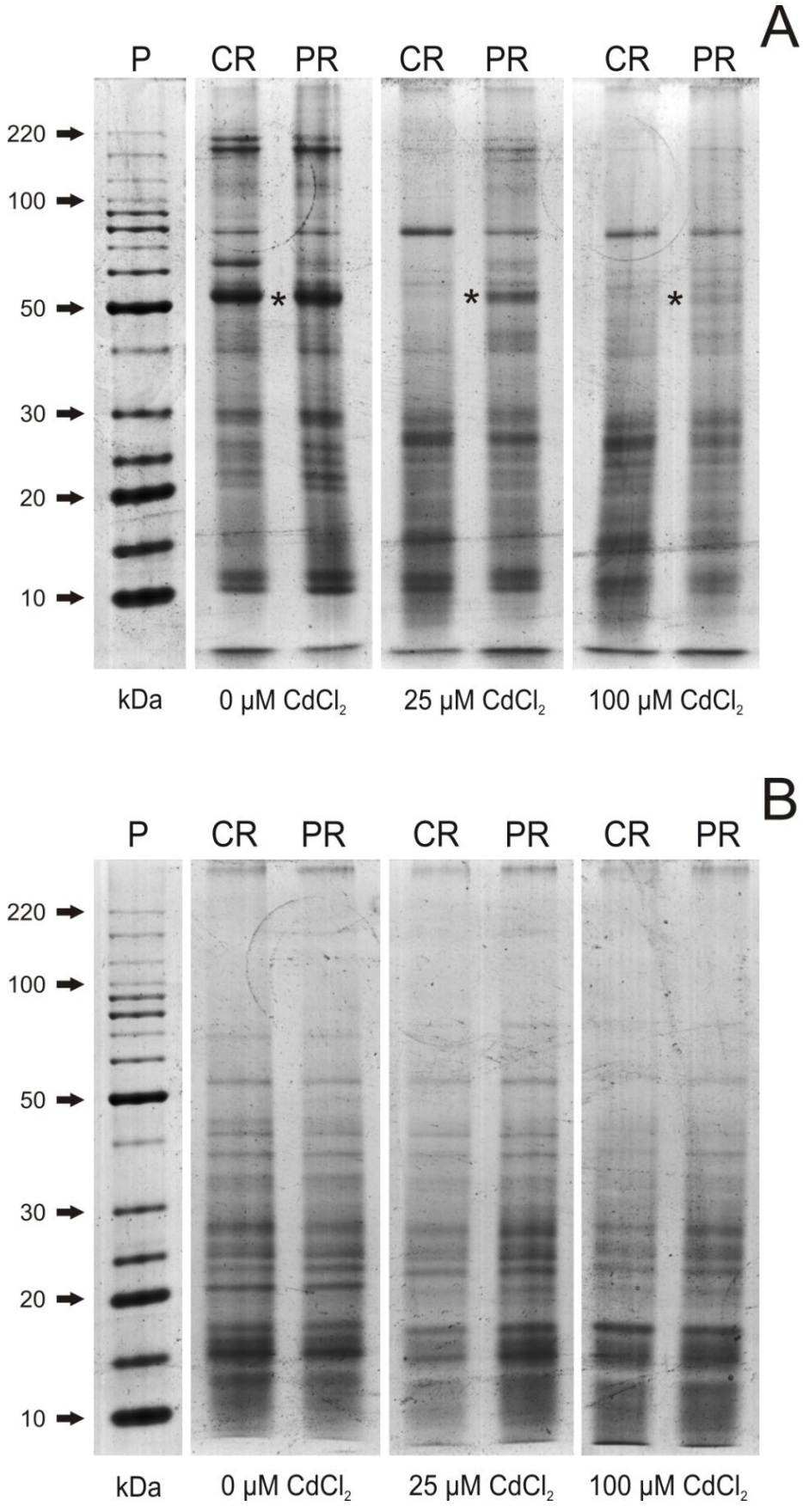

Figura 7 - Alterações no perfil proteico de folhas (A) e raízes (B) das cultivares CR e PR, em SDS-PAGE, em função de doses crescente de Cd

4.3.6 Resposta do sistema antioxidante enzimático ao estresse causado por Cd

Como já foi demonstrado, a exposição ao Cd das plantas de tomateiro das cultivares CR e PR levou a ocorrência de estresse oxidativo em folhas e raízes, o que foi constatado pelo aumento na concentração de H_2O_2 e MDA nestes tecidos. O aumento da concentração de EROs nas plantas estressadas leva à diversas alterações no metabolismo celular, induzindo principalmente as respostas relacionadas ao sistema antioxidante enzimático e não enzimático, os quais tem o objetivo de eliminar as EROs convertendo-as em moléculas não prejudiciais às células. Com isso, é esperado que o estresse causado pelo Cd gere respostas no metabolismo antioxidante celular, alterando a atividade das principais enzimas envolvidas na limpeza das EROs. Por esse motivo, avaliamos as atividades das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutationa Redutase (GR), com o intuito de entender melhor as diferenças nas respostas do sistema antioxidante entre as cultivares CR, mais sensível ao Cd, e PR, a qual mostrou-se mais tolerante a este metal.

4.3.6.1 Atividade de SOD em resposta ao Cd

Cada enzima do sistema antioxidante celular é especializada em eliminar um tipo ERO. Dentre elas, as SODs são as únicas que combatem o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é convertido por essa enzima em H_2O_2 e H_2O. Assim, as SODs constituem a primeira linha de defesa das plantas contra o $O_2^{\bullet-}$, transformando essa molécula altamente reativa, em uma ERO menos reativa (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). São conhecidas 3 classes de SOD nas plantas, as quais são classificadas de acordo com seu co-fator metálico, podendo ser Mn-SOD (cofator Manganês), Cu/Zn-SOD (cofator Cobre/Zinco) e Fe-SOD (cofator Ferro) (AZEVEDO et al., 1998). As Mn-SODs são encontradas nas mitocôndrias e peroxissomos (DEL RIO et al., 2002), enquanto as Fe-SODs estão presentes nos cloroplastos (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002). Já as Cu/Zn-SOD podem ser encontradas no citosol, nos cloroplastos e nos peroxissomos (DEL RIO et al., 2002). Esta enzima possui um papel central na defesa antioxidante celular, pois ao reduzir o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2, ela impede que esse $O_2^{\bullet-}$ leve à formação de outra ERO extremamente reativa e prejudicial para as células, que é o radical $^{\bullet}OH$ (LÉON et al., 2002). Assim, conhecer as alterações nas atividades de SOD em função da presença de Cd nas cultivares de tomateiro é fundamental para entender o comportamento da primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo nestas plantas.

Neste trabalho, a atividade de SOD foi determinada em PAGE não desnaturante, o qual revelou a existência de seis isoformas desta enzima nas folhas (figura 8A) e quatro isoformas nas raízes (figura 8B). No entanto, Monteiro et al. (2011) trabalhando com tomateiros da cv Micro-Tom, encontraram cinco isoformas em folhas e cinco isoformas em raízes. Das isoformas encontradas nas folhas, quatro delas foram caracterizadas como sendo Mn-SOD (I, II, III e V) e as outras duas como Fe-SOD (IV e VI) (figura 9A). Já nas raízes, foram caracterizadas duas Mn-SOD (I e II) e duas Fe-SOD (III e IV) (figura 9B). Apesar das Cu/Zn-SOD serem frequentemente abundantes nas folhas de várias espécies vegetais (AZEVEDO et al., 1998), nenhuma isoforma desta foi identificada nos tomateiros, embora Monteiro et al. (2011) e Tyburski et al. (2009), tenham identificado essa isoforma nas cultivares Micro-Tom e Ozarowski de tomateiro, respectivamente. Contudo, Gomes-Júnior et al. (2006) também relatou não ter encontrado Cu/Zn-SOD em células de café tratadas com Cd. Uma vez que a caracterização das isoformas mostrou resultados idênticos entre as cultivares CR e PR, foram apresentados somente os géis de caracterização de tais isoformas, relativas a folhas e raízes da cv PR (figura 9).

Houve um aumento na atividade de quase todas as isoformas de SOD nas folhas, devido aos tratamentos com Cd (figura 8A), em ambas as cultivares, sendo que as isoformas V e VI são responsáveis pela maior parte da atividade total de SOD nestes tecidos. Dentre elas, as isoformas I, II e IV só aparecem em decorrência da exposição a este metal. Quando comparamos a atividade de SOD em folhas entre as cultivares CR e PR, podemos notar que nos tratamentos com Cd, a atividade desta enzima é maior na cv CR do que na cv PR, com exceção da isoforma VI, para qual a atividade foi levemente maior na cv PR exposta à maior dose de Cd. A isoforma Fe-SOD VI é uma das duas Fe-SODs identificadas, sendo sua expressão muito maior do que a Fe-SOD IV. A menor atividade da Fe-SOD VI pode indicar um efeito negativo do Cd sobre essa isoforma nos cloroplastos da cv CR, o que ajudaria a explicar tanto os maiores níveis de estresse, como também a atividade reduzida da Rubisco nesta cultivar, devido à presença do metal. Já a maior atividade das demais isoformas de Mn-SOD e da Fe-SOD VI nas folhas da cv CR em presença de Cd, podem indicar um esforço do metabolismo desta cultivar em evitar o estresse oxidativo de forma geral.

Quanto à atividade de SOD nas raízes (figura 8B), o Cd induziu o aumento na atividade somente da Mn-SOD II, enquanto as isoformas Mn-SOD I e Fe-SOD IV tiverem suas atividades reduzidas pela presença do metal. A isoforma Fe-SOD III parece não ter sofrido alterações significativas em sua atividade em nenhum dos tratamentos. Ao compararmos as atividades de SOD nas raízes de ambas as cultivares, vemos que a alteração

mais expressiva foi relativa à Fe-SOD IV da cv CR, a qual teve sua atividade muito reduzida na maior dose de Cd (100 µM de $CdCl_2$). Considerando que as raízes são o órgão mais afetado pelo Cd na cv CR (mais sensível a este metal), é possível que a tendência geral de redução atividade das isoformas Mn-SOD I e Fe-SOD IV sejam devidas ao impacto do Cd na própria estrutura destas enzimas, de forma direta ou indireta.

De forma geral, existem vários trabalhos relatando aumento na atividade de SOD em plantas por conta da exposição ao Cd (SHAH et al., 2001; GUO et al. 2004; HASSAN et al., 2005), bem como existem outros tantos relatando a redução na atividade desta enzima pela presença do metal (GALLEGO; BENAVIDÉS; TOMARO, 1996; LÉON et al., 2002; IANNELLI et al., 2002), ou mesmo casos onde não houve alteração da SOD pelo Cd (GALLEGO; BENAVIDÉS; TOMARO, 1999). Assim, embora haja uma tendência geral de maior expressão de SOD pela exposição ao Cd, observamos que este padrão não é constante em relação às todas as isoformas em raízes e folhas, sendo que algumas delas mostram aumento na atividade e outras delas tem sua atividade reduzido pela presença do metal. Por fim, podemos dizer que não há um padrão claro de resposta da atividade da SOD que possa ser associado com as diferenças de tolerância encontradas entre as cultivares CR e PR.

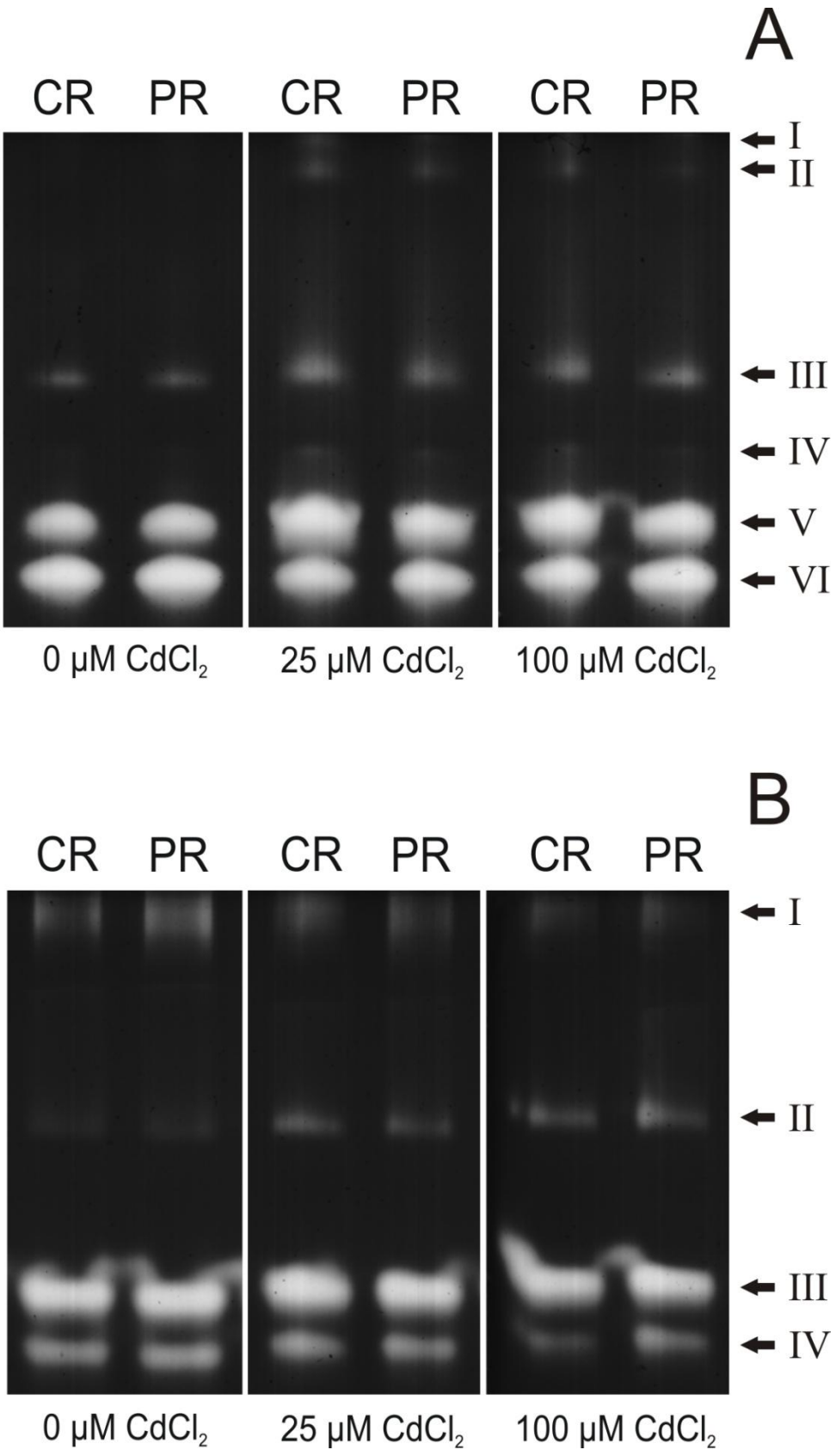

Figura 8 - Perfil da atividade de SOD em PAGE não desnaturante. A) Atividade de SOD em folhas das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. B) Atividade de SOD em raízes das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd

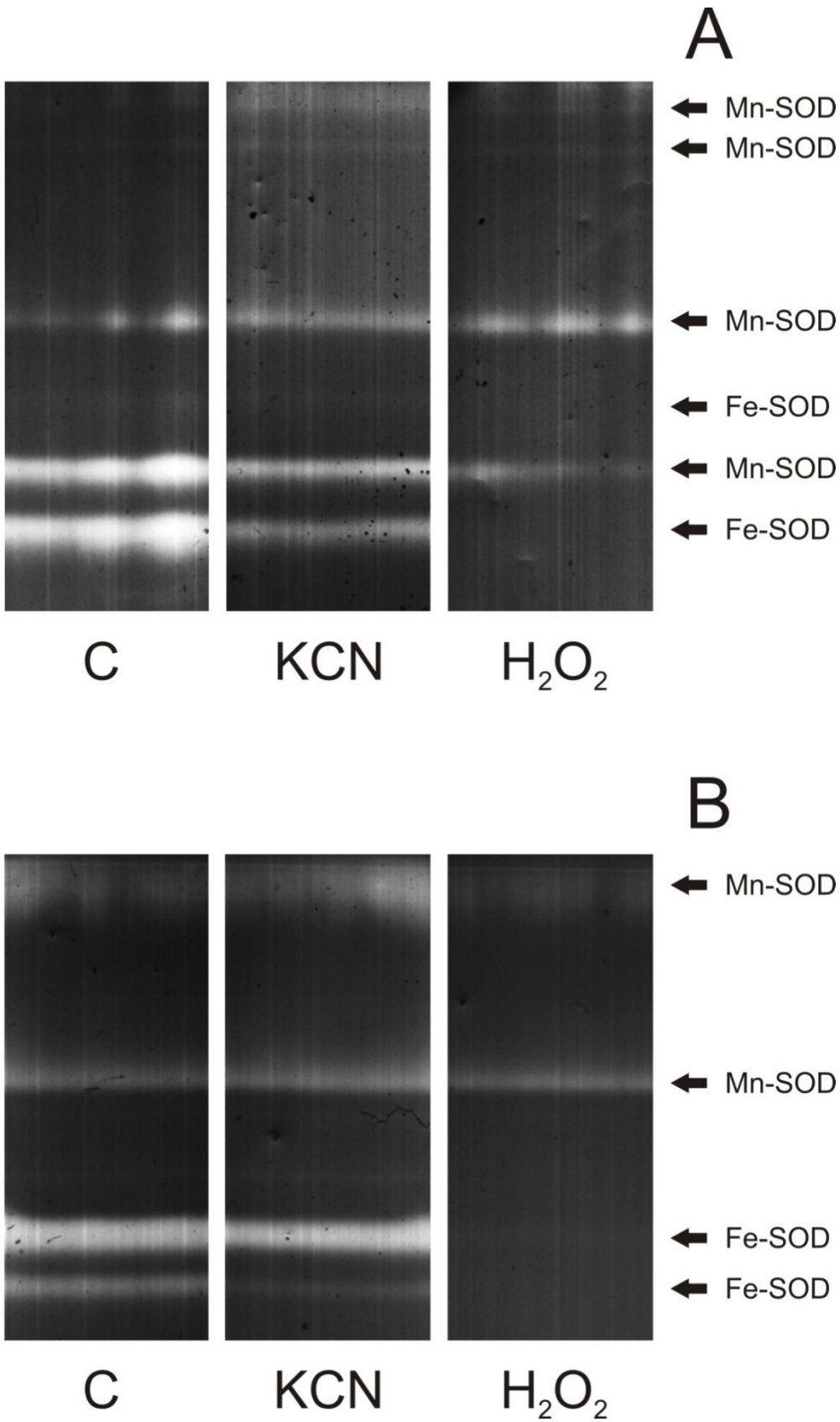

Figura 9 - Caracterização das isoformas de SOD em PAGE não desnaturante. A) Isoformas de SOD de folhas da cv PR. B) Isoformas de SOD das raízes da cv PR

4.3.6.2 Atividade de CAT em resposta ao Cd

A CAT é uma proteína tetramérica que ocorre em abundância nos peroxissomos, a qual catalisa a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). A atividade da CAT nos peroxissomos ajuda a prevenir danos oxidativos do H_2O_2 sobre as isoformas de SOD citoplasmáticas e cloroplastidiais (FRIDOVICH, 1995), embora ela não esteja presente nos cloroplastos (ASADA, 1999). A atividade desta enzima pode variar bastante em reposta à exposição ao Cd, sendo que existem trabalhos mostrando que a CAT aumentou (GALLEGO; BENAVIDÉS; TOMARO, 1999), reduziu (LÉON et al., 2002) ou manteve inalterada (FERREIRA et al., 2002) a sua atividade na presença deste metal.

Essa enzima possui uma função importante na eliminação do H_2O_2 protegendo as células contra essa ERO (ZÁMOCKÝ; KOLLER, 1999), podendo apresentar alterações em sua atividade, as quais estejam relacionadas à maior ou menor tolerância entre as cultivares de tomateiro estudadas. Neste trabalho, a atividade de CAT foi determinada em termos quantitativos e qualitativos, por meio de espectrofotometria e PAGE não desnaturante, respectivamente.

A atividade de CAT nas folhas das cultivares CR e PR aumentou significativamente com a exposição das plantas de tomate ao Cd, em relação às plantas que cresceram na ausência do metal (figura 10A). Porém, a atividade de CAT nas doses de 25 e 100 µM de $CdCl_2$ foi praticamente a mesma para cada cultivar, não havendo diferenças significativas entre elas nestas doses (figura 10A). Já em relação às diferenças entre as próprias cultivares, é possível notar que há uma tendência de maior atividade da CAT na cv CR em ambas as doses de Cd, embora tais diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. De forma contrária ao que foi observado aqui, cultivares de batata mais tolerantes ao Cd apresentaram maiores atividades desta enzima (STROINKSI; KOZLOWASKA, 1997). Com relação às raízes, não foram identificadas diferenças na atividade de CAT entre as doses 0 e 25 µM de $CdCl_2$, havendo um aumento significativo desta enzima somente na dose de 100 µM de $CdCl_2$ para ambas as cultivares (figura 10B). De forma similar ao que foi observado na atividade de CAT em folhas, também não encontradas diferenças significativas na atividade desta enzima entre as cultivares CR e PR, em cada uma das doses de Cd e no controle (figura 10B). Tais resultados são similares aos obtidos por Monteiro et al. (2011) e Gratão et al. (2012), onde foi relatada maior atividade de CAT em folhas e raízes de tomateiro da cv Micro-Tom, sob estresse causado pelo Cd.

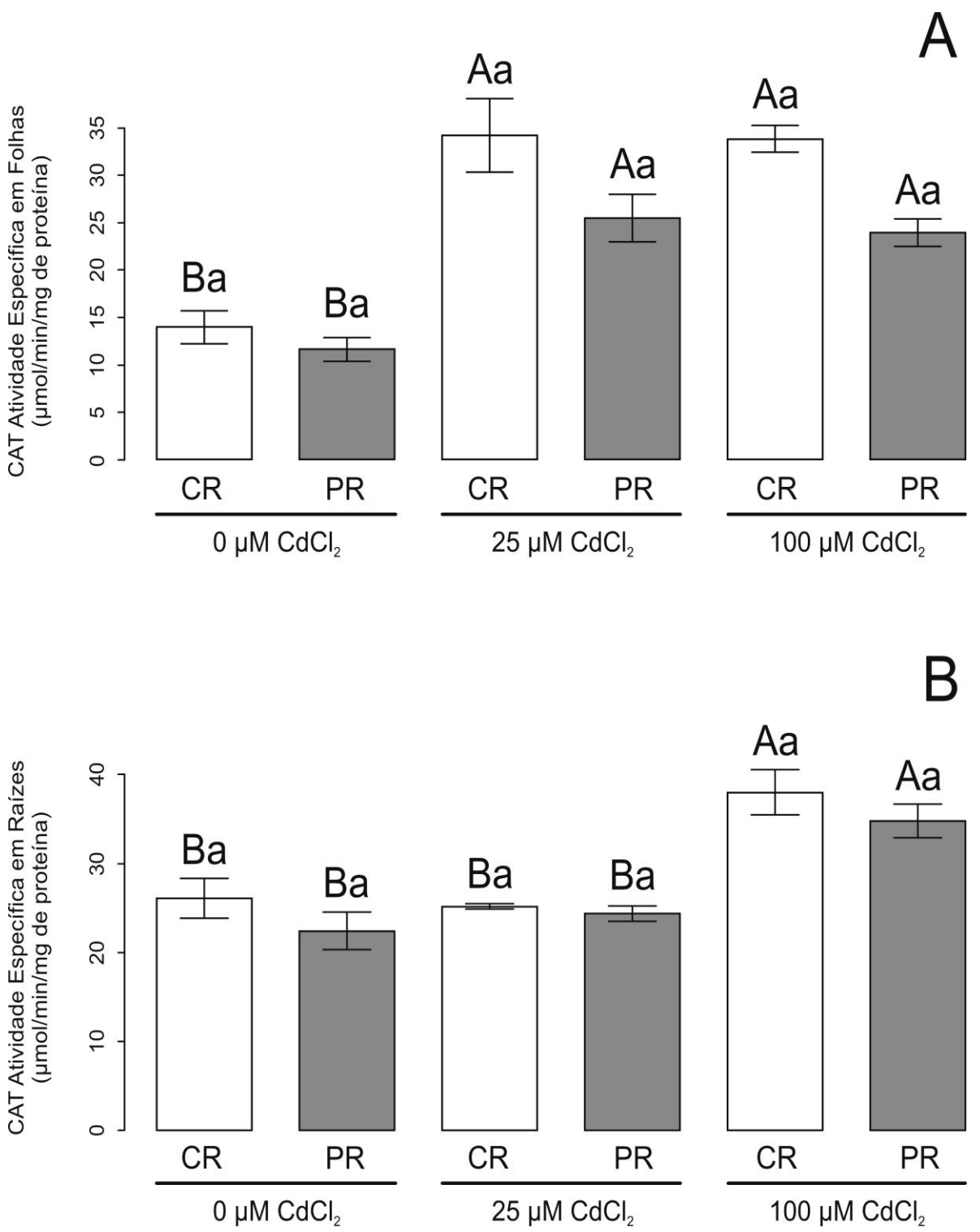

Figura 10 - Atividade específica de CAT determinada por espectrofotometria. A) Atividade específica de CAT em folhas das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. B) Atividade específica de CAT em raízes das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

A CAT pode apresentar diversas isoformas, desde duas (AZEVEDO et al., 1998) até mais de doze (FRUGOLI et al., 1996), conforme a espécie em questão. Neste trabalho, por meio da análise de atividade qualitativa em PAGE não desnaturante foi possível identificar três isoformas de CAT nas folhas (figura 11A) e uma única banda em raízes (figura 11B), cujos padrões de atividade foram similares aos encontrados na quantificação da atividade desta enzima por meio de espectrofotometria.

Assim, na ausência de Cd (0 µM de $CdCl_2$), foi possível observar uma maior atividade de CAT nas folhas da cv CR, sendo que ambas as cultivares apresentaram a expressão somente da isoforma CAT III. Já na dose de 25 µM de $CdCl_2$, houve a expressão das isoformas CAT II e III, onde a atividade da isoforma II parece ser muito maior em ambas as cultivares, em relação à isoforma I, a qual parece não ter sido alterada nesta dose de Cd (figura 11A). No tratamento em que as plantas foram expostas à dose de 100 µM de $CdCl_2$, as atividades das isoformas II e III foram significativamente maiores em relação ao controle sem Cd, havendo também a indução da isoforma I na cv PR, que é mais tolerante ao Cd (figura 11A).

Quanto à análise qualitativa de atividade da CAT em raízes, novamente observamos que o padrão de expressão dessa enzima em PAGE foi similar ao encontrar na análise quantitativa em espectrofotometria (figura 11B). Assim, vemos que há uma tendência de maior expressão da CAT em raízes na cv CR, em todas as três doses de Cd utilizadas. É possível notar que houve aumento sensível na atividade de CAT em raízes em ambas as cultivares, quando estas foram expostas à dose de 25 µM de $CdCl_2$. Contudo, o aumento de atividade mais expressivo foi obtido no tratamento com a dose de 100 µM de $CdCl_2$, no qual vemos maior intensidade nas bandas de CAT das duas cultivares, havendo maior atividade dessa enzima na cv CR (figura 11B).

De forma geral, a exposição das plantas de tomateiro das cultivares CR e PR às doses de 25 e 100 µM de $CdCl_2$ induziu o aumento na atividade de CAT nos tecidos de folhas e raízes. Resultados divergentes destes foram mostrados por Landberg e Greger (2002), os quais mostraram que clones tolerantes e sensíveis ao Cd de *Salix viminalis* tiveram ambos suas atividades de CAT reduzidas, embora, em geral, tal redução tenha sido menos acentuada nos acessos mais tolerantes.

Embora na análise quantitativa das raízes na dose de 25 µM de $CdCl_2$ não tenham sidos identificados aumentos significativos em relação ao controle, tal aumento na atividade pôde ser observado qualitativamente por meio da análise de intensidade das bandas de CAT em PAGE. Contudo, não foram encontradas diferenças significativas entre as cultivares CR e

PR, quanto à atividade CAT nos tecidos de folhas e raízes, embora haja uma clara tendência de maior expressão desta enzima pela cv CR.

Finalmente, podemos dizer que não há evidências de que a maior tolerância ao Cd da cv PR em comparação com a cv CR, seja devida à alterações na atividade da enzima CAT, pois em presença de Cd, as atividades desta enzima foram relativamente menores nesta cultivar mais tolerante. Por outro lado, a tendência de maior atividade da CAT na cv CR, que é mais sensível ao Cd, provavelmente é uma reposta à própria concentração de H_2O_2 nos tecidos, os quais foram mais elevados nesta cultivar, em relação à cv PR.

A maior atividade geral da CAT na cv CR, também é coerente com o fato desta cultivar apresentar níveis mais elevados de MDA nos tecidos, em função da exposição a doses crescentes de Cd. Assim, o padrão geral de atividade da enzima CAT parece seguir os padrões gerais de resposta ao aumento na concentração de H_2O_2 e do próprio estresse oxidativo, causados pela exposição à doses crescentes de Cd.

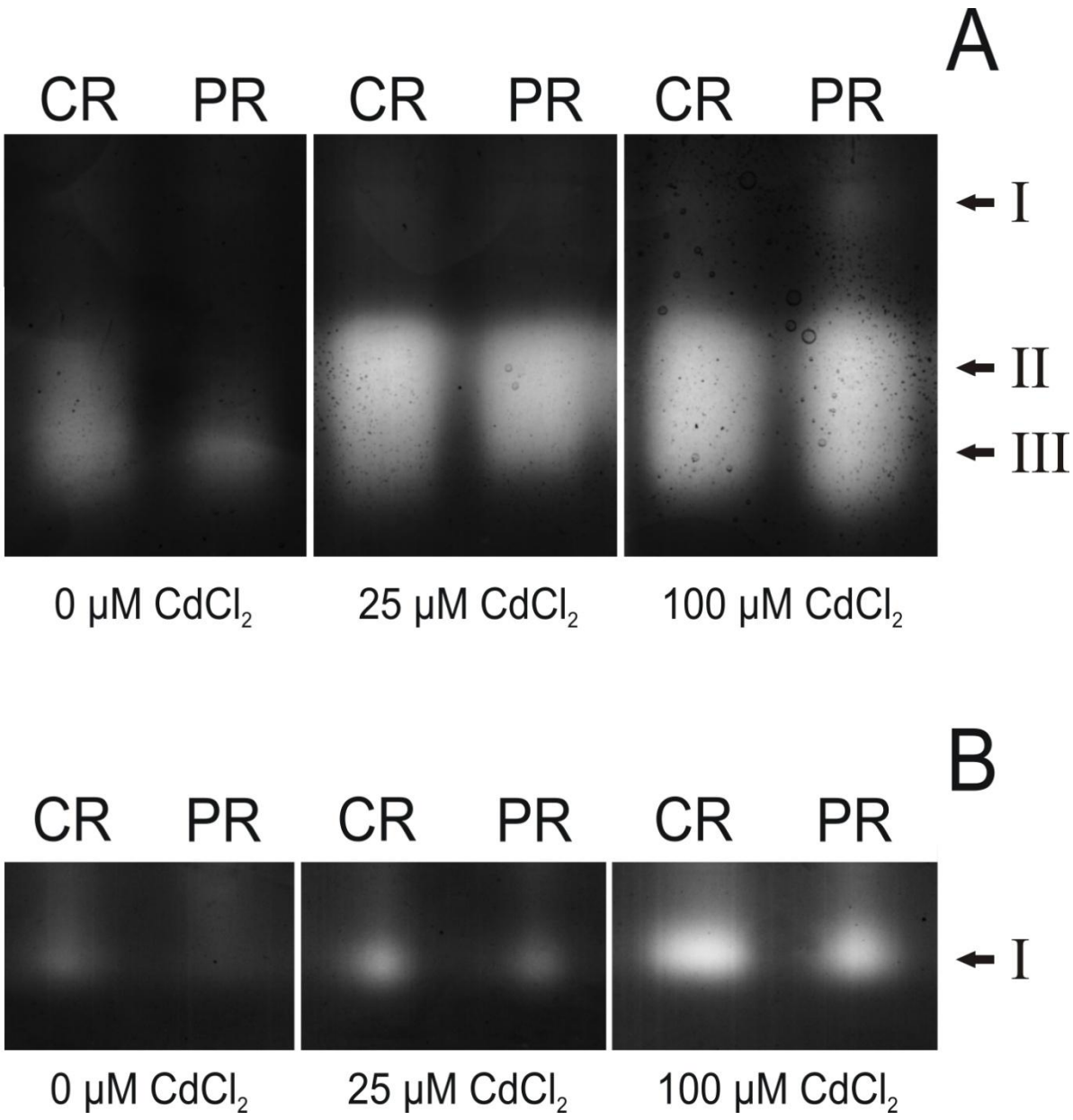

Figura 11 - Perfil da atividade de CAT em PAGE não desnaturante. A) Atividade de CAT em folhas das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. B) Atividade de CAT em raízes das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd

4.3.6.3 Atividade de GR em resposta ao Cd

Um dos processos celulares mais importantes na eliminação das EROs nos cloroplastos é chamado ciclo Ascorbato-Glutationa ou "Asada-Foyer-Halliwell", no qual ocorrem reduções e oxidações sucessivas do ascorbato (ASC), glutationa e NADPH, envolvendo as enzimas ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR) e glutationa redutase (GR), sendo esta a última enzima do ciclo (INZÉ; VAN MONTAGU, 1995). Dentre as enzimas deste ciclo, a GR é responsável pelo redução da glutationa oxidada (GSSG) para a glutationa reduzida (GSH), por meio de um processo dependente de NADPH. Por sua vez, a GSH desempenha papéis importantes no metabolismo celular, participando do ciclo Ascorbato-Glutationa (NOCTOR et al., 2002) sendo também um precursor na síntese de fitoquelatinas (INOUHE, 2005), que são moléculas importantes na defesa das plantas contra metais pesados em plantas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002), quelando e direcionando tais elementos para o vacúolo celular. Assim, a GR está envolvida no processo de combate ao estresse oxdativo em plantas, mantendo a glutationa reduzida para ser usada tanto no ciclo Ascorbato-Glutationa, através do qual o H_2O_2 é removido, quanto para ser incorporado nas fitoquelatinas, que são usadas diretamente no combate aos metais pesados nas células. Dada a importância da GR como componente do sistema antioxidante celular, neste trabalho a atividade desta enzima em folhas e raízes foi avaliada quantitativamente (espectrofotometria) e qualitativamente (PAGE não desnaturante).

A exposição das cultivares CR e PR ao Cd, induziu o aumento na atividade de GR somente nas folhas da cv CR, que é mais sensível ao metal, e nas raízes de ambas as cultivares (figura 12). As diferenças mais marcantes nas atividades de GR em função das doses de Cd, são observadas nas folhas da cv CR, uma vez que esta enzima apresentou atividades crescentes nestes tecidos, de forma proporcional ao aumento na dose do metal. No entanto, a cv PR não sofreu alterações na atividade desta enzima mesmo na dose mais alta de Cd (100 µM de $CdCl_2$) (figura 12A). Em relação às raízes, ambas as cultivares apresentaram aumento na atividade de GR (figura 12B). Porém, na cv PR tal aumento só foi significativo na quando comparamos a exposição às doses de 0 e 100 µM de $CdCl_2$. Já a cv CR, de forma similar ao que ocorreu nas folhas, mostrou aumento significativo na atividade de GR em raízes nas doses de 25 e 100 µM de $CdCl_2$, não havendo diferenças significativas na atividade desta enzima, entre ambas as dose de Cd.

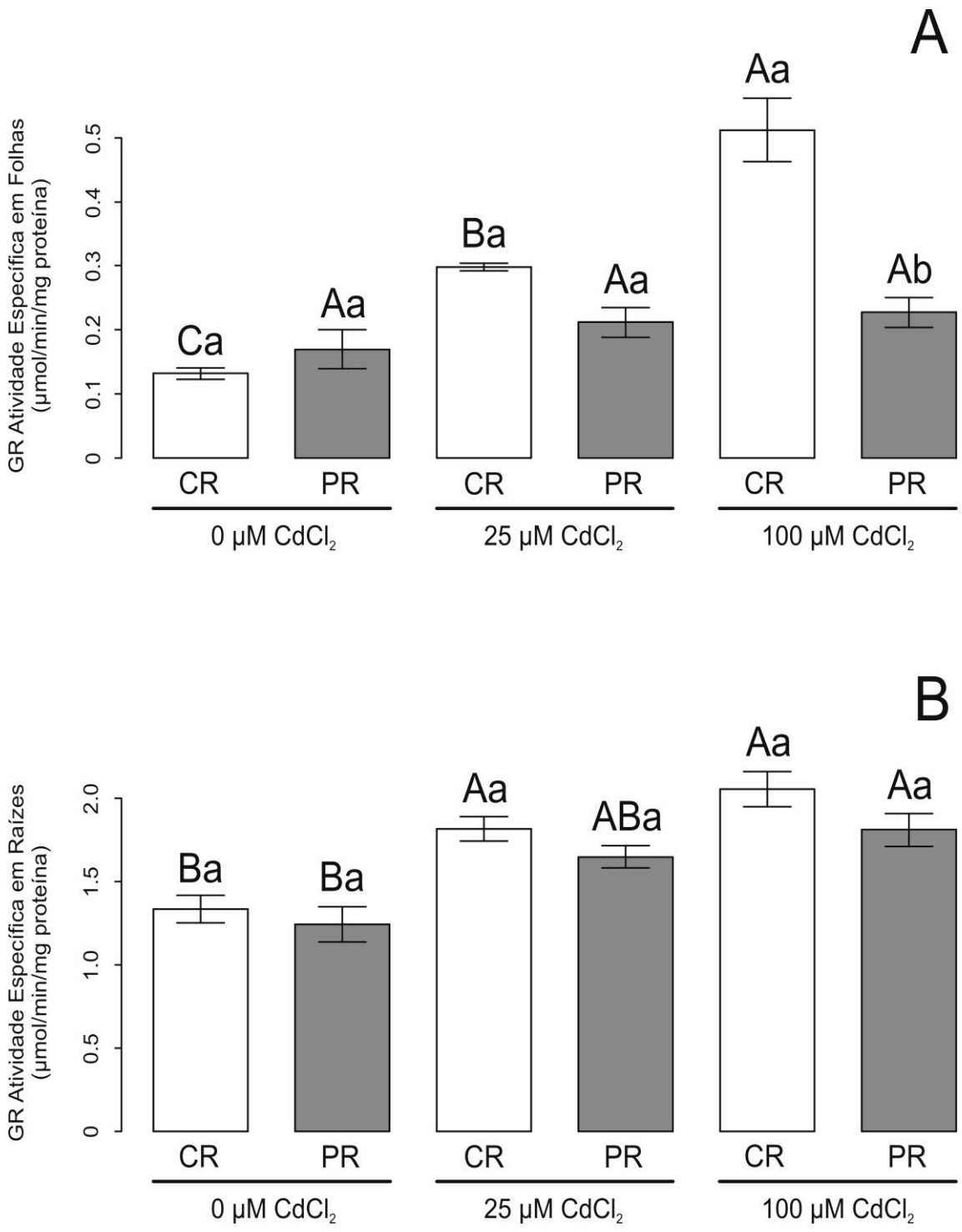

Figura 12 - Atividade específica de GR determinada por espectrofotometria. A) Atividade específica de GR em folhas das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. B) Atividade específica de GR em raízes das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo entre os tratamentos, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro. Letras minúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias entre genótipos de um mesmo tratamento, diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

De forma similar ao que foi observado, vários trabalhos tem mostrado o aumento da GR em reposta ao Cd, em espécies tais como *Crotalaria juncea* (PEREIRA et al., 2002), soja (FERREIRA et al., 2002), cana-de-açúcar (FORNAZIER et al., 2002), trigo (YANNARELLI et al., 2007), entre outros.

A análise de atividade de GR em PAGE não desnaturante revelou a presença de onze isoformas de GR nas folhas (figura 13A) e seis isoformas desta enzima nas raízes (figura 13B). Este número é relativamente elevado quando comparado com as quatro isoformas de GR identificadas em tabaco (POMPEU et al., 2008), quatro isoformas identificadas em células de café (GOMES-JÚNIOR et al., 2006) e mesmo em tomateiro, onde foram encontradas três isoformas em folhas e duas isoformas em raízes (AMMAR et al., 2008). Nas folhas, parece que a presença do Cd inibiu fortemente a expressão das isoformas I, II e IX, em ambas as cultivares. Por outro lado, os tratamentos com Cd parecem ter estimulado de forma geral a expressão das isoformas III, IV, V, VI, VII e VIII, embora na maior dose de Cd haja uma tendência de pequena redução na expressão das bandas V, VI e VII na cv PR, quando comparas com as bandas da dose de 25 µM de $CdCl_2$. Já as isoformas X e XI parecem não ter sofrido alterações devido à presença de Cd (figura 13A).

Nas raízes, também foi observada uma tendência geral de aumento na atividade de GR, em função dos tratamentos com Cd. Na figura 13B, observa-se que a expressão da isoforma I foi induzida na dose de 25 µM de $CdCl_2$ em ambas as cultivares, porém essa mesma isoforma foi inibida na cv CR, nas raízes das plantas expostas a 100 µM de $CdCl_2$. A isoforma II aparenta ter uma atividade maior na cv CR, nas raízes das plantas sem Cd. No entanto, a presença do metal nos tratamentos parece ter reduzido bastante a atividade desta isoforma na cv CR, principalmente na dose mais alta de 100 µM de $CdCl_2$. Para as isoformas III e V, não foram observadas alterações significativas no padrão de atividade, em relação às doses de Cd estudadas. Por fim, o aumento mais expressivo na atividade de GR em raízes seria devido à maior atividade da isoforma IV em presença de Cd, embora a maior atividade dessa isoforma na cv CR tenha sido observada na dose de 25 µM de $CdCl_2$.

A cv CR foi mais afetada pelo Cd de forma geral, sendo caracterizada como mais sensível a este metal do a cv PR. Foi demonstrado também que o Cd induziu a produção de H_2O_2 nas plantas, levando ao estresse oxidativo nos tecidos. Assim, é provável que o aumento mais expressivo da atividade de GR na cv CR, seja uma reposta ao estresse causado pelo Cd, devido, provavelmente ao aumento na concentração de EROs nas células, mas também devido à maior quantidade do próprio metal nos tecidos. Conforme foi demonstrado no capítulo anterior e no início deste capítulo, a cv CR acumula mais Cd nos tecidos de raiz e folhas. É

provável que a presença de maiores quantidade deste metal nas células desta cultivar, tenha levado à necessidade de aumentar a síntese de glutationa nas células dos tecidos, tanto para suprir a demanda do ciclo Ascorbato-Glutationa para eliminação do H_2O_2 (nos cloroplastos) (NOCTOR et al., 2002), quanto para aumentar a produção de fitoquelatinas (INOUHE, 2005). Assim, a maior atividade de GR na cv CR, estaria mais associada à própria presença de maiores concentrações de Cd nos tecidos de raízes e folhas desta cultivar, tendo em vista que o acúmulo de metal na cv PR foi relativamente menor quando comparado com a cv CR. Por fim, não há evidências que indiquem haver uma correlação entre atividade de GR e a tolerância ao Cd, sendo mais provável que as alterações na atividade desta enzima sejam devidas à própria resposta ao estresse causado por esse metal.

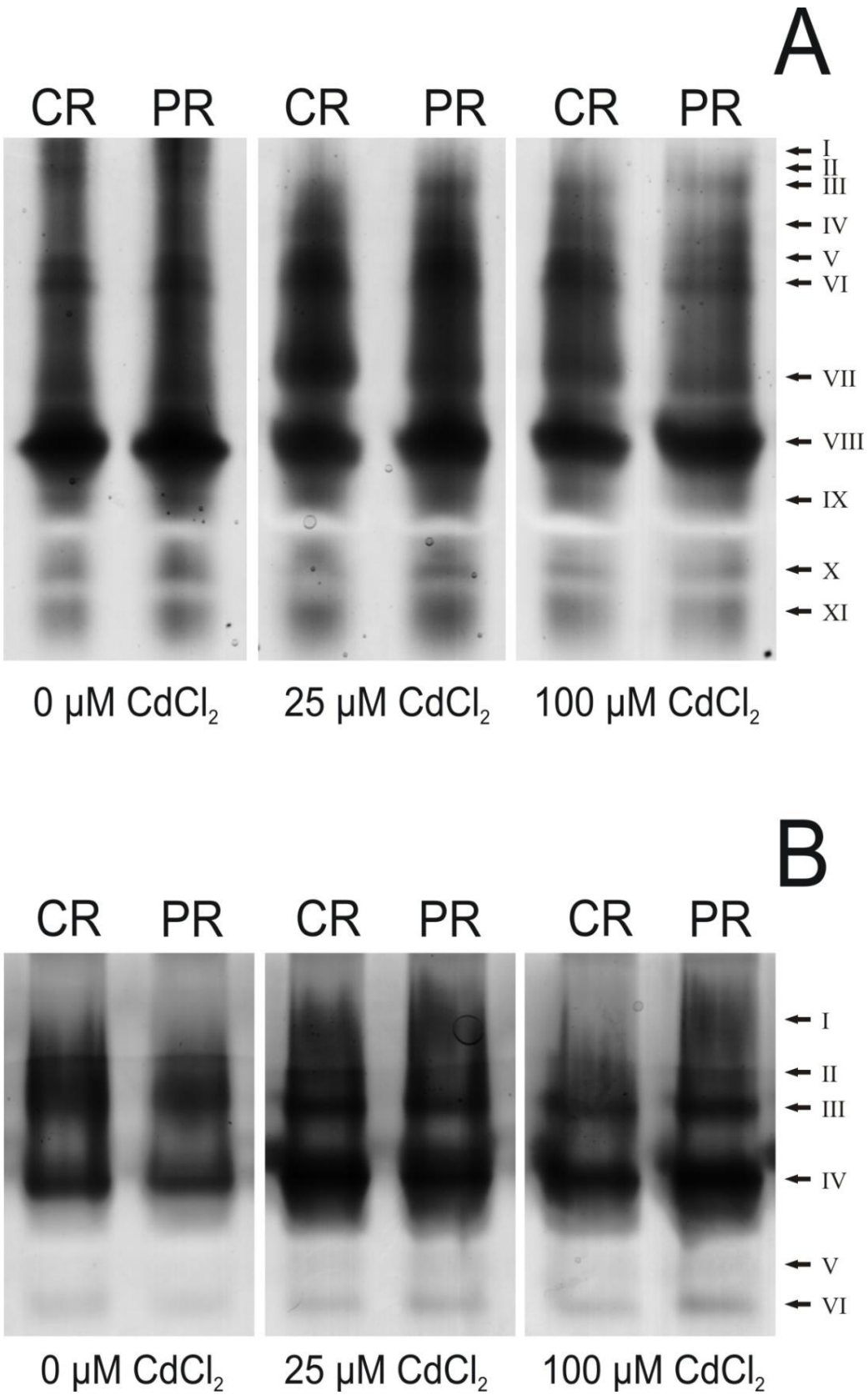

Figura 13 - Perfil da atividade de GR em PAGE não desnaturante. A) Atividade de GR em folhas das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd. B) Atividade de GR em raízes das cultivares de tomateiro, em função de doses crescentes de Cd

4.3.7 Relação entre o sistema antioxidante celular e a tolerância ao Cd

Para entender melhor as possíveis causas da tolerância ao Cd, vamos fazer uma correlação entre fatores aqui estudados, por meio da análise geral das diferentes respostas obtidas entre as plantas que cresceram na ausência de Cd e as plantas que foram expostas à dose de 25 µM de $CdCl_2$. A dose de 100 µM de $CdCl_2$ foi muito severa para as cultivares, não sendo muito informativa em nosso estudo sobre a tolerância dos tomateiros a este metal. Primeiramente, temos que a avaliação do acúmulo de massa seca (biomassa) entre as cultivares revelou que as plantas da cv PR se desenvolvem melhor na presença de Cd do que a cv CR, o que refletiu em diferenças no Índice de Tolerância (IT) entre elas. Porém, na análise do desenvolvimento entre raízes e parte aérea das plantas, foi constatado que as raízes da cv PR não tiveram seu desenvolvimento afetado pelo metal, havendo até mesmo um pequeno estímulo para o crescimento destas, ao passo que as raízes da cv CR foram severamente prejudicadas pelo Cd. Notoriamente, o padrão de variação nos ITs foi muito similar ao padrão de variação no desenvolvimento das raízes, parecendo haver uma boa correção entre o IT e o desenvolvimento do sistema radicular. As plantas da cv CR foram também as que mais acumularam Cd nos tecidos, tal como observado no capítulo anterior. De alguma forma, parece que a cv CR assimila mais Cd do que a cv PR, o que certamente estaria induzindo os maiores níveis de estresse oxidativo observados nas plantas desta cultivar.

Foi também demonstrado que a Rubisco, uma das enzimas mais abundantes e importantes para o metabolismo celular, teve sua produção extremamente reduzida na cv CR, por conta do tratamento com Cd. Os danos severos na produção da Rubisco pela presença do Cd na cv CR, provavelmente prejudicou a expressão de diversas outras proteínas, conforme foi demonstrado pelo estudo do perfil proteico em SDS-PAGE. Tal redução na Rubisco pode ser a consequência do excesso das EROs geradas pelo Cd na matriz celular e nas organelas como os cloroplastos, podendo ser também devido à ação direta deste metal sobre essa importante enzima. De alguma forma, a Rubisco na cv CR parece ser mais afetada do que na cv PR, pois mesmo na dose mais elevada de Cd é possível encontrar algum grau de expressão dessa enzima na cultivar mais tolerante.

O estresse oxidativo observado nas plantas expostas ao Cd, levou a uma resposta do sistema antioxidante celular, aumentando a atividade das enzimas SOD, CAT e GR. Uma vez que o estresse oxidativo foi maior na cv CR, as atividades enzimáticas também foram maiores nesta cultivar. A diferença mais marcante entre as enzimas estudadas foi em relação à atividade de GR nas folhas das cultivares PR, que é mais tolerante ao Cd, a qual praticamente

não apresentou alterações na atividade desta enzima, mesmo na dose mais alta de Cd. Isso pode indicar que existem outros mecanismos impedindo que o estresse ocorra em níveis elevados nesta cultivar. Um destes mecanismos poderia ser aumento na produção de fitoquelatinas. Porém, um dos indicativos de maior produção de fitoquelatinas poderia ser o próprio aumento na atividade de GR, o qual curiosamente foi maior na cv CR, o que não reverteu sua alta sensibilidade ao Cd.

De forma geral, não foi possível estabelecer uma correlação entre tolerância ao Cd e as alterações nas atividades de SOD, CAT e GR, as quais fazem parte do sistema antioxidante enzimático celular. Neste trabalho, foi demonstrado que o Cd gerou estresse oxidativo nas plantas de ambas as cultivares estudadas, sendo que os níveis de estresse na cv CR, mais sensível ao Cd, foi maior que o nível de estresse da cv PR. Por esse motivo, as enzimas SOD, CAT e GR também tiveram incremento em suas atividades na presença do Cd, provavelmente em decorrência do maior estresse causado pelo mesmo. Com isso, fica evidente que as maiores atividades enzimáticas observadas na cv CR, em contraste com as menores atividades das enzimas na cv PR, estariam associadas ao grau de estresse que cada uma delas estaria sofrendo, o que em última análise, seria função da maior ou menor tolerância ao Cd, demonstrada por cada cultivar. Por outro lado, o aumento na concentração de H_2O_2 não casou estresse oxidativo na cv PR exposta à 25 µM de $CdCl_2$, mostrando que as principais alterações no metabolismo oxidativo podem estar relacionadas com mecanismos de sinalização celular, modulando fatores genéticos e bioquímicos que tornariam esta cultivar mais tolerante ao Cd. No entanto, os mecanismos que tornam uma cultivar mais tolerante ou mais sensível ao Cd não puderam ser elucidados, pois nenhuma das respostas em nível celular pôde ser associada diretamente às diferenças de tolerância entre as cultivares.

Para elucidar com mais clareza os mecanismos envolvidos na tolerância e sensibilidade ao Cd entre as cultivares CR e PR, são necessárias mais investigações sobre as principais vias, enzimáticas e não enzimáticas de combate ao estresse oxidativo, bem como em relação aos demais compostos que conhecidamente estão envolvidos na tolerância de plantas aos metais pesados.

4.4 Conclusões

Neste trabalho, avaliamos o impacto do metal pesado Cd sobre o metabolismo oxidativo das cultivares de tomateiro Calabash Rouge (CR) e Pusa Ruby (PR), as quais foram previamente classificadas, respectivamente, como sendo mais sensível e mais tolerante a este

metal. Finalmente, o somatório de resultados deste estudo relacionando a atividade de enzimas do sistema antioxidante celular com as diferenças de tolerância ao Cd nas cultivares de tomateiro, nos conduziram às seguintes conclusões:

1) A taxa de crescimento e o IT calculado para as cultivares CR e PR, expostas às doses de 0, 25 e 100 µM de $CdCl_2$, confirmaram as diferenças de tolerância observadas entre estas cultivares.

2) O estresse oxidativo, estimado pelo aumento na concentração de MDA nos tecidos, foi menor na cultivar mais tolerante ao Cd (PR) e maior na cultivar mais sensível a este metal (CR).

3) As alterações nas atividades das enzimas SOD, CAT e GR não foram suficientes para explicar as diferenças de tolerância entre as cultivares CR e PR, pois os incrementos de atividade observados, seguiram o mesmo padrão do incremento do nível de estresse oxidativo nas plantas de ambas as cultivares.

4) A maior sensibilidade ao Cd da cv CR pode estar relacionada, em parte, à maior absorção deste metal pelas plantas desta cultivar, o qual seria translocado com mais facilidade para a parte aérea das plantas, aumentando o impacto negativo deste fator estressante nestes tecidos.

5) A maior tolerância ao Cd da cv PR pode estar relacionada, em parte, ao menor acúmulo deste metal nos tecidos desta planta, somado à alterações no metabolismo e sinalização celular que contribuiriam para a manutenção da homeostase das células e maior integridade dos tecidos. Contudo, tais mecanismos não puderam ser elucidados neste trabalho.

Referências

AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. **Journal of Plant Biology**, Amsterdam, v. 51, p. 167-173, 2008.

ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S. KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 1337-1344, 2001.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 53, p.1331-1341, 2002.

ALVAREZ, M. E.; PENNELL, R. I.; MEIJER, P. J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R. A.; AND LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 92, p. 773-784, 1998.

AMMAR, B. W.; MEDIOUNI, C.; TRAY, B.; GHORBEL, M. H.; JEMAL, F. Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 52, p. 314-320, 2008.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p. 601-639, 1999.

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

BARTLETT, M. S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 160, p. 268-282, 1937.
BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p. 276-287, 1971.

BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

DAS, N.; SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, M. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 63, p. 4120-4122, 1997.

DEL RIO, L. A.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; BARROSO, J. B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1255-1272, 2002.
DEWIR, Y. H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbi millii* lyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany,** Oxford, v. 58, p. 93-99, 2006.

DONG, M.; YEH, F.; TEPP, W. H.; DEAN, C.; JOHNSON, E. A.; JANZ, R.; CHAPMAN, E. R. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. **Science**, Oxford, v.312, p. 592-596, 2006.

FERREIRA, R. R.; FORNAZIER, R. F.; VITORIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FORNAZIER, R. F.; FERREIRA, R. R.; PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; SMITH, R. J.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, p. 125-131, 2002.

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta,** Berlin, v. 133, p. 21-25, 1976.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 27, p. 97-112, 1995.

FRUGOLI, J. A.; ZONGH, H. H.; NUCCIO, M. L.; McCOURT, P.; McPEEK, M. A.; THOMAS, T. L.; McCLUNG, C. R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 2, p. 49-55, 1999.

GALLEGO, S.M.; BENAVÍDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Limerik, v. 121, p. 151-159, 1996.

GIAVENO, C. D.; MIRANDA FILHO, J. B. Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 847-850, 2000.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reative oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1330–1337, 2006.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.56, n.1, p.79-96, 2012.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ANTUNES, A. M.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, p. 321-333, 2008.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 32, p. 81-494, 2005.

GUO, T. R.; ZHANG, G. P.; ZHOU, M. X.; WU, F. B.; CHEN, J. X. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 258, p. 241-248, 2004.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1-11, 3, 2002.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 57, p. 715-725, 1993.

HASSAN, M. J.; ZHANG, G. P.; WU, F. B.; WEI, K.; CHEN, Z. H. Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 168, p. 255-261, 2005.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, p.189-198, 1968.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Univ. California agric. Exp. Sta., 1950, 32 p.

HOSSAIN, M.; ZHOU, M.; MENDHAM, N. A reliable screening system for aluminium tolerance in barley cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research,** Victoria, v. 56, p. 475-482, 2005.

IANNELLI, M.A., PIETRINI, F., FORE, L., PETRILLI, L.; MASSACCI, A. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 977-982, 2002.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The Role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organism. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 651-674, 2002.

INOUHE, M. Phytochelatins. **Braziliam Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 65-78, 2005.

INZE, D.; VAN MONTAGU, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 6, p. 153-158, 1995.

LANDBERG, T.; GREGER, M. Interclonal variation of heavy metal interactions in *Salix viminalis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York**,** v. 21, p. 2669-2674, 2002.

LARBI, A.; MORALES, F.; ABADIA, A.; GOGORCENA,Y.; LUCENA, J. J.; ABADIA, J. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. **Functional Plant Biology**, Victoria, v.29, n.12, p.1453-1464, 2002.

LEE, D. H.; LEE, C. B. Chiling stress induced changes of antioxidants enzymes in the leaves of cucumber: In gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Limerik, v.159, p. 75-85, 2000.

LEÓN, A. M.; PALMA. J. M.; CORPAS, F. J.; GOMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R. M.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, p. 813-820, 2002.

LIU, D. H., JIANG, W. S.; GAO, X. Z. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. **Biologia Plantarum,** Praha, v. 47, p. 79-83, 2003.

LIU, K. L.; SHEN, L.; WANG, J. Q.; SHENG, J. P. Rapid Inactivation of Chloroplastic Ascorbate Peroxidase is Responsible for Oxidative Modification to Rubisco in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) under Cadmium Stress. **Journal of Integrative Plant Biology,** Wiley, v. 50, p. 415-426, 2008,

LIU, Y. G.; WANG, X.; ZENG, G. M.; QU, D.; GU, J. J.; ZHOU, M.; CHAI, L. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbateglutathione cycle in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud. **Chemosphere,** Oxford, v. 69, p, 99-107, 2007.

LÓPEZ-MILLÁN, A. F.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.65, p.376-385, 2009.

MA, J. F.; ZHENG, S. J.; LI, X. F.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, H. A rapid hydroponic screening for aluminium tolerance in barley. **Plant and Soil**, The Hague, v. 191, p.133-137, 1997.

MANN, G. C. Genetic engineers aim to soup up crop photosynthesis. **Science**, Oxford, v. 283, p. 314-316, 1999.

MARTINS, P. F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P. L.; DOURADO, M. N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, R. A. Effect of chloroacetanilide herbicides on antioxidant enzymes of soil isolated bacteria. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, p. 1186-1195, 2011.

McCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American journal of medicine**, Barcelona, v. 108, p. 652-658, 2000.

MILLER, J. C.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 80, p. 437-448, 1990.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; GRATÃO, P. L.; CARVALHO, G.; TEZOTTO, T.; MEDICI, L.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 71, p. 306-320, 2011.

MULLINEAUX, P.; KARPINSKI, S. Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. **Current Opinion in Plant Biology,** Philadelphia, v. 5, p. 43-48, 2002.

NOCTOR, G.; VELJOVIC-JOVANOVIC, S. D.; DRISCOLL, S.; NOVITSKAYA, L.; FOYER, C. H. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, London, v. 89, p. 841-850, 2002.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C. A**.** Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Science,** Washington, v. 96, p. 6553-6557, 1999**.**

PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, n. 1, p. 123-132, 2002.

PIETRINI, F.; IANNELLI, M. A.; PASQUALINI, S.; MASSACCI, A. Interaction of Cadmium with Glutathione and Photosynthesis in Developing Leaves and Chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, Washington, v. 133, p. 829-837, 2003

POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; VITORELLO, V. A.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 65, p. 548-552, 2008.

ROMERO-PUERTAS, M. C.; PALMA, J. M.; GOMEZ, M.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. **Plant, Cell and Environment,** Oxford, v.25, p.677-686, 2002.

SHAH, K.; KUMAR, R. G.; VERMA, S.; DUBEY, R. S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, Limerik, v. 161, p. 1135-1144, 2001.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, London, v. 52, p. 591-611, 1965.

SHAW, B. P.; SAHU, S. K.; MISHRA, R. K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants:** From biomolecules to ecosystems. Berlin: Springer, 2004. p.84-126.

SKIRYCZ, A.; INZÉ, D. More from less: plant growth under limited water. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 21, p.197-203, 2010.

SMITH, I.; VIEWELLER, T. L.; THORNE, C. A. Assay of Glutathione Reductase in Crude Tissue Homogenates Using 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid). **Analytical biochemistry**, New York, v.175, p. 408-413, 1988.

STROINSKI, A.; KOZLOWSKA, M. Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warsaw, v. 66, p. 189-195, 1997.

TAMÁS, L.; BUDIKOVA, S.; SIMONOVICOVA, M.; HUTTOVA, J.; SIROKA, B.; MISTRIK, I. Rapid and simple method for Al-toxicity analysis in emerging barley roots during germination. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, p. 87-93, 2006.

TYBURSKI, J.; DUNAJSKA, K.; MAZUREK, P.; PIOTROWSKA, B.; TRETYN, A. Exogenous auxin regulates H2O2 metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. **Acta Physiol Plant**, Palermo, v. 31, p. 249-260, 2009.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effect of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment,** Oxford, v.3, p. 195-206, 1990.

VITORIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 701-710, 2001.

WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 44, p. 71-80, 2004.

YANNARELLI, G. G.; FERNANDEZ-ALVAREZ, A. J.; SANTA-CRUZ, D. M.; TOMARO, M. L. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roods of wheat plants subjected to cadmium stress. **Phyrochemistry**, Oxford, v. 68, p. 505-512, 2007.

ZÁMOCKÝ, M.; KOLLER, F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, Oxford, v. 72, p. 19-66, 1999.