**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Diferentes abordagens para o estudo da resposta de solanáceas ao Cd

Milca Bartz Vilhena

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

**Piracicaba
2015**

Milca Bartz Vilhena
Bacharel em Biotecnologia

Diferentes abordagens para o estudo da resposta de solanáceas ao Cd
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2015

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

Vilhena, Milca Bartz

Diferentes abordagens para o estudo da resposta de solanáceas ao Cd / Milca Bartz Vilhena. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
88 p. : il.

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

1. Estresse oxidativo 2. Sistema antioxidante 3. Cádmio 4. Pimenta 5. Tomateiro
6. Enxertia I. Título

CDD 635.64
V711d

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

*Ao meu pai **José** pelo exemplo de honestidade e apoio que sempre deu aos meus estudos.*

*A minha mãe **Waurie** pelo exemplo de garra, luta e sempre procurar fazer o melhor.*

*Aos meus irmão **Tiago** e **Naara** pelo amor, amizade e por sempre confiarem em meu potencial.*

DEDICO

*Ao meu amado marido **Thiago** pelo amor, força e apoio incondicional.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela orientação, confiança, conselhos e amizade. Agradeço não só pelo aprendizado e experiência, mas por ter me recebido em seu laboratório desde o mestrado, por ter depositado confiança na minha capacidade e me dado liberdade caminhar de forma independente, e principalmente, pelo exemplo de profissionalismo.

À Dra. Salete Gaziola, pela atenção, incentivo, discussões e apoio durante a realização deste trabalho, além de, simplesmente fazer toda a diferença no dia a dia do laboratório.

Ao Prof. Dr. Francisco Antonio Monteiro, pelo apoio e amizade, e por ter disponibilizado seu laboratório para a realização da quantificação de metais.

À Prof. Dra. Priscila Lupino Gratão, que sempre me apoiou e esteve à disposição para discussões científicas. Agradeço também pela sua amizade e exemplo de perseverança.

Ao Dr. Fernando Angelo Piotto, colega de laboratório, pelo apoio e ensinamentos sobre o tomateiro.

À Dra. Georgia Bertoni Pompeu, pela amizade, discussões científicas e apoio durante esse trabalho.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas, Aline, Berenice, Carolina, Daiana, Daniel, Fabiana, Felipe, Fernando, Flávia, Georgia, Giselle, Karina, Leila, Lucas, Lucélia, Manuella, Márcia, Monica, Paula, Priscila, Rogério, Roberta, Sandra e Vanessa, pelas conversas e apoio durante a realização desse trabalho.

À ESALQ e ao Departamento de Genética, pela oportunidade e por toda a infraestrutura necessária para a realização do Doutorado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pelo apoio financeiro, projeto temático 2009/54676-0.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	13
2 USO DA TÉCNICA DE ENXERTIA EM TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) NA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CÁDMIO	15
Resumo	15
Abstract.....	15
2.1 Introdução	16
2.2 Material vegetal, Modelo experimental e Resultados preliminares	19
2.2.1 Primeiro teste (cultivo em areia).....	21
2.2.2 Segundo teste (cultivo em hidroponia).....	22
2.2.3 Terceiro teste (cultivo em hidroponia).....	23
2.3 Resultados e Discussão.....	23
Referências	30
3 EFEITO DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE DE PIMENTA DOCE COMPRIDA (<i>Capsicum annuum</i> L.)	35
Resumo	35
Abstract.....	35
3.1 Introdução	36
3.2 Material e Métodos	41
3.2.1 Material Vegetal e Cultivo	41
3.2.2 Curva de Dose-Resposta ao CdCl ₂	42
3.2.3 Parâmetros avaliados	43
3.2.3.1 Massa seca e quantificação de Cd	43
3.2.3.2 Peroxidação lipídica	43
3.2.3.3 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	44
3.2.3.4 Extração enzimática e determinação proteica	44
3.2.3.5 Ensaio enzimáticos.....	44
3.2.3.5.1 Superóxido Dismutase (SOD) – EC 1.15.1.1	44
3.2.3.5.2 Catalase (CAT) – EC 1.11.1.6.....	45
3.2.3.5.3 Ascorbato Peroxidase (APX) – EC 1.11.1.1	45

3.2.3.5.4 Glutationa Redutase (GR) – EC 1.6.4.2.....	45
3.2.3.5.5 Glutationa S-transferase (GST) – EC 2.5.1.18.....	46
3.2.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	46
3.2.3.6.1 Atividade SOD.....	46
3.2.3.6.2 Atividade CAT.....	47
3.2.3.6.3 Atividade GR	48
3.2.3.7 Compostos antioxidantes	48
3.2.3.7.1 Quantificação de glutathione	48
3.2.3.7.2 Quantificação de ascorbato	50
3.3 Resultados	51
3.3.1 Massa seca e quantificação de Cd.....	51
3.3.2 Peroxidação lipídica.....	54
3.3.3 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	55
3.3.4 Extração enzimática e determinação proteica.....	56
3.3.5 Ensaios enzimáticos	57
3.3.5.1 Atividade SOD.....	57
3.3.5.2 Atividade CAT.....	58
3.3.5.3 Atividade APX.....	59
3.3.5.4 Atividade GR	61
3.3.5.5 Atividade GST	62
3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	63
3.3.6.1 Perfil de proteínas (SDS-PAGE).....	63
3.3.6.2 Atividade SOD.....	64
3.3.6.3 Atividade CAT.....	66
3.3.6.4 Atividade GR	67
3.3.7 Compostos antioxidantes	67
3.3.7.1 Quantificação de glutathione	68
3.3.7.2 Quantificação de ascorbato	69
3.4 Discussão	70
3.5 Conclusão.....	80
Referências.....	80

RESUMO

Diferentes abordagens para o estudo da resposta de solanáceas ao Cd

O metal pesado cádmio (Cd) é um contaminante ambiental de grande relevância devido aos vários problemas que pode causar para a agricultura, como perdas na produção e na qualidade dos alimentos, podendo oferecer riscos à saúde humana através do consumo de vegetais contaminados. Neste trabalho abordamos duas formas diferentes e independentes para o estudo do estresse oxidativo. Exploramos métodos para compreender melhor: a interação do Cd com o sistema antioxidante de pimentas; bem como os mecanismos responsáveis pela tolerância ao metal utilizando tomateiros com diferentes graus de tolerância em diferentes combinações de enxertia. Resultados interessantes foram obtidos para a combinação de uma variedade sensível enxertada em uma variedade tolerante ao Cd, que apresentou melhor crescimento enxertada em relação a cada uma das variedades enxertadas como controle, inclusive na presença de Cd. Tais resultados podem indicar novos caminhos de pesquisa. No estudo com a pimenta também encontramos respostas notáveis com relação ao sistema antioxidante, em especial, na resposta do ciclo ascorbato-glutationa, cujos compostos antioxidantes foram os principais protagonistas na defesa da planta contra o estresse por Cd.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Sistema antioxidante; Cádmio; Pimenta; Tomateiro; Enxertia

ABSTRACT

Different approaches to study the responses to Cd stress in *Solanaceae*

The heavy metal cadmium (Cd) is an environmental contaminant of great relevance because this element can cause several problems to agriculture, such as production decrease and poor food quality, thereby posing risk to human health through consumption of contaminated vegetables. In this research, we used two different and independent approaches to study the oxidative stress. We explored methods: to better understand Cd interaction with the antioxidant system of pepper; as well as the mechanisms responsible for conferring tolerance to this metal, using tomatoes with different degrees of tolerance grafted in different combinations. Interesting results were obtained, especially when the sensitive tomato line was grafted onto the most tolerant one, presenting a better growth index even in the presence of Cd. These results might lead to new research alternatives and approaches. The results from the study with pepper revealed noteworthy responses regarding the antioxidant system, especially in the ascorbate-glutathione cycle response, whose antioxidant compounds were the main protagonists in the plant defense against stress by Cd.

Keywords: Oxidative stress; Antioxidant system; Cadmium; Pepper; Tomato; Grafting

1 INTRODUÇÃO

Dentre as angiospermas de importância econômica as Solanáceas se destacam por apresentar ampla distribuição geográfica e compreender entre 3000 a 4000 espécies (KNAPP et al., 2004). O tomateiro e a pimenta são espécies vegetais que apresentam grande importância agrícola e, decorrência de sua elevada produção mundial e também pelo fato de seus frutos serem consumidos *in natura* ou processados. Além disso, são plantas modelo para estudos relacionados à avaliação dos efeitos de metais pesados, que é o foco do presente trabalho.

O cádmio (Cd) é um dos principais contaminantes ambientais e um dos mais tóxicos dentre os metais pesados (GALLEGO et al., 2012). O acúmulo de Cd em determinados tecidos da planta pode levar à rejeição comercial de certos cultivares, diminuição da produtividade, além de se tornar perigoso à saúde humana (DI BACCIO et al., 2014). Assim, o estudo do impacto do Cd sobre as culturas agrícolas tem elevada importância nas mais diversas áreas de estudo que compreendem a Agronomia, Medicina e Biologia.

Sabe-se que o sistema antioxidante das plantas desempenha papel fundamental na defesa contra estresses bióticos e abióticos, que geram o estresse oxidativo, caracterizado por um desbalanço em qualquer compartimento celular entre produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) e defesa antioxidante (GRATÃO et al, 2005).

Dada a importância deste tema, desenvolvemos nesse trabalho dois estudos com diferentes abordagens e independentes para obtermos conhecimento adicional sobre o estresse gerado pelo Cd em plantas. No primeiro capítulo descrevemos alguns aspectos do comportamento de tomateiros com diferentes graus de tolerância ao Cd quando enxertados e subsequentemente submetidos à presença deste metal. E no segundo capítulo, descrevemos algumas das respostas de enzimas e compostos antioxidantes de pimenta doce comprida exposta ao Cd em dois momentos – respostas precoce e tardia.

Referências

DI BACCIO, D.; CASTAGNA, A.; TOGNETTI, R.; RANIERI, A.; SEBASTIANI, L. Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 171, n. 18, p. 1693–1705, 2014.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, M.F.; ROSALES, E.P.; ZAWOZNIK, M.S.; GROPPA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms.

Environmental and Experimental Botany, Oxford, v. 83, p. 33–46, 2012.

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**, Collingwood, v. 32, p. 481–494, 2005.

KNAPP, S.; BOHS, L.; NEE, M.; SPOONER, D. M. Solanaceae – a model for linking genomics with biodiversity. **Comparative and functional genomics**, New York, v. 5, p. 285–291, 2004.

2 USO DA TÉCNICA DE ENXERTIA EM TOMATEIRO (*Solanum Lycopersicum* L.) NA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CÁDMIO

Resumo

A cultivar de tomateiro Micro-Tom pode ser considerado um importante modelo para estudos em biologia, fisiologia, bioquímica, proteômica e genômica, por suas características de alta diversidade em metabólitos secundários e genoma pequeno. Hoje o tomateiro é considerado um modelo alternativo à *Arabidopsis*. Sabe-se que dentre os principais agentes xenobióticos de contaminação ambiental estão os metais pesados, decorrentes da intensa atividade agroindustrial das últimas décadas, entre outras fontes de contaminação. Metais pesados liberados no ambiente terrestre tendem a se concentrar no solo e sedimentos, que passam a se tornar um grande reservatório disponível para as raízes das plantas, que são muito vulneráveis à variação de concentrações destes elementos. Além disso, em especial o cádmio (Cd) é um elemento não essencial que está entre os poluentes ambientais mais tóxicos a humanos, animais e plantas mesmo em baixas concentrações. O Cd é prontamente absorvido pelas plantas, causando mudanças significativas no metabolismo da planta e induzindo o estresse oxidativo, sendo transportado para as partes aéreas, facilitando sua entrada na cadeia alimentar. Foram realizados diversos testes de enxertia e adequação experimental, bem como analisadas as melhores técnicas para extração de proteínas para análise 2D-PAGE das proteínas diferencialmente expressas em tomateiros expostos ao Cd.

Palavras chave: Enxertia; Cádmio; Tomateiro

Abstract

The tomato cultivar Micro-Tom may be considered an important study for biology, physiology, biochemistry, proteomics and genomics due to its characteristics of high diversity of secondary metabolites, tissues and small genome. Tomato is considered today an alternative model to *Arabidopsis*. Among the major aggravating environmental pollutants, we can mention the heavy metals arising from the intense agricultural activity, among others, in the last few decades. Heavy metals released into the terrestrial environment tend to concentrate in the soil and sediments, which become a huge reservoir available to plant roots, which are very vulnerable to the concentration variation of these elements. Furthermore, cadmium (Cd) in particular is a non-essential element among the most toxic environmental pollutants to humans, animals and plants even in low concentrations. Cd is readily absorbed by plants, causing significant changes to the plant metabolism and inducing oxidative stress, it can be transported to aerial parts, enabling its entry into the food chain. Several grafting tests and pilot experiments were performed, as well as several techniques for protein extraction for 2D-PAGE analysis of differentially expressed proteins in tomato plants exposed to Cd were analyzed.

Keywords: Grafting; Bidimensional electrophoresis; Cadmium; Tomato.

2.1 Introdução

O modelo de estudo: Solanum lycopersicum L. cv. Micro-Tom

O tomateiro é considerado uma excelente planta modelo para o estudo de espécies da família *Solanaceae* tanto para estudos biológicos, fisiológicos, bioquímicos como genéticos, apresentando alta diversidade de metabólitos secundários e tecidos (EZURA, 2009; SAITO et al., 2011).

Considerando os estudos nas áreas de genômica e proteômica, o tomateiro apresenta a vantagem de ter um genoma relativamente pequeno (950 Mb), apresenta o mesmo número haploide de cromossomos e organização conservada do genoma com outras solanáceas, e por isso seu genoma foi recentemente sequenciado pelo *International Solanaceae Genomics Project* (SOL) (SZINAY et al., 2010; OKABE et al., 2013). Além disso, é uma espécie altamente cultivada, de grande importância agrícola e econômica. Possibilita ainda a realização de enxertias, o que é uma alternativa interessante para estudos da interação do sistema radicular com a parte aérea da planta (LING et al., 2002; ESTEVEZ-CAPARROS et al., 2011).

A grande diversidade de tecidos facilita a condução de análises bioquímicas, sendo também um padrão morfológico diferente do modelo *Arabidopsis* (LIMA et al., 2004; PINO et al., 2010). Isso propicia que o tomateiro seja um modelo adicional de estudos, diversificando linhas de pesquisa, resultados encontrados e padrões para estudos comparativos (MEISSNER et al., 1997). Além disso, a cultivar miniatura de tomateiro proposta por Meissner et al. (1997) como modelo genético, produz frutos e sementes viáveis, completando seu ciclo de vida entre 70 e 90 dias. Portanto, a cultivar Micro-Tom pode crescer em laboratório com a mesma estrutura mínima requerida para *Arabidopsis* (PINO-NUNES, 2005; CARVALHO et al., 2011).

Estresse por metal

O Cd é um dos principais contaminantes ambientais e um dos mais tóxicos dentre os metais pesados (GALLEGO et al., 2012; MAZZEI et al., 2014). O acúmulo de Cd em determinados tecidos da planta pode levar à rejeição comercial de certas cultivares, diminuição da produtividade, além de se tornar perigoso à saúde humana (DI BACCIO et al.,

2014). Assim, o estudo do impacto do Cd sobre as culturas agrícolas tem elevada importância nas mais diversas áreas de estudo que compreendem a Agronomia, Medicina e Biologia. Apesar de todos os efeitos danosos causados, os mecanismos de toxicidade e de resistência ao Cd não estão totalmente elucidados, e tentamos buscar através da enxertia desenvolver algum grau de tolerância ao Cd, bem como tentar compreender a sinalização entre o enxerto (copa) e o porta-enxerto (cavalo), e caracterizar o transporte de Cd entre as diferentes partes das plantas.

Muitos autores afirmam que a assimilação e distribuição de metais pesados se dá de forma espécie- e variedade-específica. Por exemplo, o aumento do teor de Cd no solo pode levar tanto à movimentação intensa do Cd da raiz às partes aéreas da planta, como à retenção do Cd nos vacúolos das células das raízes. Um fato muito interessante é que estas diferenças espécie-específica são observadas somente para o Cd (ANGELOVA et al., 2009). Alguns estudos mostram que certos tomateiros são sensíveis ao Cd e ao cobre (Cu), acumulando quantidades significativas dos metais dependendo da concentração fornecida (MEDIOUNI et al., 2006). Plantas frutíferas tais como o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pimenta (*Capsicum annuum* L.) e berinjela (*S. melongena* L.), caracterizam-se por menor transporte de metais pesados ao fruto (ANGELOVA et al., 2009). Portanto, o impacto da enxertia na absorção de metais pesados por estas plantas até o momento tem sido pouco estudado (GRATÃO, 2008; SAVVAS et al., 2010). A presença dos metais também afeta o crescimento das plantas e ocasiona a peroxidação lipídica, influenciando também o ciclo do nitrogênio e, com isso, todas as biomoléculas dele dependentes (MEDIOUNI et al., 2006).

Enxertia

O cultivo de vegetais enxertados teve início em 1920, principalmente para evitar ou diminuir ataques de patógenos do solo como o *Fusarium oxysporum* (LEE, 1994), mas os motivos para se realizar enxertias, bem como a diversidade de vegetais enxertados, tem aumentado drasticamente ao longo dos anos (COLLA et al., 2010). Essa técnica permitiu o desenvolvimento de combinações de características desejáveis de raízes e de partes aéreas. Existem relatos de enxertia utilizada para induzir resistência contra baixas e altas temperaturas (VENEMA et al. 2008), aumentar a absorção de nutrientes (XIA et al., 2013), aumentar a síntese de hormônios endógenos (COOKSON et al., 2013), melhorar a eficiência do uso da água (ROUPHAEL et al., 2008a), reduzir a absorção de poluentes orgânicos de

solos agrícolas (OTANI; SEIKE, 2007), aumentar tolerância a salinidade (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2006) e alcalinidade (COLLA et al., 2010), e limitar o efeito negativo de metais como boro, cobre e cádmio (EDELSTEIN et al., 2005; ARAO et al., 2008; ROUPHAEL et al., 2008b;).

A enxertia é um processo estrutural e bioquímico complexo, que se inicia com a adesão das duas partes colocadas em contato seguido da formação de calo e do estabelecimento de um sistema vascular funcional (COOKSON et al., 2013). Os plasmodesmos são estruturas muito dinâmicas que oferecem uma via única para a comunicação simplástica entre células, e há muito tempo este assunto é objeto de estudo em conexões de enxertias (PINA; ERREA, 2005). Quando células calosas entram em contato, as paredes celulares se dissolvem e são criados buracos, ocorre o contato entre os plasmolemas e os plasmodesmos se formam. Eles conectam simplasticamente as partes enxertadas permitindo uma interação metabólica mútua entre as células da interface e uma firme coesão entre o enxerto e porta enxerto (JEFREE; YEOMAN, 1983).

Eletroforese bidimensional (2D-PAGE)

A proteômica nos últimos anos vem se tornando uma ferramenta poderosa para análise de vias bioquímicas e as complexas respostas das plantas a estímulos ambientais, tornando possível a análise de grandes porções do proteoma em resposta a tratamentos específicos, através de técnicas como a eletroforese bidimensional (2DE) acoplada à espectrometria de massas (ARRUDA et al., 2011; 2013). Estas ferramentas podem fornecer uma avaliação mais direta de processos bioquímicos fornecendo informação sobre as proteínas envolvidas em funções enzimáticas, regulatórias e estruturais codificadas por genes e reguladas por fatores de transcrição (RENAUT et al., 2006). Esta técnica vem sendo usada há mais de 30 anos (O'FARREL, 1975), e ao longo dos anos melhorias substanciais foram realizadas.

A amplificação da ação do gene em células eucariotas é principalmente devida à variedade existente em processos pós- e traducionais, que podem gerar um grande número de proteínas (isoformas) a partir de um único gene (WOUTERS et al., 2013). O resultado final é um pool de proteínas altamente específico diferindo entre tipos celulares e condições às quais estão expostas. O proteoma pode ser definido como o conjunto total de proteínas expressas pelo genoma da célula, do tecido ou do organismo em um momento específico (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001). As técnicas proteômicas estão sendo amplamente

utilizadas para se estudar os resultados tradicionais de inúmeras condições (ARRUDA et al., 2013). No entanto, a eletroforese bidimensional não é uma técnica simples, e se faz necessário a padronização dos procedimentos de acordo com a espécie e os tecidos para uma boa repetibilidade (BARBOSA et al., 2013).

2.2 Material vegetal, Modelo experimental e Resultados preliminares

2.2.1 Primeiro teste (cultivo em areia)

No primeiro experimento foi utilizado o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Micro-Tom (MT). As plantas foram obtidas via sementes, cultivadas em bandejas contendo 72 células com vermiculita expandida como substrato, que permite boa aeração e retenção de umidade, além de ser facilmente removida das raízes, permitindo a lavagem sem causar danos significativos. Todo o experimento foi realizado em casa de vegetação com temperaturas médias entre 18 e 24 °C aproximadamente (noite e dia, respectivamente). Na fase inicial de crescimento a nutrição foi fornecida através de irrigação com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada a 10% da concentração adotada para plantas adultas. Após um mês da semeadura foi realizado o transplantio das mudas para vasos Leonard com areia de rio autoclavada de textura média com flocos de isopor, na proporção de 4:3. O isopor foi utilizado para promover aeração no substrato. Posterior ao transplantio, solução nutritiva padrão de Hoagland e Arnon (1950) modificada, como descrito por Pino-Nunes (2005) a 25% foi aplicada nos dois primeiros dias, sendo substituída por solução 100% após esse período de aclimação, e depois constantemente trocada.

Os tratamentos consistiram em concentração de Cd e tempos de exposições previamente definidos por experimentos pilotos anteriores. A exposição das plantas aos diferentes tratamentos foi (Tabela 1): (a) porta enxerto foi exposto ao Cd antes da enxertia e enxerto não; (b) porta enxerto não exposto ao Cd antes da enxertia e enxerto sim; (c) porta enxerto exposto continuamente ao Cd (antes e após enxertia) e enxerto não exposto ao Cd antes da enxertia (exposição após enxertia de ambos); (d) porta enxerto não exposto ao Cd antes da enxertia e enxerto exposto ao Cd antes da enxertia (exposição após enxertia de ambos).

Tabela 1 - Tratamentos utilizados para enxertia das plantas de tomateiro cv MT expostas ao Cd

Tratamentos		Porta Enxerto (PE)	Enxerto (E)
Controles	C sem Cd	SN sem Cd	SN sem Cd
	C com Cd	SN com Cd	SN com Cd
Exposição contínua mesmo	PE com Cd e E sem Cd	SN com Cd	SN sem Cd
após a enxertia*	PE sem Cd e E com Cd	SN sem Cd	SN com Cd

C: controle; SN: solução nutritiva

* Exposição contínua mesmo após a enxertia: as plantas continuaram a receber a SN suplementada por 1 mM de Cd após a enxertia. Enquanto os controles foram transferidos para SN sem Cd após a enxertia independentemente da combinação.

Porém, encontramos inúmeras dificuldades na reprodução deste modelo experimental, desde baixíssimas taxas de pegamento da enxertia até deficiências nutricionais, supostamente devido ao sistema de areia, que inviabilizaram a própria aplicação de Cd. Após muita análise, chegamos à conclusão que cultivar as plantas no sistema de hidroponia seria mais adequado para garantir a disponibilidade do Cd e analisar seus efeitos na planta sem possíveis interferências.

2.2.2 Segundo teste (cultivo em hidroponia)

No ano seguinte (2012), um novo experimento foi realizado com sementes de MT germinadas em bandejas plásticas de mudas com vermiculita a temperatura média de 18-24 °C. A irrigação foi feita diariamente utilizando água encanada até a germinação (15 dias aproximadamente). Em seguida as plantas foram transferidas para o sistema de hidroponia com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 10%, que foi aumentada diariamente até 50% para a adaptação das plantas. Foram coletadas 5 plantas (aproximadamente 30 dias de idade), as quais foram utilizadas para os testes de extração de proteínas. Esta parte do projeto foi realizada em colaboração com outra doutoranda do grupo, Mônica Franco, e os resultados apresentados na dissertação da mesma (FRANCO 2013). No presente momento, um artigo sobre a padronização da metodologia utilizada encontra-se aceito para publicação (em Anais da Academia Brasileira de Ciências) com ambas como autoras.

Foi testada a enxertia em MT novamente, porém sem muito sucesso. Até o momento estávamos utilizando garrafas PET para manter a umidade das plantas após a enxertia, e depois de várias buscas na literatura e conversas com produtores decidimos por construir uma câmara úmida para otimizar o sistema.

Após 2 anos de testes insatisfatórios com o MT, surgiu a oportunidade de trabalhar com acessos de tomateiro com diferentes graus de tolerância ao Cd pré-selecionadas pelo nosso grupo de estudo em outro trabalho paralelo (PIOTTO, 2012), e concluímos que este material poderia nos dar respostas mais interessantes quanto aos mecanismos de tolerância, transporte e sinalização entre porta-enxerto e enxerto submetidos ao Cd, considerando as dificuldades encontradas com MT e o maior vigor destes outros materiais de tomateiros.

2.2.3 Terceiro teste (cultivo em hidroponia)

Nesta etapa optamos por alterar um dos objetivos do trabalho. Anteriormente estávamos tentando estudar a sinalização gerada pelo Cd entre as partes que foram colocadas em contato pela enxertia. E, a partir daqui o objetivo principal passou a ser o entendimento da tolerância ao Cd e seus mecanismos.

Para os novos experimentos foram utilizados os acessos Calabash Rouge (CR), que apresenta alta sensibilidade ao Cd, Pusa Ruby (PR) e High Country (HC), que apresentam diferentes graus de tolerância ao Cd (PIOTTO et al., 2014; NOGUEIROL et al., 2015). Foi definido que a variedade sensível (CR) seria o Enxerto (E) e as demais (PR e HC) seriam os Porta-enxertos (PE), pois na literatura há relatos de que a tolerância esteja mais relacionada à parte radicular. Os controles seriam estas mesmas combinações sem Cd, ou seja, somente em solução nutritiva e, além destes seriam enxertadas plantas de determinada variedade sobre outra de mesma variedade, a fim de descartar os resultados referentes ao estresse da própria enxertia (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos utilizados para a enxertia das plantas de tomateiros expostas ao Cd

Combinações de enxertia: Enxerto / Porta Enxerto			
Controle interno	CR / CR	PR / PR	HC / HC
Tratamento		CR / PR	CR / HC

CR: Calabash Rouge (muito sensível); PR: Pusa Ruby (tolerante); HC: High Country (tolerante).

Uma das modificações experimentais foi a aplicação do Cd somente após o pegamento da enxertia ter sido concluído, para garantir que o metal não fosse interferir neste processo. De acordo com experimentos anteriores do laboratório foi eleita a dose de 35 μM de CdCl_2 para estes experimentos. Também foram testadas diferentes formas de enxertia – fenda cheia, fenda simples ou inglês simples e corte reto para ambas as partes. As plantas submetidas à fenda cheia foram as que apresentaram melhores taxas de pegamento. Após todos os testes de padronização, finalmente conseguimos montar um experimento com as novas variedades no sistema hidropônico utilizando a câmara úmida (Figura 1). Para este experimento as plantas foram germinadas em bandejas de vermiculita (conforme relatado acima), e a enxertia realizada aos 30 dias após a germinação (DAG), utilizando grampos de enxertia para manter as partes conectadas durante a fase de pegamento. Logo após a enxertia as bandejas com as plantas enxertadas foram alocadas na câmara úmida, mantendo sempre a irrigação diária com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 10%. No 10º dia após a enxertia (40 DAG), o pegamento já tinha sido finalizado de modo que foi possível retirar as plantas da câmara úmida (Figura 2). Nestas condições, o pegamento subiu de aproximadamente 10% com o MT para 80% com os novos acessos. No 13º dia após enxertia (43 DAG) as plantas foram transferidas para hidroponia, passando pelo período de adaptação no qual a solução nutritiva inicial de 10% foi aumentada diariamente até 50%. No 5º dia em hidroponia (48 DAG), metade das bandejas recebeu a dose de 35 μM de CdCl_2 e a outra metade permaneceu em solução nutritiva somente.

Figura 1 - Câmara úmida utilizada para manter a umidade do material enxertado durante a fase de pegamento

Figura 2 - Plantas de tomateiro após fase de pegamento da enxertia

A coleta do material (55 DAG) foi realizada no 7º dia de exposição ao Cd em 3 repetições de pools de 3 plantas (Figura 3). Algumas plantas foram armazenadas em sacos de papel para posterior análise de massa seca e quantificação de Cd, e outras foram congeladas em nitrogênio a -80 °C para posterior análise proteômica.

Figura 3 - Plantas de tomateiro enxertadas no cultivo hidropônico no dia da coleta

2.3 Resultados e Discussão

Todas as plantas, independente da combinação de enxertia, apresentaram sintomas de clorose quando expostas ao Cd (Figura 4), porém só algumas apresentaram diminuição no acúmulo de biomassa (Figura 5).

Figura 4 - Fotos ilustrando as diferenças entre os tratamentos das plantas enxertadas, plantas controle (sem Cd) e plantas submetidas a $35 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (com Cd) no dia da coleta (55 dias após germinação). A) combinação CR / CR; B) combinação PR / PR; C) combinação CR / PR; D) combinação HC / HC; E) combinação CR / HC

Os resultados de massa seca total, bem como da parte aérea, indicam que na presença de Cd a combinação que resistiu melhor foi a HC / HC, enquanto a PR / PR apresentou um crescimento intermediário em relação às outras duas combinações, e a CR / CR foi a que teve seu crescimento mais comprometido. Porém, entre as combinações CR e PR ocorre algum

tipo de interação que as beneficia, pois passam a ter um crescimento maior quando enxertadas (CR / PR) com relação à combinação delas mesmas (CR / CR e PR / PR), inclusive na presença do Cd, ou seja, com relação a todas as outras combinações e controles. Para esta combinação também foi observado acúmulo de massa seca de raiz maior em relação aos outros tratamentos, mas possivelmente deve-se a características genéticas da própria planta, pois não diferiu entre controle e presença de Cd. A enxertia de CR / HC também apresentou resultados satisfatórios, pois acumulou mais biomassa que a enxertia de CR / CR, embora tenha acumulado ligeiramente menos biomassa que o controle HC / HC. Em raízes somente houve diferença no crescimento de CR / CR exposto ao Cd, sendo este menor que a mesma combinação em solução nutritiva (Figura 5).

Figura 5 - Acúmulo de Massa Seca Total nas variedades de tomateiro CR, PR e HC enxertadas na ausência e presença de Cd (35 $\mu\text{M CdCl}_2$) 55 dias após germinação. Sigla à esquerda indica enxerto e sigla à direita indica porta-enxerto. A) massa seca da parte aérea; B) massa seca do sistema radicular; C) massa seca total. Letras maiúsculas diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo genótipo 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 de um mesmo tratamento diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro

As plantas utilizadas para avaliação do acúmulo de massa seca foram separadas em parte aérea e raiz para quantificação de Cd. A quantificação de Cd para o controle (0 μM de CdCl_2) não foi apresentada no gráfico, pois não foram encontrados valores significativos deste metal. Entretanto, para o tratamento com 35 μM de CdCl_2 , foram encontradas diferenças significativas no acúmulo de Cd entre as combinações de enxertias avaliadas, na parte aérea e radicular (Figura 6A e B, respectivamente), sendo que os maiores valores foram encontrados nas raízes. As raízes acumularam entre 67 e 74% do Cd encontrado na planta, o que de acordo com Chiraz et al. (2006) é o caso de muitas plantas anuais que acumulam até 80% no sistema radicular. Essa capacidade já é conhecida em tomateiro (GRATÃO et al., 2012) e outras culturas como a berinjela (ANGELOVA et al., 2009), que retém o Cd nas raízes por complexação com fitoquelatinas e limitam o seu transporte para a parte aérea, o que é considerado um mecanismo de proteção das plantas aos efeitos danosos que os metais podem causar uma vez dentro do sistema celular (JOZEFCZAK et al., 2014).

Foi observado que o acúmulo de Cd para a combinação de enxertia CR / CR (a mais sensível ao Cd) foi o de menor valor na parte aérea e radicular. A combinação CR / PR foi a que mais acumulou Cd na raiz, porém acumulou menos que CR / HC na parte aérea.

O somatório das quantidades de Cd nos tecidos apresenta a quantidade total de Cd acumulado, considerando uma amostra de planta inteira, a partir da qual podemos verificar com mais clareza as diferenças entre as combinações de enxertia (Figura 6C). Foi observado que o acúmulo de Cd para a combinação de enxertia CR / CR (a mais sensível ao Cd) foi o de menor valor na planta como um todo. A combinação CR / PR foi a que mais acumulou Cd na planta inteira, porém não diferiu da combinação CR / HC. Com relação aos controles, a enxertia CR / HC acumulou mais Cd na planta inteira que o controle HC / HC, assim como CR / PR acumulou mais Cd na planta inteira que o controle PR / PR, sugerindo que neste caso o enxerto esteja interferindo negativamente na tolerância ao Cd.

Na combinação CR / PR, embora o acúmulo de Cd total não tenha diferido de CR / HC, a interferência do enxerto foi positiva, no sentido que diminui o transporte de Cd à parte aérea, além de ter acumulado mais biomassa que todas as outras, inclusive que o controle PR / PR, quando expostas ao Cd. Ambas as combinações acumularam mais Cd que o controle CR / CR (sensível), indicando que na verdade a tolerância deve-se à interação do enxerto com o porta-enxerto, e não somente à raiz como se pensava.

A maior concentração de Cd ocorreu nas raízes das plantas, conforme esperado, uma vez que esse órgão é o responsável pela absorção do metal, ficando em contato com este. É necessário avaliar qual a fração do total de Cd absorvido pelas raízes foi transportado para a parte aérea das plantas. Portanto, foi calculado o Índice de Transporte (IT) ($\text{Acúmulo de Cd na Parte Aérea} / \text{Acúmulo de Cd Total} * 100$) (Tabela 3), que representa uma medida relativa da distribuição do metal entre sistema radicular e parte aérea. Embora tenham sido identificadas diferenças no IT entre as combinações de enxertia, a magnitude de tais diferenças é relativamente baixa. Tanto CR / PR como CR / HC diminuíram o IT com relação aos controles PR / PR e HC / HC, respectivamente. Com relação ao IT de CR / CR, a CR / PR diminui seu IT e a CR / HC aumentou seu IT.

Considerando-se que a parte comestível do tomateiro é o fruto, a combinação CR / PR é mais interessante que a CR / HC, pois além de todas as vantagens discutidas acima, apresenta menor chance de permitir o transporte do metal ao fruto visto o menor transporte de Cd da raiz para a parte aérea. Além disso, CR / PR apresentou acúmulo de biomassa bastante superior às demais na ausência de Cd principalmente, mas também na presença deste.

Figura 6 - Acúmulo total de Cd nas plantas de tomateiro CR, PR e HC enxertadas e expostas a 35 μM CdCl_2 . Sigla à esquerda indica enxerto e sigla à direita indica porta-enxerto. A) acúmulo de Cd na parte aérea; B) acúmulo de Cd no sistema radicular; C) acúmulo de Cd na planta. Letras diferentes no topo das colunas indicam que as médias de um mesmo tratamento diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade de erro

Tabela 3 – Índice de Transporte de Cd para a parte aérea nas combinações de enxertia das plantas de tomateiro

E / PE	Índice de Transporte (%)
CR / CR	26,6
PR / PR	25,9
HC / HC	32,2
CR / PR	22,9
CR / HC	27,1

Ainda não foi realizada análise do perfil proteico desse material devido à falta de tempo hábil durante o período do doutorado. Este material deverá ser analisado futuramente na continuidade das atividades do laboratório. Esperamos com a análise de proteínas diferencialmente expressas propor um mecanismo que explique os resultados aqui apresentados, elucidando melhor a interação do enxerto com o porta-enxerto com relação à tolerância ao Cd.

2.4 Considerações Finais

As cultivares de tomateiro avaliadas através de enxertias mostraram que existem mecanismos de interação entre enxerto e porta-enxerto que precisam ser melhor explorados. A combinação que apresentou melhor desempenho foi a CR / PR, cujo enxerto é sensível ao Cd e porta-enxerto apresenta certo grau de tolerância. Tal constatação rompe com a ideia que a tolerância está estritamente relacionada ao sistema radicular. Acreditamos que a análise proteômica deste material irá possibilitar um melhor entendimento dessa dinâmica.

Referências

- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, Washington, v. 101, p. 269–295, 2001.
- ANGELOVA, V.R.; BABRIKOV, T.D.; IVANOV, K.I. Bioaccumulation and distribution of lead, zinc, and cadmium in crops of *Solanaceae* family. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 40, n. 13, p. 2248-2263, 2009.

ARAO, T.; TAKEDA, H.; NISHIHARA, E. Reduction of cadmium translocation from roots to shoots in eggplant (*Solanum melongena*) by grafting onto *Solanum torvum* rootstock. **Soil Science and Plant Nutrition**, Abingdon, v. 54, p. 555–559, 2008.

ARRUDA, S.C.C.; BARBOSA, H.S.; AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, M.A.Z. Two-dimensional difference gel electrophoresis applied for analytical proteomics: fundamentals and applications to the study of plant proteomics. **Analyst**, Cambridge, v. 136, p. 4119–4126, 2011.

_____. Comparative studies focusing on transgenic through cp4EPSPS gene and non-transgenic soybean plants: An analysis of protein species and enzymes. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 93, p. 107–116, 2013.

BARBOSA, H.S.; DE SOUZA, D.L.Q.; KOOLEN, H.H.F.; GOZZO, F.C.; ARRUDA, M.A.Z. Sample preparation focusing on plant proteomics: extraction, evaluation and identification of proteins from sunflower seeds. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 116–123, 2013.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; CRESTANA, S.L.; PINO-NUNES, L.E.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, L.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, p. 1–14, 2011.

CHIRAZ, C.; HOUDA, G.; HABIB, G.M. Nitrogen metabolism in tomato plants under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, n. 8, p. 1617–1634, 2006.

COLLA, G.; ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; SALERNO, A.; REA, E. The effectiveness of grafting to improve alkalinity tolerance in watermelon. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 68, p. 283–291, 2010.

COOKSON, S.J.; MORENO, M.J.C.; HEVIN, C.; MENDOME, L.Z.N.; DELROT, S.; TROSSAT-MAGNIN, C.; OLLAT, N. Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signaling, and secondary metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 2997–3008., 2013.

DI BACCIO, D.; CASTAGNA, A.; TOGNETTI, R.; RANIERI, A.; SEBASTIANI, L. Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 171, n. 18, p. 1693–1705, 2014.

EDELSTEIN, M.; BEN-HUR, M.; COHEN, R.; BURGER, Y.; RAVINA, I. Boron and salinity effects on grafted and non-grafted melon plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 269, p. 273–284, 2005.

ESTEVEZ-CAPARROS, J.M.; DIAZ-PEREZ, M.; CAMACHO-FERRE, F. Influence of several rootstocks on yield of cultivars of pear cherry tomato cultivated under mesh greenhouse. **Journal of Food Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 9, n. 1, p. 364–368, 2011.

EZURA, H. Tomato is a next-generation model plant for research and development. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 78, n. 1, p. 3-5, 2009.

FRANCO, M.R. **Análise proteômica de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) em resposta ao cádmio** 2013. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, M.F.; ROSALES, E.P.; ZAWOZNIK, M.S.; GROPPA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 83, p. 33–46, 2012.

GRATÃO, P.L. Resposta de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) ao cádmio. 2008. 116p. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

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, p. 79–96, 2012.

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

JEFREE, C.E.; YEOMAN, M.M. Development of intercellular connections between opposing cells in a graft union. **New Phytologist**, Hoboken, v. 93, p. 491–509, 1983.

JOZEFCAZAK, M.; KEUNEN, E.; SCHAT, H.; BLIEK, M.; HERNANDEZ, L.E.; CARLEER, R.; REMANS, T.; BOHLER, S.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 83, p. 1-9, 2014.

LEE, J.M. Cultivation of grafted vegetables I: current status, grafting methods and benefits. **HortScience**, Alexandria, v. 29, p. 235–239, 1994.

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

LING, H.Q.; BAUER, P.; BERECZKY, B.; GANAL, M. The tomato FER gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, p. 13938-13943, 2002.

MARTINEZ-RODRIGUEZ, M.M.; ESTAN, M.T.; MOYANO, E.; ABELLAN-GARCIA, J.O.; FLORES, F.B.; CAMPOS, J.F.; AL-AZZAWI, M.J.; FLOWERS, T.J.; BOLARÍN, M.C. The effectiveness of grafting to improve salt tolerance in tomato when an ‘excluder’

genotype is used as scion. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 392–401, 2008.

MAZZEI, V.; LONGO, G.; BRUNDO, M.V.; SINATRA, F.; COPAT, C.; CONTI, G.O.; FERRANTE, M. Bioaccumulation of cadmium and lead and its effects on hepatopancreas morphology in three terrestrial isopod crustacean species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 110, p. 269–279, 2014.

MEDIOUNI, C.; BENZARTI, O.; TRAY, B.; GHORBEL, M.H.; JEMAL, F. Cadmium and copper toxicity for tomato seedlings. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 26, p. 1-6, 2006.

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

NOGUEIROL, R.C.; MONTEIRO, F.A.; GRATÃO, P.L.; BORGIO, L.; AZEVEDO, R.A. Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 3, p. 1-16, 2015.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 250, p. 4007–4021, 1975.

OKABE, Y.; ARIIZUMI, T.; EZURA, H. Updating the Micro-Tom TILLING platform. **Breeding Science**, Tokyo, v. 63, p. 42–48, 2013.

OTANI, T.; SEIKE, N. Rootstock control of fruit dieldrin concentration in grafted cucumber (*Cucumis sativus*). **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 32, p. 235–242, 2007.

PINA, A.; ERREA, P. A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 106, p. 1–11, 2005.

PINO, L.E.; LOMBARDI-CRESTANA, S.; AZEVEDO, M.S.; SCOTTON, D.C.; BORGIO, 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**, London, v. 6, n. 23, p. 1-11, 2010.

PINO-NUNES, L.E. **Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicum esculentum* cv. Micro-Tom)** 2005. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PIOTTO, F.A. **Avaliação de tolerância ao cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)** 2012. 147p. Tese (Doutorado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

PIOTTO, F.A.; TULMANN-NETO, A.; FRANCO, M.R.; BOARETTO, L.F.; AZEVEDO, R.A. Rapid screening for selection of heavy metal-tolerant plants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 14, p. 1-7, 2014.

RENAUT, J.; HAUSMAN, J.F.; WISNIEWSKI, M.E. Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 126, n. 1, p. 97-109, 2006.

ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; COLLA, G.; REA, E. Yield, mineral composition, water relations, and water use efficiency of grafted mini-watermelon plants under deficit irrigation. **HortScience**, Alexandria, v. 43, n. 3, p. 730–737, 2008a.

ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; REA, E.; COLLA, G. Grafting of cucumber as a means to minimize copper toxicity. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 49–58, 2008b.

SAITO, T.; ARIIZUMI, T.; OKABE, Y.; ASAMIZU, E.; HIWASA-TANASE, K.; FUKUDA, N.; MIZOGUCHI, T.; YAMAZAKI, Y.; AOKI, K.; EZURA, H. TOMATOMA: A novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 283-296, 2011.

SAVVAS, D.; COLLA, G.; ROUPHAEL, Y.; SCHWARZ, D. Amelioration of heavy metal and nutrient stress in fruit vegetables by grafting. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 156-161, 2010.

SZINAY, D.; BAI, Y.; VISSER, R.; DE JONG, H. FISH Applications for genomics and plant breeding strategies in tomato and other Solanaceous crops. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 129, n. 1, p. 199-210, 2010.

VENEMA, J.H.; DIJK, B.E.; BAX, J.M.; VAN HASSELT, P.R.; ELZENGA, J.T.M. Grafting tomato (*Solanum lycopersicum*) onto the rootstock of a high-altitude accession of *Solanum habrochaites* improves suboptimal-temperature tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 63, p. 359–367, 2008.

WOUTERS, B.; VANHOUTTE, D.J.D.; AARNOUTSE, P.; VISSER, A.; STASSEN, C.; DEVREESE, B.; KOK, W.T.H.; SCHOENMAKERS, P.J.; EELTINKA, S. Visualization procedures for proteins and peptides on flat-bed monoliths and their effects on matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterda, v. 1286, p. 222– 228, 2013.

XIA, Y.; JIANG, C.; WANG, X.; CHEN, F. Studies on potassium uptake and use efficiency of different cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genotypes by grafting. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 11, n. 1, p. 472-476, 2013.

3 EFEITO DO CÁDMIO SOBRE O SISTEMA ANTIOXIDANTE DE PIMENTA DOCE COMPRIDA (*Capsicum annuum* L.)

Resumo

As pimentas e pimentões do gênero *Capsicum* são há muito tempo conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, por isso tivemos a ideia de estudar como o sistema antioxidante responde ao estresse oxidativo gerado pelo metal pesado cádmio (Cd). Foi investigado o efeito de 25 μ M de Cd sobre o crescimento, enzimas e compostos antioxidantes de Pimenta Doce Comprida (PDC) cultivada em sistema hidropônico. Foi observado diminuição de crescimento na parte foliar (50%) e radicular (35%) associada ao acúmulo de Cd na planta em relação ao controle. Apesar das atividades diminuídas de ascorbato peroxidase (APX), não responsividade de catalase (CAT), e a superóxido dismutase (SOD) só ter respondido à presença de Cd em folhas com 10 dias de exposição (T2), outras enzimas como glutatona redutase (GR) e glutatona S-transferase (GST) exibiram indução expressiva em resposta ao tratamento com Cd nos dois tempos de estudo. Além disso, os compostos antioxidantes ascorbato e glutatona apresentaram alteração no balanço redox na presença do metal pesado em folhas e raízes. Os resultados aqui apresentados sugerem que o Cd reduz o crescimento de plântulas de PDC devido à indução de estresse oxidativo que gerou um aumento da peroxidação lipídica nas folhas com 3 dias de exposição ao Cd (T1), e superprodução de H_2O_2 em todos os tratamentos exceto em raiz no T1. Porém, o quadro de estresse é revertido com um maior tempo de exposição ao Cd no T2. As atividades antioxidantes estimuladas suportaram o estresse oxidativo gerado pelo Cd e consequentemente pelas espécies reativas de oxigênio em PDC, atuando especialmente nesse sistema as enzimas GR e GST e os compostos glutatona e ascorbato.

Palavras chave: Estresse oxidativo, Metal pesado, Cádmio, Pimenta

Abstract

Peppers and chillies of the genus *Capsicum* have long been known for their antioxidant properties, hence the idea of studying how the antioxidant system responds to oxidative stress caused by the heavy metal cadmium (Cd). The effect of 25 μ M Cd on plant growth, antioxidant enzymes and compounds of Sweet Pepper Banana cultivated in hydroponics was investigated. Decrease in aerial parts (50%) and roots (35%) growth was observed associated with Cd accumulation in relation to the controls. Despite decreased ascorbate peroxidase (APX), non-responsiveness of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) response only in foliar parts with 10 days of Cd exposure (T2), other enzymes such as glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) exhibited remarkable induction under Cd stress in the two periods studied. Furthermore, antioxidant compounds such as ascorbate and glutathione presented a shift in redox balance in the presence of this heavy metal in foliar and root parts in T2. The present results suggest that Cd reduces seedling growth by inducing oxidative stress related to lipid peroxidation in leaves with 3 days of Cd exposure (T1), and overproduction of H_2O_2 in all treatments except for roots in T1. The stimulated antioxidant activities supported the oxidative stress caused by Cd-induced reactive oxygen species generation in Sweet Pepper Banana, with special attention to the enzymes GR and GST and the compounds glutathione and ascorbate.

Keywords: Oxidative stress; Heavy metal; Cadmium; Pepper

3.1 Introdução

Pimenta Doce Comprida (“Sweet Pepper Banana” – *Capsicum annuum* L.)

A pimenta pertence à família *Solanaceae* ($2n=24$) e é uma das culturas de frutos mais importante no mundo em regiões tropicais e subtropicais (ANTONIOUS, 2014). É amplamente utilizada na nutrição humana e é conhecida por apresentar compostos biologicamente ativos como antioxidantes, vitaminas e outros fitoquímicos (RAO et al., 2011). Esses frutos são de grande importância na alimentação humana devido a sua versatilidade, podendo ser consumidos in natura, cozidos ou desidratados como especiarias (SERRANO et al., 2010). Seu sabor pungente deve-se à presença de alcaloides chamados capsaicinoides, encontrados somente no gênero *Capsicum* (HOFFMAN et al., 1983). Atualmente as pimentas são objeto de muito interesse, pois suas propriedades antioxidantes, e compostos como ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides e vitamina E, estão potencialmente relacionados à prevenção de certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, retardo do processo de envelhecimento, entre outros processos de interesse (RAO et al., 2011).

Apesar de ainda não estar disponível toda a sequência genômica de pimentas, já se conhece inúmeras *expressed sequence tags* (ESTs), mapas de ligação e mapas genéticos, disponíveis em *Solanaceae Genomics Network* (<http://solgenomics.net/>) (LU et al., 2012).

Sendo a pimenta doce comprida uma planta comercial, de porte pequeno e apresentar ciclo de desenvolvimento curto, assim como MT, também é considerada uma boa alternativa ao modelo *Arabidopsis* (CARVALHO et al., 2011). Além de ser um modelo adicional de estudos, diversificando linhas de pesquisa, suas características químicas descritas acima sugerem que esta espécie possa ter padrões de resposta diferentes a situações de estresse oxidativo, sendo, portanto, um modelo interessante de estudo para comparação com outras espécies cultivadas de valor econômico e amplo uso por seres humanos.

Metal pesado cádmio e sua toxicidade em plantas

O cádmio (Cd) é um metal pesado amplamente distribuído, liberado no meio ambiente como consequência de atividades industriais e agrícolas. É de difícil remoção do ambiente e pode se acumular em organismos, e ampliar seu alcance através da cadeia alimentar (ZHAO

et al., 2015). Mesmo em baixas concentrações, o Cd pode causar danos irreparáveis. Em plantas, pode inibir o crescimento e a produção de sementes, interferindo em uma série de processos fisiológicos, como atividades enzimáticas, respiração, fotossíntese, assimilação de nutrientes, sendo por isso considerado um problema agrícola global, levando a consideráveis perdas de produtividade (GALLEGO et al., 2012; ARTIUSHENKO et al., 2014).

Diferentemente de alguns metais como o níquel (Ni) e zinco (Zn), que em baixas concentrações estimulam o crescimento da planta (BAZIHIZINA et al. 2015), o Cd não está envolvido com nenhuma função fisiológica conhecida e existem inúmeros estudos demonstrando seu efeito deletério nas plantas (CHEN et al., 2015). Em nível celular e molecular a toxicidade por Cd pode influenciar no ciclo do nitrogênio e suas moléculas dependentes, inativando ou denaturando proteínas, podendo ocasionar peroxidação lipídica, ou seja, danos a membranas celulares, resultando na indução de estresse oxidativo, aberrações cromossômicas, e alterações na divisão e ciclo celular (LIN; AARTS, 2012; PIZZAIA, 2013).

A presença de uma coloração marrom avermelhada nas margens das folhas e nervuras das plantas, juntamente com clorose, têm sido apontados como sintomas de toxicidade devido ao fato de que o Cd interage e compete com o ferro (Fe), níquel (Ni) e cobre (Cu), por sítios de absorção na membrana plasmática, suprimindo a absorção destes elementos, induzindo a deficiência (MONTEIRO et al., 2011).

A exposição ao Cd estimula a síntese de fitoquelatinas (polipeptídios), cujo precursor é a glutathione. Essas moléculas formam complexos com o Cd de forma a imobilizá-lo para diminuir os danos celulares (VITÓRIA et al., 2001). No vacúolo, esse complexo se dissocia e o Cd liberado pode ser complexado por ácidos orgânicos (YADAV et al., 2010). É sabido que o acúmulo de metais pesados varia de acordo com a espécie (ANTONIOUS; KOCHHAR, 2009), pois, cada planta apresenta um conjunto específico de material genético, o que permite que seus sistemas respondam das mais variadas formas. Este fato também é importante quando são consideradas alternativas para recuperação de áreas contaminadas e que envolvam o uso de técnicas como a fitorremediação (SOUZA et al., 2013).

Estresse oxidativo e sistema antioxidante de plantas

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desbalanço, quebra da homeostase, entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e as defesas antioxidantes, em qualquer

compartimento celular, levando a sérias mudanças fisiológicas (GRATÃO et al., 2005). As EROs – radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^\cdot$) e oxigênio singlet (1O_2) – são formas parcialmente reduzidas de oxigênio atmosférico geradas pelo metabolismo dos organismos aeróbios, e sob condições normais tem sua produção muito bem controlada nas células pelo sistema antioxidante. Dentre as EROs, H_2O_2 é a molécula mais estável, sendo formada a partir da reação do 1O_2 com O_2^- , e como produto da dismutação espontânea do O_2^- (FOYER; NOCTOR, 2009). Porém, quando suas concentrações aumentam acima de valores basais provocam estresse oxidativo, oxidando biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, resultando em redução de crescimento e desenvolvimento da planta (BHADURI; FULEKAR, 2012). Plantas expostas a estresses abióticos (elevados níveis de luminosidade, altas e baixas temperaturas, seca, metais pesados, salinidade, entre outros) e bióticos (patógenos) podem gerar um aumento na produção das EROs, resultando num desequilíbrio entre produção e a capacidade antioxidante celular, gerando o processo de estresse oxidativo.

A oxidação lipídica dá origem a um grande número de produtos secundários. Estes produtos são principalmente aldeídos, com a capacidade de exacerbar o dano oxidativo. A longevidade e alta reatividade permitem a estas moléculas agirem dentro e fora da célula, interagindo com biomoléculas como ácidos nucleicos e proteínas, geralmente de forma irreversível e danificando o delicado mecanismo envolvido na funcionalidade da célula. Assim, a peroxidação dos lipídios das biomembranas é um dos principais indicadores da ocorrência do processo de estresse oxidativo (DEMIDCHIK, 2015). O malondialdeído (MDA) é um dos vários produtos de baixo peso molecular formados pela peroxidação lipídica, sendo frequentemente utilizado como indicador de estresse oxidativo (DEWIR et al., 2006).

As plantas possuem diversas moléculas e enzimas antioxidantes quem atuam contra o dano oxidativo, controlando os níveis e efeitos das EROs. Algumas regeneram moléculas antioxidantes a sua forma ativa, eliminando ou reduzindo o dano causado pela EROs, enquanto outras atuam diretamente sob tais espécies. No sistema antioxidante encontram-se, entre outras, as enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) e glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18), além de compostos não enzimáticos como glutathione, ascorbato, tocoferol, cisteínas, alcaloides, ferredoxina, vitaminas, flavonoides e pigmentos carotenoides, os quais agem em conjunto com enzimas antioxidantes (GROß et al.,

2013). Essencialmente, a interação entre os diferentes mecanismos produtores e de controle de ROS pode se alterar drasticamente de acordo com a condição fisiológica da planta e a integração de diferentes estímulos ambientais, de desenvolvimento e bioquímicos (MITTLER, 2002).

A SOD constitui a primeira linha de defesa da célula contra EROs, e é responsável pela conversão do O_2^- em O_2 e H_2O_2 . Como a sua ação resulta na formação de H_2O_2 esta enzima está intimamente ligada ao ciclo ascorbato-glutationa, que atua na degradação desta molécula. Muitas plantas possuem várias isoformas de SOD, que estão localizadas em diferentes compartimentos celulares, e são classificadas de acordo com seu cofator metálico em 3 grupos: Fe-SOD (cloroplastos); Mn-SOD (mitocôndrias e peroxissomos); e Cu/Zn-SOD (cloroplastos e citosol) (ZHANG et al., 2014).

Em plantas a CAT é geralmente composta por famílias multigênicas, encontrada principalmente nos peroxissomos, onde atua na degradação do H_2O_2 em H_2O e O_2 . A principal função dos peroxissomos é a remoção de EROs originadas nos aparelhos fotossintéticos e mitocondriais (AFIYANTI; CHEN, 2014). Com esta finalidade, os peroxissomos contêm grandes quantidades de CAT e outras enzimas antioxidantes. A CAT pode ter função determinante contra o estresse oxidativo, removendo o H_2O_2 também de outros compartimentos subcelulares, dado que esta molécula facilmente se difunde pelas membranas (BHADURI; FULEKAR, 2012).

A APX catalisa a transferência de elétron do ascorbato (AA) ao H_2O_2 produzindo dehidroascorbato (DHA) e H_2O . Essa enzima foi identificada em diversas plantas superiores e compreende uma família de isoenzimas com características distintas e respostas que variam de acordo com sinais metabólicos e ambientais, sendo distribuídas nos diferentes compartimentos celulares, incluindo o citosol, cloroplastos, peroxissomos, mitocôndrias e apoplasto. Em plantas superiores, a APX é um elemento essencial no fino mecanismo de regulação de H_2O_2 durante o desenvolvimento da planta e sob diferentes estresses ambientais (GRATÃO et al., 2005; BEGARA-MORALES et al., 2013).

O ascorbato é um antioxidante não-enzimático essencial que reage com o radical $OH^\cdot$, O_2^- , e 1O_2 , e atua como tampão antioxidante também no apoplasto, estando envolvido com funções celulares vitais. Pode ser encontrado na forma reduzida (AA), semioxidada (MDHA – monodehidroascorbato), e oxidada (DHA – dehidroascorbato), embora o MDHA tenha vida bastante curta sendo convertido em DHA ou AA espontaneamente (ANJUM et al., 2014). A

ciclagem eficiente entre as formas oxidada e reduzida minimiza a degradação do DHA e diminui a necessidade por altas taxas de síntese *de novo* (WANG et al., 2013).

A glutathiona é um tripeptídeo de glutamato, cisteína e glicina. Ao mesmo tempo em que é um grande reservatório de enxofre reduzido não-proteico, é um dos principais tampões redox nas células aeróbicas, atuando na regulação redox, conjugação de metabólitos, detoxificação de xenobióticos e homeostase e sinalização celular (YADAV et al., 2010). A glutathiona reduzida (GSH) reage com EROs sendo oxidada (GSSG), porém a redução do H_2O_2 dependente de GSH não é a principal rota de degradação desta espécie, dado que a reação entre os dois compostos é lenta. A principal função da glutathiona na proteção contra o estresse oxidativo é a redução do DHA (ALAM et al., 2014). O AA e a GSH podem ser diretamente oxidados por EROs, embora em baixa taxa cinética. Na via de regeneração, MDHA redutase (MDHAR), DHA redutase (DHAR) e glutathiona redutase (GR) reciclam os antioxidantes da forma oxidada à forma reduzida. A MDHAR e a GR utilizam NADPH como equivalente redutor, enquanto DHAR utiliza a GSH (GROß et al., 2013). O ciclo ascorbato-glutathiona é uma via muito importante no controle do status redox celular, especialmente após aplicação de metais pesados como Cu, Zn e Cd. O ascorbato e a glutathiona nas suas formas reduzidas e oxidadas estão entre os compostos de defesa antioxidante não-enzimáticos mais importantes para a extinção de EROs e também são importantes no controle de metais (ARAVIND et al., 2005).

A GR é uma oxidoreductase flavoproteína NADPH-dependente e uma importante componente da via ascorbato-glutathiona. Esta enzima converte GSSG em GSH ajudando a manter uma razão GSH/GSSG alta sob diversos estresses abióticos. A literatura evidencia que a atividade da GR e o conteúdo de GSH estão intimamente relacionados e são modulados diferencialmente por vários agentes estressores. Embora sintetizada no citoplasma, é encontrada principalmente em cloroplastos (70-80%) e também mitocôndrias (GILL et al., 2013).

Glutathiona S-transferase (GST) é uma enzima que pode utilizar a GSH para reduzir peróxidos e catalisa a conjugação da GSH a substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e citotóxicos (GHELFI et al., 2011). A GST também tem uma importante função na detoxificação de EROs, e já foi relatada com tendo sua atividade aumentada na presença de Cd (GRATÃO et al., 2005). Além disso, essa enzima tem papel bastante importante na biodegradação de herbicidas, sendo capaz de degradar inúmeras classes de pesticidas em células bacterianas como já relatado por Peters et al. (2014).

Para entender como todas essas moléculas atuam em conjunto e aumentar o conhecimento sobre a real significância que apresentam na tolerância e adaptação da planta ao estresse por metais é preciso que cada vez mais sejam aprofundados estudos e discussões na área. Neste sentido, buscamos analisar diversos compostos enzimáticos e não-enzimáticos como resposta da PDC ao estresse por Cd em dois tempos de estudo (um precoce e um tardio).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal e Cultivo

As sementes de pimenta doce comprida (PDC) – Marca Feltrin, ref 0098 – foram germinadas em casa de vegetação em bandejas contendo 72 células com vermiculita expandida como substrato, que permite boa aeração e retenção de umidade, além de ser facilmente removida das raízes, permitindo a lavagem sem causar danos significativos. Todo o experimento foi realizado em casa de vegetação com temperaturas médias entre 18 e 24 °C aproximadamente (noite e dia, respectivamente). Na fase inicial de crescimento a nutrição foi fornecida através de irrigação com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) modificada a 10% da concentração adotada para plantas adultas. No 16º dia após a germinação as plântulas foram transferidas para sistema hidropônico, contendo solução nutritiva a 10% ($\text{pH } 6,0 \pm 0,1$), sendo essa concentração aumentada em mais 10% a cada dois dias para aclimação. No 7º dia de hidroponia todas as soluções foram trocadas por soluções novas a 50% e foi feita aplicação de CdCl_2 nas doses apresentadas no item 3.2.2.

O cultivo hidropônico foi feito em bandejas de plástico revestidas com sacos pretos para evitar a entrada de luz. Cada bandeja continha 12 litros de solução nutritiva e foi feita aeração por meio de compressor com um sistema de mangueiras e ar comprimido, acopladas a pequenas pedras porosas (comumente usadas em aquários ornamentais). As plântulas foram acondicionadas em um suporte de placas de isopor com auxílio de pedaços de espuma entre as plântulas e o isopor. O espaçamento adotado foi de 80 x 80 mm entre as plantas ($64 \text{ cm}^2/\text{plântula}$) (Figura 1). Cada bandeja de hidroponia continha 16 plantas, que foram agrupadas aleatoriamente em 4 pools para as coletas e análises, resultando em 4 repetições biológicas para o experimento. Cinco repetições de amostras foram coletadas para análise de massa seca e quantificação de Cd, sendo secas em estufa por 3 dias e posteriormente

maceradas, pesadas e analisadas, enquanto as amostras para análises bioquímicas foram maceradas e armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

Figura 1 - Plantas de PDC cultivadas em bandejas no sistema hidropônico

3.2.2 Curva de Dose-Resposta ao CdCl_2

Inicialmente foi montado um experimento para avaliação do comportamento das plântulas de acordo com a dose de CdCl_2 aplicada e tempo de exposição. A curva de dose-resposta foi realizada com as concentrações de 0, 25, 50, 100 μM de CdCl_2 . Através de análises de massa seca e peroxidação lipídica (medições diárias), além de observações visuais de sintomas de clorose e caimento de folhas, foi possível determinar a dose e tempo de exposição mais adequados ao objetivo do estudo.

Nas doses de 50 e 100 μM de CdCl_2 as plantas começaram a perder as folhas já no 5º dia de exposição ao Cd, inviabilizando estas doses para o estudo de tempos mais prolongados. E através da peroxidação lipídica pudemos determinar o tempo da primeira coleta (T1) como o momento em que o estresse oxidativo iniciou e, o tempo da segunda coleta (T2) como o momento em que o estresse atingiu um platô, ou seja, estabilizou. Assim, o experimento final foi conduzido da mesma forma que o primeiro, sendo que agora estabelecemos uma única dose de 25 μM de CdCl_2 e 2 tempos de coleta – T1 (3 dias após aplicação) e T2 (10 dias após aplicação).

3.2.3 Parâmetros avaliados

3.2.3.1 Massa seca e quantificação de Cd

As plantas coletadas foram lavadas em água corrente e acondicionadas em sacos de papel, sendo desidratadas a 60 °C em estufa até massa constante. Depois de completamente desidratada cada planta foi pesada para avaliação da massa seca total, e posteriormente dividida em folhas e raízes, pensando-se cada parte separadamente.

A quantificação de Cd nos tecidos vegetais foi realizada por meio de digestão nitro-perclórica (MALAVOLTA et al., 1997), em que 250 mg de tecido seco, macerado até a textura de pó fino, foi posto em tubo de ensaio e acrescido de 2,5 mL de ácido nítrico e de 0,25 mL de ácido perclórico. A mistura permaneceu por aproximadamente 14 horas em bloco digestor. Após esse período a temperatura foi elevada 50 °C a cada 30 minutos até atingir a temperatura de 300 °C, e o processo prosseguiu até a total evaporação dos reagentes no tubo. Para proceder com as leituras das amostras, em espectroscopia de emissão ótica de plasma acoplado (ICP-OES), acrescentou-se 25 mL de água ultrapura.

3.2.3.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada através da mensuração da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expresso na forma de MDA (malondialdeído), de Heath and Packer (1968) modificado por Cia et al. (2012). As folhas e raízes foram homogeneizadas separadamente em cadinho com 4% (p/v) de PVPP (polivinilpirrolidona insolúvel) e 0,1% de TCA (ácido tricloroacético) na proporção (m/v) de 0,1 g mL⁻¹ de tampão para folha e 0,2 g mL⁻¹ para raiz. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 12 min. A 250 µl do sobrenadante foi adicionado 1 mL de 0,5% TBA (ácido tiobarbitúrico) em 20% de TCA. Essa solução foi incubada a 95 °C por 30 minutos, e a reação foi interrompida com banho de gelo. A quantidade (absorbância medida) de TBARS formada foi determinada através de espectrofotômetro a 535 nm. As medições foram corrigidas para turbidez inespecífica subtraindo-se a absorbância a 600 nm. A concentração de TBARS foi calculada usando o coeficiente de absorbância 1,55 x 10⁻⁵ mol⁻¹ cm⁻¹, e a quantidade de MDA foi expressa em nmol g⁻¹ de massa fresca.

3.2.3.3 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O H₂O₂ foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). As amostras frescas de folhas e raízes foram maceradas com 0,1% de TCA na relação de 100 mg mL⁻¹ (m/v). Após homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugadas a 10.000 g por 15 min, a 4 °C. Foi reservado 200 µL do sobrenadante, ao qual se adicionou 200 µL de solução 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M de iodeto de potássio. Os tubos com a reação foram colocados no gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Para estabilizar a reação, as amostras permaneceram em temperatura ambiente no escuro por 20 min, sendo posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. A quantidade de H₂O₂ foi expressa em µmol g⁻¹ de massa fresca.

3.2.3.4 Extração enzimática e determinação proteica

Todas as etapas seguintes foram realizadas a 4 °C. As folhas e raízes foram homogeneizadas com solução 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 3 mM de DTT (ditiotreitól) e 4% (p/v) de PVPP (polivinilpirrolidona insolúvel) (AZEVEDO et al., 1998) na proporção volume : massa fresca de folhas a 3 : 1 e de raízes a 1 : 1. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 30 min, e o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas de 200 µL a -80 °C previamente às análises bioquímicas. A concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando BSA (albumina bovina) como padrão em comprimento de onda de 595 nm.

3.2.3.5 Ensaios enzimáticos

3.2.3.5.1 Superóxido Dismutase (SOD) – EC 1.15.1.1

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi medida a 25 °C de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), no qual a atividade da enzima é medida pela habilidade de inibir a redução fotoquímica do composto cloreto de nitroblue tetrazólio (NBT). A solução de reação (3 mL) é constituída de solução 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 75 µM de NBT, 3 µM de riboflavina, 13 mM de metionina, 0,1 mM de EDTA e 30 µL de extrato

proteico. A solução foi adicionada em tubos de vidro e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm. Os valores de atividade foram expressos em U SOD mg proteína⁻¹.

3.2.3.5.2 Catalase (CAT) – EC 1.11.1.6

A atividade da catalase (CAT) foi medida a 25 °C em uma mistura de reação contendo 1 mL de solução 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 25 µL de solução 25% (v/v) de H₂O₂ (GRATÃO et al., 2008a). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato proteico da amostra e a atividade determinada de acordo com a decomposição de H₂O₂ através da medição de absorbância a 240 nm por 1 min. Os resultados foram expressos em µmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.2.3.5.3 Ascorbato Peroxidase (APX) – EC 1.11.1.1

A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981), através do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 30 °C no comprimento de onda de 290 nm. A reação foi composta de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ e 40 µL de extrato proteico em 1 mL de reação total. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato e o decréscimo de absorbância monitorado durante 1 min. Os valores de atividade foram expressos em µmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.2.3.5.4 Glutathione Redutase (GR) – EC 1.6.4.2

A atividade da glutathione redutase (GR) foi medida a 30 °C em uma mistura de reação contendo 1 mL de solução 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 1 mM de CTNB (ácido 5,5'-ditio-2-nitrobenzóico), 1 mM de GSSG (glutathione oxidada) e 0,1 mM de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) (GOMES-JUNIOR et al., 2006). A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato proteico da amostra. A taxa de redução da GSSG foi determinada através de espectrofotômetro monitorando-se o aumento de absorbância a 412 nm por 1 min. Os valores de atividade foram expressos em µmol min⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.2.3.5.5 Glutathione S-transferase (GST) – EC 2.5.1.18

A atividade glutathione S-transferase (GST) foi determinada através do monitoramento da conjugação da glutathione ao composto CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). O ensaio foi baseado no método proposto por Anderson e Gronwald (1991) com adaptações de Zablutowicz et al. (1995). A solução de reação continha 900 µL de solução 100mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,8), 2 µL de solução 40 mM de CDNB e 50 µL de solução 1 mM de GSH (glutathione reduzida), e foi incubada a 30 °C. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL extrato proteico, sendo monitorada por 3 min a 340 nm. O controle negativo do ensaio, o qual contém todos os reagentes menos a amostra, também teve sua atividade mensurada, sendo este valor descontado da atividade de GST encontrada para cada amostra. Isso se deve ao controle da reação para a taxa de conjugação espontânea da glutathione ao CDNB. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

3.2.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Foi realizada eletroforese não-desnaturante em géis de poliacrilamida (12%) para analisar atividade das enzimas antioxidantes. Os géis e soluções foram preparados de acordo com Gratão et al. (2008a). Foi utilizado o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura de 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3 mL de solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL tampão 3 M de TRIS (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED (tetrametiletenodiamina) e 25 µL de 1% PA (persulfato de amônio). Após a polimerização deste gel de resolução por cerca 30 min, foi aplicado o gel de empacotamento, o qual foi composto de 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão 500 mM de TRIS (pH 6.7) e 2,75 mL água destilada. Para a polimerização foram utilizados 10 µL TEMED e 50 µL de 1% PA. A eletroforese foi realizada a 4 °C em corrente constante de 15 mA/placa por cerca de 4 h. O tampão de eletrodo era composto de 25 mM de TRIS (pH 8,3) e 192 mM de glicina – 5X concentrado, sendo diluído para 1X.

3.2.3.6.1 Atividade SOD

A atividade da SOD em PAGE não desnaturante foi determinada conforme descrito por Gomes-Junior et al. (2006). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de SOD de

fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 60 µg de proteína total das amostras. Os géis foram lavados 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 de EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de NBT e 0,3% de TEMED. Após 30 min no agitador de bandeja, a mistura de reação foi removida, os géis foram enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o aparecimento das bandas brancas sob o fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, proporcionando a coloração púrpura e as bandas correspondentes às isoenzimas de SOD ativas permanecem sem se fotoxidar, provendo uma revelação negativa. Esta reação foi interrompida pela adição de ácido acético (7%) por 15 min. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

Para a determinação e classificação das isoformas de SOD foram confeccionados géis com apenas 2 canaletas, sendo uma para o padrão e outra para a amostra com 800 µg de proteína total. Ao final da eletroforese o gel foi dividido verticalmente em 3 partes. A primeira parte contendo padrão e amostra foi mantida a 4 °C em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8). A segunda parte foi imersa no mesmo tampão contendo 2 mM de KCN e 0,03% de EDTA. E a terceira parte foi imersa no tampão contendo 5 mM de H₂O₂ e 0,03% de EDTA. Após 20 min nestas soluções, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como descrito anteriormente neste mesmo item. Ao final da revelação foi analisada a presença e ausência de bandas no controle (parte 1) e nos tratamentos com KCN (parte 2) e H₂O₂ (parte 3). As isoformas foram classificadas conforme Azevedo et al. (1998): Mn-SOD é resistente tanto ao KCN como ao H₂O₂, Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H₂O₂, enquanto Cu/Zn-SOD é inibida por ambos os compostos. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

3.2.3.6.2 Atividade CAT

A atividade da CAT em PAGE não desnaturante foi determinada conforme descrito por Azevedo et al. (1998). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 60 µg de proteína total das amostras. A revelação foi realizada após 3 lavagens do gel com água deionizada por 15 min cada, e incubação do mesmo por 10 min em solução 0,003% de H₂O₂ a temperatura ambiente com agitação suave e constante. Após esse período, os géis foram rapidamente lavados com água deionizada e submersos por

10 min em solução 1% (p/v) de FeCl_3 e 1% (p/v) de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ com agitação suave. Em seguida os géis foram retirados da solução e lavados com água deionizada. A fixação foi realizada com solução 7% de ácido acético por 15 min. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

3.2.3.6.3 Atividade GR

A atividade da GR em PAGE não desnaturante foi determinada conforme descrito por Lee e Lee (2000). Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de GR de fígado de boi – Sigma (1 unidade) e 60 μg de proteína total das amostras. A revelação foi realizada após 2 lavagens do gel com água deionizada por 15 min cada, e incubação do mesmo por 30 min em solução 0,25 M de TRIS (pH 7,5), 0,02% de MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), 0,02% de DPIP (2,6-dicloroindofenol de sódio), 3,4 mM de GSSG e 0,5 mM de NADPH. Os géis foram lavados rapidamente com água deionizada e a reação fixada em ácido acético (7%) por 15 min. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

3.2.3.7 Compostos antioxidantes

3.2.3.7.1 Quantificação de glutathiona

A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foi determinada de acordo com Anderson (1985) e Israr et al. (2006) com modificações. O tecido vegetal (200 mg) foi macerado em 0,1% de ácido sulfosalicílico – 1,9 mL para folhas e 1,3 mL para raízes. Após a completa homogeneização, a mistura foi transferida para tubos e centrifugada 10.000 g por 20 min a 4 °C. Do sobrenadante foram retirados 250 μL , aos quais foram adicionados 1,75 mL de 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 0,5 mM de EDTA e 100 μL de 3 mM de DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) e mantido em repouso no escuro por 5 min. Para a determinação da GSH essa reação foi lida a 412 nm em espectrofotômetro.

Outra alíquota de 250 μL do sobrenadante foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1,75 mL do mesmo tampão acima, 100 μL de 0,4 mM NADPH e 2 μL GR (205 U/mg). A mistura permaneceu em repouso no escuro por 20 min. Para a determinação da

glutathiona total essa reação foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. A glutathiona foi quantificada com base em uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de GSH (Figura 2 e 3). A quantidade de GSSG foi calculada pela diferença entre os valores de glutathiona total e GSH. Os brancos consistiram nos mesmos reagente citados acima, porém no lugar da amostra utilizou-se o volume de 250 µL de 0,1% ácido sulfosalicílico.

Figura 2 - Curva padrão utilizada para quantificação de GSH

Figura 3 - Curva padrão utilizada para quantificação de glutathiona total

3.2.3.7.2 Quantificação de ascorbato

A quantificação de ascorbato (AA) e dehidroascorbato (DHA) foi determinada de acordo com protocolo de Kampfenkel et al. (1995) e Ribeiro et al. (2012) com algumas modificações. Foi utilizado 200 mg de tecido vegetal macerado em 1 mL de 6% TCA. Após completa homogeneização a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi transferida para outro tubo e adicionada de 400 µL de 6% TCA, 100 µL de 10 mM DTT (em 0,02 M tampão fosfato de sódio pH 7,4) e 200 µL de 0,02 M tampão fosfato de sódio (pH 7,4). A mistura foi incubada a 42 °C por 15 min. Em seguida, foi adicionado 100 µL de 0,5% (p/v) NEM (N-etilmaleimida), 100 µL de 50% (p/v) TCA, 400 µL de 42% (v/v) H₃PO₄ (ácido fosfórico), 400 µL de 4% (p/v) 2,2-dipiridil (em etanol) e 200 µL de 0,3% (p/v) FeCl₃, e incubado por 42 °C por 40 min. O tubo foi mergulhado em gelo para cessar a reação. A mistura foi lida a 525 nm em espectrofotômetro para mensurar o ascorbato total. O ascorbato foi quantificado com base em uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de ácido ascórbico (Figuras 4 e 5).

A quantificação do ascorbato reduzido (AA) foi realizada conforme descrito acima, porém no lugar de DTT e NEM foi utilizado o mesmo volume em tampão. O ascorbato oxidado foi calculado pela diferença entre os valores de ascorbato total e reduzido. Os brancos consistiram nos mesmos reagentes citados acima, porém no lugar da amostra utilizou-se o volume de 50 µL de 6% TCA.

Figura 4 - Curva padrão utilizada para quantificação de ascorbato total

Figura 5 - Curva padrão utilizada para quantificação de ascorbato reduzido

3.3 Resultados

3.3.1 Massa seca e quantificação de Cd

A análise de massa seca revelou que após 3 dias de exposição ao Cd (T1) as plantas de PDC ainda não apresentavam diferenças significativas de crescimento, tanto em folhas como em raízes (Figuras 6 e 7). Porém, com 10 dias de exposição (T2), ambos os tecidos demonstram uma nítida redução de crescimento em relação ao controle, sendo que nas folhas esse decréscimo foi de aproximadamente 50% e nas raízes 35%.

Figura 6 - Acúmulo de Massa Seca em folhas de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 7 - Acúmulo de Massa Seca em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 8 - Efeito do Cd sobre as plantas de PDC, após 3 (A) e 10 (B) dias de exposição ao Cd

A quantificação de Cd em PDC mostrou que o metal foi transportado para as folhas, e cerca de $90 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ de massa seca (MS) foi encontrado no T1, sendo que essa quantidade diminui levemente comparando-se ao T2 (Figura 9). Já as raízes absorveram no T1 cerca de $300 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ MS e, esse valor triplicou no T2 chegando a cerca de $900 \mu\text{g Cd g}^{-1}$ MS (Figura 9).

Foi calculado também o Índice de Transporte (absorção de Cd das folhas pela absorção total da planta), o qual foi de 24,5% no T1 e 7,45% no T2. Dessa forma, as plantas como um todo absorveram no T2 aproximadamente 15% do Cd adicionado na solução de hidroponia.

Figura 9 – Acúmulo de Cd nas plantas de PDC expostas a $25 \mu\text{M CdCl}_2$ – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. A) acúmulo de Cd nas folhas; B) acúmulo de Cd nas raízes. As barras com

letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.2 Peroxidação lipídica

De acordo com a quantificação de MDA, pode-se perceber que houve elevação da taxa de peroxidação lipídica nas folhas de PDC expostas ao Cd somente no T1 e o incremento observado entre T1 e T2 não é devido à presença de Cd, mas a própria fisiologia da planta (Figura 10). Já em raízes que receberam Cd não ocorreu maior peroxidação lipídica no T1 ou no T2 com relação aos respectivos controles (Figura 11).

Figura 10 - Quantificação de MDA em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 11 - Quantificação de MDA em raiz de PDC – T1: 3^o dia de exposição ao Cd; T2: 10^o dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.3 Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A quantificação de H₂O₂ nas folhas de PDC apresentou aumento nos tratamentos com Cd, especialmente no T2 (Figura 12). Enquanto que nas raízes observou-se aumento expressivo de H₂O₂ nas plantas tratadas com Cd somente no T2 (Figura 13).

Figura 12 - Quantificação de H₂O₂ em folha de PDC – T1: 3^o dia de exposição ao Cd; T2: 10^o dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 13 - Quantificação de H_2O_2 em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.4 Extração enzimática e determinação proteica

O conteúdo de proteínas solúveis totais das folhas de PDC demonstrou queda para os tratamentos que receberam Cd em relação ao controle em T2 (Figura 14). Para o tecido radicular também não houve diferenças no T1 entre tratado e controle (Figura 15).

Figura 14 - Quantificação de proteínas solúveis totais em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 15 - Quantificação de proteínas solúveis totais em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.5 Ensaios enzimáticos

3.3.5.1 Atividade SOD

A análise da atividade de SOD (EC 1.15.1.1) em espectrofotômetro revelou aumento para o tratamento com Cd no T2 em folhas (Figura 16). Enquanto que em raízes não foram observadas diferenças entre os tratamentos devido ao Cd, mas somente ao próprio desenvolvimento da planta (Figura 17).

Figura 16 - Atividade de SOD em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 17 - Atividade de SOD em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.5.2 Atividade CAT

A atividade de CAT (EC 1.11.1.6) medida em espectrofotômetro não apresentou diferenças entre nenhum dos tratamentos em folhas e raízes de PDC (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Atividade de CAT em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 19 - Atividade de CAT em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.5.3 Atividade APX

A atividade da APX (EC 1.11.1.1) em espectrofotômetro apresentou valores menores que os controles em folhas de PDC tratadas com Cd em ambos os tempos, com um leve aumento em T2 com relação a T1 (Figura 20). Em raízes de PDC, a atividade de APX não

diferiu do controle no T1, porém ocorreu um decréscimo no T2 com Cd, que se deve à presença do metal, pois os controles aumentaram a atividade de APX de T1 para T2 (Figura 21).

Figura 20 - Atividade de APX em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 21 - Atividade de APX em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.5.4 Atividade GR

A análise de GR (EC 1.6.4.2) em espectrofotômetro demonstrou que, tanto em folhas como raízes, as plantas tratadas com Cd apresentaram aumento na atividade desta enzima nos tempos 1 e 2, quando comparadas aos controles, porém sem aumento de T1 para T2 devido ao tempo de exposição ao Cd (Figuras 22 e 23).

Figura 22 - Atividade de GR em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 23 - Atividade de GR em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.5.5 Atividade GST

A atividade de GST (EC 2.5.1.18) em espectrofotômetro revelou que ambos os tecidos de PDC expostos ao Cd, tanto no T1 como no T2, apresentavam aumento de atividade desta enzima quando comparados aos respectivos controles (Figuras 24 e 25).

Figura 24 - Atividade de GST em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

Figura 25 - Atividade de GST em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd. As barras com letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro

3.3.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

3.3.6.1 Perfil de proteínas (SDS-PAGE)

No perfil de proteínas em SDS-PAGE desnaturante foi observada a indução de uma proteína de massa molecular de 160 kDa no tratamento com Cd em folhas no T2 (Figura 26 A), e neste mesmo tratamento em raízes foi observada a repressão de 3 proteínas de massas moleculares de 120, 10 e <10 kDa, respectivamente (Figura 26 B).

Figura 26 - Perfil de proteínas em SDS PAGE desnaturante em folhas (A) e raízes (B) – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

3.3.6.2 Atividade SOD

A atividade de SOD em PAGE não desnaturante em folhas revelou a presença de até 10 isoformas distintas, sendo que no tratamento com Cd em T2 ocorreu a aumento/indução da atividade de 5 isoformas (II a VII) e repressão de outras 3 isoformas (VIII a X) (Figura 27 A). Em raízes foi observado a presença de até 13 isoformas, com clara distinção nos padrões de atividades entre as isoformas dos controles e dos tratamentos com Cd em T1 e T2. Por exemplo, as isoformas V e VII e em menor escala, XIII, foram fortemente estimuladas na presença de Cd, enquanto a SOD XII teve a atividade bastante reduzida nos tratamentos com Cd (Figura 27 B).

Figura 27 - Atividade de SOD em PAGE não desnaturante em folhas (A) e raízes (B) – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

A caracterização de isoformas de SOD revelou que as bandas que foram induzidas e reprimidas em folhas em T2 pelo Cd são Cu/Zn-SOD, assim como as bandas que foram induzidas e reprimida em raízes no mesmo tratamento (Figura 28).

Figura 28 - Caracterização de isoformas de SOD em PAGE não desnaturante em folhas (A – T1 controle, B – T2 Cd) e raízes (C – T1 Cd) – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

3.3.6.3 Atividade CAT

A atividade de CAT em folhas em PAGE não desnaturante revelou a presença de 2 isoformas as quais não exibiram diferenças nos níveis de atividade entre os tratamentos (Figura 29). Não foi possível realizar essa análise para raízes devido à interferência de compostos.

Figura 29 - Atividade de CAT em PAGE não desnaturante em folhas – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

3.3.6.4 Atividade GR

A atividade de GR em folhas em PAGE não desnaturante apresentou 5 isoformas em extratos de PDC. Os padrões de distribuição e atividade das isoformas foram pouco modificados entre os tratamentos, talvez com uma aparente diminuição da atividade das isoformas em T2 na presença de Cd (Figura 30). Não foi possível realizar essa análise para raízes devido à interferência de compostos.

Figura 30 - Atividade de GR em PAGE não desnaturante em folhas – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

3.3.7 Compostos antioxidantes

3.3.7.1 Quantificação de glutathiona

A GSH e GSSG foram quantificadas em espectrofotômetro, e adicionalmente, foi calculada a razão GSH/GSSG que reflete o estado redox celular para o ciclo ascorbato-glutathiona. Pode-se observar que em folhas de PDC tratadas com Cd, tanto no T1 como no T2, a razão GSH/GSSG está maior que nos controles. Porém, só houve diferenças no conteúdo de GSH e GSSG em T2 tratado com Cd, sendo que a forma reduzida aumentou sua concentração enquanto a forma oxidada diminui (Figura 31).

Figura 31 - Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e razão GSH/GSSG em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

Já para o tratamento com Cd em raízes, percebe-se que em T1 a razão GSH/GSSG é menor que no controle, pois há muito mais GSSG presente. Enquanto em T2 tratado com Cd a razão inverte-se, estando mais alta que no controle, devido a um aumento na concentração de GSSG (Figura 32).

Figura 32 - Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e razão GSH/GSSG em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

3.3.7.2 Quantificação de ascorbato

O AA e DHA foram quantificados em espectrofotômetro, e adicionalmente, foi calculada a razão AA/DHA, que assim como a glutathiona reflete o estado redox celular do ciclo ascorbato-glutathiona. Em folhas de PDC expostas ao Cd observou-se um aumento na razão AA/DHA somente no T2 em relação ao controle devido à diminuição nos níveis de DHA (Figura 33). Assim como em folhas, nas raízes de PDC houve aumento da razão AA/DHA somente no T2 das plantas que receberam Cd, ocorrendo tanto aumento nos níveis de AA como diminuição de DHA (Figura 34).

Figura 33 - Quantificação de ascorbato reduzido (AA) e oxidado (monodehidroascorbato – DHA), e razão AA/DHA em folha de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

Figura 34 - Quantificação de ascorbato reduzido (AA) e oxidado (monodehidroascorbato – DHA), e razão AA/DHA em raiz de PDC – T1: 3º dia de exposição ao Cd; T2: 10º dia de exposição ao Cd

3.4 Discussão

Os testes piloto de definição de dose, em que foram analisadas as concentrações de 0, 25, 50, 100 μM de CdCl_2 , permitiram selecionar uma única dose para este estudo. Foram avaliados parâmetros como peroxidação lipídica e SPAD, além de observações visuais de caimento de folhas. Nas doses maiores já com 5 dias de exposição ao metal as plantas

apresentaram caimento de folhas com ou sem clorose. Como a proposta foi estudar 2 tempos de coleta, um mais precoce referente à resposta inicial ao metal e outro mais tardio referente à planta possivelmente sob estresse, a única dose que as plantas suportaram um tempo maior (10 dias) foi a de 25 μM CdCl_2 . Os tempos de 3 e 10 dias após aplicação de Cd foram determinados de acordo com a curva de quantificação de MDA em folhas, a qual tinha seus dois pontos de alteração nesses dias, ou seja, no 3º dia começou a aparecer peroxidação lipídica e a partir do 10º dia ocorreu a estagnação dos níveis de MDA.

Foram encontrados resultados interessantes nos tratamentos de Pimenta Doce Comprida (PDC) submetidas ao Cd, desde alterações na produção de biomassa, absorção do metal e respostas antioxidantes. As plantas apresentaram diminuição de crescimento somente com 10 dias de exposição ao Cd (T2), sendo que as folhas de PDC expostas ao Cd não apresentaram crescimento com o tempo, diferentemente do comportamento de raízes (Figuras 6 e 7). Esses resultados são condizentes com a absorção de Cd nos tecidos (Figura 9), que se agravou no T2 atingindo aproximadamente 1000 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ MS na planta (~ 90 e 945 $\mu\text{g Cd g}^{-1}$ MS, folha e raiz, respectivamente), correspondendo a cerca de 15% do Cd aplicado na solução nutritiva. O Índice de Transporte (IT) representa uma medida relativa que evidencia a distribuição do metal entre sistema radicular e foliar da planta. Analisando os dados de acúmulo de Cd, juntamente com o IT, podemos perceber que em T1 24,5% do Cd absorvido pela planta foi transportado para as folhas e em T2 esse valor cai para 7,45%, ou seja, quanto maior o tempo de exposição menor o transporte para as folhas. Desta forma, houve absorção muito elevada pela raiz de T1 para T2, porém o transporte para as folhas diminuiu, portanto, é seguro afirmar que esta planta possui algum mecanismo de retenção do Cd na raiz. Assim como é o caso de muitas plantas anuais, as raízes tendem a acumular até 80% do Cd total absorvido pela planta (CHIRAZ et al., 2006). Algumas plantas, como tomateiro (GRATÃO et al., 2012) e berinjela (ANGELOVA et al., 2009), apresentam esta capacidade de retenção do Cd nas raízes por complexação com fitoquelatinas e de limitar o seu transporte para a parte aérea o que é considerado um mecanismo de proteção das plantas aos efeitos danosos que os metais podem causar uma vez dentro do sistema celular (JOZEFCAK et al., 2014). Porém, o Cd pode se acumular em todos os tecidos da planta e pode gerar uma série de alterações que podem levar a fitotoxicidade (KOPITKE et al., 2010), como dano ao aparelho fotossintético (sintomas de clorose podem ser observados na Figura 8), diminuição na taxa fotossintética, redução do crescimento já relatados em outras espécies como *Solanum nigrum* L, *Impatiens wallerian*, *Populos* e *Solanum lycopersicum* L (GILL et al., 2012; GRATÃO et al., 2012;

KHAN et al., 2014; LAI, 2015). Este metal pode afetar mecanismos bioquímicos da célula e aspectos estruturais, gerando um desbalanço no equilíbrio redox da célula (IANNONE et al., 2015), nas relações hídricas e absorção de nutrientes (GILL et al., 2012), causando o estresse oxidativo e rompimento da composição da membrana celular e suas funções (AZEVEDO et al., 2012). Consequentemente, complexas vias bioquímicas são ativadas juntamente com alteração na regulação da transcrição de genes responsivos ao Cd, culminando na indução de sistemas antioxidantes (GRATÃO et al., 2012). Com relação a ultraestruturas, Gratão et al. (2009) relataram alterações em folhas de Micro-Tom, e seus mutantes hormonais *Never ripe* e *diageotropica* expostos ao Cd, com distorção na membrana de cloroplastos, desorganização de grana e desarranjo de tilacoides. Vitória et al. (2003) observaram que plântulas de rabanete expostas ao Cd apresentaram células de folha e caule com parede celular menos espessa e maior número de pelos radiculares, os quais apresentaram um material estranho aderido, possivelmente dificultando absorção de água. Estes aspectos ainda não são conhecidos para pimenta, o que torna este tipo de análise interessante para futura continuidade desta pesquisa para esta espécie.

Traçando um paralelo com dados da CETESB (2005), que aponta valores de intervenção para o Cd em solos agrícolas na faixa de 3 mg kg^{-1} , pode-se dizer que a quantidade utilizada neste estudo ($25 \text{ } \mu\text{M CdCl}_2$) corresponde a $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de solução ou $1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo, ou seja metade do valor a que plantas seriam expostas em solos contaminados. Outro dado importante é o nível que plantas hiperacumuladoras absorvem deste metal $> 100 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ MS}$ de parte aérea (KRÄMER, 2010), como é o caso de *Arabidopsis halleri* na qual já foi observado absorção até $2700 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ MS}$ em parte aérea sem sintomas de fitotoxicidade (KÜPPER et al., 2000). Quando analisados estes dois dados em conjunto, percebe-se que a PDC ($90 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ MS}$ na arte aérea em T2) quase atingiu níveis de uma hiperacumuladora estando em condições de bem menos metal que uma área considerada contaminada. Além disso, estudos indicam que o acúmulo de Cd apresenta alguma ligação à sua hiperacumulação (LOMBI et al., 2002), porém maiores níveis de tolerância ao Cd estão associados a menores de níveis de acúmulo em parte aérea (KRÄMER, 2010). O Cd é tóxico para plantas mesmo em baixas concentrações, apesar de em alguns casos as baixas concentrações do metal terem gerado estímulos tanto em plantas (GRATÃO et al., 2008b) como em *Aspergillus nidulans* (GUELFİ et al., 2003). Concentrações nas folhas acima de $5\text{-}10 \text{ } \mu\text{g Cd g}^{-1} \text{ MS}$ são tóxicas a maioria das plantas (WHITE; BROWN, 2010). Plantas tolerantes geralmente conseguem excluir o Cd, limitando a entrada e transporte da raiz a parte

aérea, que é um fator envolvido na tolerância (GALLEGO et al., 2012). De acordo com Krämer (2010), elevadas concentrações de GSH, cisteína e o-acetilserina, bem como atividade de GR estão relacionados à tolerância ao metal, seja por reduzir o dano oxidativo ou pela GSH atuar como um agente quelante e ser substrato para a biossíntese de fitoquelatinas. Estes dados foram encontrados em várias espécies como *T. Goesingense* (FREEMAN; SALT, 2007), *B. juncea* (ZHU et al., 1999), cevada (CHEN et al., 2010) e trigo (KHAN et al., 2015).

A peroxidação lipídica foi medida através da quantificação de MDA para se observar as dimensões dos danos oxidativos gerados pelos tratamentos com Cd (Figuras 10 e 11). As plantas de PDC tratadas com Cd apresentaram aumento no nível de MDA somente no tecido foliar no T1, pois considerando o aumento relacionado ao desenvolvimento de T1 para T2 controle, o nível de MDA não aumentou de T1 para T2 tratados com Cd, mas mantiveram-se as mesmas taxas. Enquanto que no tecido radicular destas não houve evidências de aumento ou diminuição das taxas de peroxidação lipídica entre quaisquer dos tratamentos. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem acelerar a peroxidação lipídica, alterando a fluidez e permeabilidade das membranas celulares devido a alterações na composição dos lipídios de membrana (TIAN et al., 2012). A quantificação de H_2O_2 (Figuras 12 e 13) apresentou aumento de concentração nas folhas de PDC expostas ao Cd nos 2 tempos estudados, sendo que em T2 ocorre aumento relacionado ao desenvolvimento natural da planta e aumento maior nas que receberam Cd. Em raízes a concentração de H_2O_2 não apresentou diferenças em T1 ou nos controles ao longo do tempo, porém aumentou em T2 devido à presença do Cd. Embora os mecanismos da toxicidade por Cd ainda estejam longe de ser completamente elucidados devido à gama de resultados variados que vem sendo relatados na literatura para espécies distintas, órgãos e tecidos das plantas, modelo (agudo, crônico) de exposição ao estresse, entre outros (GRATÃO et al., 2008a), este metal parece não gerar diretamente radicais livres, e a peroxidação lipídica é um dos principais sintomas da toxicidade por Cd (GRATÃO et al., 2012). É importante ressaltar que nem sempre a maior concentração de H_2O_2 em um tecido indica que a planta está mais estressada. O H_2O_2 possui papel fundamental na sinalização sistêmica de resposta a estresses bióticos, como ataque de patógenos (LEE et al., 2007), e abióticos como alta luminosidade (MULLINEAUX; KARPINSKI, 2002). Portanto, a manutenção dos níveis intracelulares de H_2O_2 precisa ser rigidamente regulada por mecanismos distintos que façam a fina modulação desta molécula, tanto no quesito sinalização celular como eliminação pelo sistema antioxidante, evitando a ocorrência do estresse oxidativo (MITTLER, 2002). O controle significativo da sinalização de

EROs depende da produção intracelular restrita onde ocorre o sinal redox-regulado. Dessa forma, o aumento da concentração de H_2O_2 , especialmente nas raízes em T2 associado aos baixos níveis de MDA, poderia indicar uma relação do H_2O_2 com a sinalização celular, e não necessariamente uma resposta direta a uma condição estressora que o Cd esteja estabelecendo pelos tratamentos desenhados.

Algumas EROs podem causar morte celular através de danos a lipídeos de membrana, pigmentos, enzimas, proteínas e ácidos nucleicos (GRATÃO et al., 2005). Embora tenham sido encontrados níveis de H_2O_2 maiores que nos controles em raízes tratadas com Cd no T2, o conteúdo de proteínas solúveis totais (PST) (Figuras 14 e 15) estava maior com relação ao controle. Foi observada uma diminuição de PST de T1 para T2 controle, indicando uma alteração fisiológica normal, porém as plantas que receberam Cd mantiveram as concentrações entre os dois tempos, ou seja, estas plantas aumentaram a produção de proteínas na raiz de acordo com o tempo de exposição ao Cd. Já nas folhas ocorreu diminuição no conteúdo de PST em T2 com relação aos controles e com relação ao T1 tratado com Cd indicando que houve influência do tempo de exposição ao Cd, o que segundo Gallego et al. (1996) pode ser considerado um bom índice do efeito do estresse oxidativo. De forma análoga, estes resultados também foram observados por Aslam et al. (2014) em sementes de uma outra variedade de pimenta, no qual os níveis de PST decaíram proporcionalmente à dose de Cd disponível em solução. Liu et al. (2015) também relataram diminuição nos níveis de PST em folhas de tabaco, tanto de plantas sensíveis como tolerantes ao Cd, ao receberem este metal. Estas alterações ocorrem principalmente por oxidação de grupos tiol dos resíduos de cisteína, provocando desnaturação e conseqüentemente perda da funcionalidade de enzimas (DOURADO et al., 2014). O Cd apresenta grande afinidade por grupos sulfidril, e além disso, ao gerar maior conteúdo de EROs, estas por sua vez também interferem com proteínas das mais variadas funções, atuando duplamente na degradação proteica e intensificando o dano celular. A análise do perfil proteico em SDS-PAGE mostrou indução de uma banda em folhas no T2, e repressão de 3 bandas neste tratamento em raízes (Figura 26). Porém, esta é uma análise qualitativa e não pode ser diretamente relacionado ao conteúdo de proteínas que é uma análise quantitativa.

Um dos indicadores de estresse oxidativo é o aumento de H_2O_2 , que pode ser devido à ação da Superóxido Dismutase (SOD) pela dismutação de excesso de radical superóxido, ou por outros processos químicos e enzimáticos como as enzimas do apoplasto amina oxidase e oxalato oxidase e plasmática NADPH oxidase (BLOKHINA et al., 2001; CHEN et al., 2014).

Nas folhas de PDC tratadas com Cd no T2 foram encontrados altos níveis de atividade de SOD (Figuras 16 e 17) que podemos assumir devidas ao metal, bem como altas concentrações de H_2O_2 , podendo ser um resultado da atividade da SOD pela dismutação do radical superóxido em H_2O_2 . Inclusive, foi observado em PAGE não desnaturante (Figura 28) a indução de 5 isoformas e repressão de 3, mais especificamente isoenzimas de Cu/Zn-SOD. As isoformas Cu/Zn-SOD são encontradas no citosol e nos cloroplastos, porém acredita-se que sejam codificadas no núcleo e transportadas ao seu respectivo destino na célula (ZHANG et al., 2014). Portanto, é provável que tal observação se trate de algum controle transcricional ou traducional não diretamente relacionado à nutrição mineral, já que as isoformas inibidas e induzidas possuem o mesmo cofator metálico. Além disso, existem diversos estudos indicando que a superexpressão de isoformas de SOD em plantas transgênicas aumenta a tolerância a diferentes tipos de estresse (XU et al., 2014). Porém, em raízes no tratamento com Cd, em ambos os tempos, a atividade de SOD não diferiu dos controles e o aumento observado de T1 para T2 foi devido ao desenvolvimento da própria planta. Em PAGE não desnaturante foi observada a repressão de 1 isoforma com aumento de outras 3 (Figura 27). Essa diminuição pode ser atribuída a um menor grau de toxicidade neste tecido apesar da maior concentração de Cd encontrada, pois o Cd pode ter sido complexado e, portanto, com menor possibilidade de causar um estresse mais severo. Este dado sugere ainda que os efeitos do Cd podem e devem ser indiretos afetando a expressão e ação das diferentes enzimas antioxidantes diferentemente. Resultados similares foram observados por Xu et al. (2014) em plântulas de milho, levando a conclusão que a atividade de SOD apresenta um limiar e sua função protetora de membranas é limitada. Lin et al. (2014) encontraram resultados um pouco diferentes para *Galinsoga Parviflora* tratada com Cd, no qual a atividade de SOD respondia diferentemente de acordo com a dose de Cd – em doses baixas de Cd a atividade de SOD não se alterava, em doses intermediárias ficava bem alta, e em doses altas voltava a diminuir. Chen et al. (2014) também encontraram resultados de atividade de SOD dose-dependente em folhas e raízes de plântulas de trigo tratadas com Cd – nas doses mais altas de Cd as folhas apresentavam maior atividade de SOD enquanto as raízes apresentavam menor atividade.

A atividade da Catalase (CAT) (Figuras 18 e 19), enzima responsável pela degradação do H_2O_2 em O_2 e H_2O , não apresentou diferenças para nenhum dos tecidos de PDC estudados, inclusive não se alterou durante o controle T1 para T2. A atividade de CAT em PAGE (Figura 29) não desnaturante também não apresentou diferenças entre os tratamentos. Enquanto a atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) (Figuras 20 e 21), que também degrada o H_2O_2 , foi

menor que o controle somente no T1 em raízes tratadas com Cd, de T1 para T2 ocorre aumento de atividade devido ao desenvolvimento da planta e brusca queda de atividade na presença de Cd. Foi observado um comportamento diferente para a atividade de APX, a qual estava baixa em T1 com Cd e em T2 continuou baixa com relação ao controle, porém com um leve aumento em T2 com relação a T1 devido à exposição ao Cd, pois os controles não alteram com o tempo. Provavelmente o aumento de quantidade de H_2O_2 no T2 em relação ao T1 tratados com Cd, em toda a planta de forma geral, deva-se em parte à falta de resposta da CAT e diminuição da atividade da APX (com exceção de raiz no T1), em especial à brusca inibição da APX em raiz no T2 com Cd. O nível das EROs em peroxissomos é controlado pelas enzimas CAT, APX e SOD (CORPAS et al., 2001). O_2^- é produzido no lado citosólico da membrana do peroxissomo enquanto o H_2O_2 permeia a membrana. Supõe-se que a formação de O_2^- iniba a atividade de CAT e APX, resultando em aumento de H_2O_2 devido ao aumento de β -oxidação. De acordo com Sandalio et al. (2013), após estímulos de estresse algumas enzimas podem ter sua atividade reduzida devido a S-nitrosilação ou nitratação, de modo que o peroxissomo passa a ser uma fonte de EROs em vez de um dissipador. No entanto, Singh e Shah (2014) observaram uma atividade mais proeminente de CAT em plântulas de arroz tratadas com o dobro da dose ($50 \mu M$ Cd) de Cd usada neste trabalho ($25 \mu M$ Cd) durante 7 dias. Além disso, outras enzimas que não foram analisadas podem estar atuando na degradação do H_2O_2 em excesso, como a guaiacol peroxidase (GPOX; EC 1.11.1.7), encontrada no citoplasma e apoplasto, e a glutational peroxidase (GPX; EC 1.11.1.9), já localizada no citosol, cloroplastos, mitocôndrias e retículo endoplasmático de *Arabidopsis* (GRATÃO et al., 2005).

O resultado da quantificação de ácido ascórbico (Figuras 33 e 34) revelou uma diminuição em T2 com relação a T1 e com relação aos controles da sua forma oxidada (dehidroascorbato – DHA) em ambos os tecidos de PDC tratadas com Cd. Particularmente em raízes no T2 com Cd, além da diminuição de DHA, foi observado um leve aumento da forma reduzida de ascorbato (AA), alterando o balanço redox para um estado mais oxidado. Esses resultados corroboram a atividade de APX, que também estava diminuída nesses tratamentos devido à presença de Cd, bem como as altas concentrações de H_2O_2 . De acordo com Hung et al. (2005), o ascorbato é provavelmente o principal composto para eliminação de EROs, especialmente o H_2O_2 . Em contraste com os resultados aqui apresentados, Mishra et al. (2014) relataram aumento de DHA e de AA em culturas *in vitro* de *Ashwagandha* tratadas com diversas doses de Cd, indicando o combate efetivo ao estresse oxidativo por estas moléculas.

Além disso, a diminuição de proteínas solúveis em folhas no T2 pode ser responsável pela diminuição de atividade de APX nesse tecido.

Tanto a Glutathione Redutase (GR) (Figuras 22 e 23) como a Glutathione S-transferase (GST) (Figuras 24 e 25) apresentaram altas atividades em ambos os tecidos e tempos dos tratamentos com Cd com relação aos controles. Porém, em folhas a atividade de GR não aumentou em T2 devido ao tempo de exposição ao Cd entre T1 e T2. A mesma situação foi observada para a atividade de GST, considerando que a maior atividade em folhas no T2 com Cd deve-se ao desenvolvimento da planta unicamente, pois o incremento foi o mesmo que entre T1 e T2 controles. Embora esse aumento de atividade quantitativo observado, em análise de PAGE (Figura 30) duas isoformas de GR foram reprimidas em folhas tratadas com Cd no T2. A maioria dos estudos que determinaram a resposta da GR ao Cd demonstrou aumento de atividade como parte da defesa contra o estresse (GRATÃO et al., 2005). Além disso, alterações importantes da GR têm sido observadas em resposta ao estresse induzido por outros agentes estressores e em outros organismos, como por exemplo herbicidas e bactérias (MARTINS et al., 2011; PETERS et al., 2014).

A quantificação de glutathione (Figuras 31 e 32) mostrou em folhas aumento nos níveis da forma reduzida (GSH) e diminuição da oxidada (GSSG) no T2 das plantas que receberam Cd, indicando que neste momento as folhas estavam combatendo o estresse com maior facilidade, e também sendo um indicativo indireto de uma possível maior atividade de GR. Já em raiz, foi observado em T1 e T2 aumento de GSSG com relação ao controle, embora o aumento em T2 tenha ocorrido pela fisiologia normal da planta, dado que os controles também sofreram esse reajuste. Os únicos tratamentos em que ocorre aumento da produção de glutathione exclusivamente como resposta ao Cd são em T2 de folhas e T1 de raízes, resposta essa condizente com os resultados das enzimas às quais esse tripeptídeo está diretamente relacionado, e que indica que o Cd induziu à biossíntese dessa molécula e a assimilação de enxofre nesses tratamentos. Modificações oxidativas de proteínas sensíveis, como as que possuem cisteínas oxidáveis, podem causar perdas ou alterações de suas atividades. Para prevenir a oxidação, as células possuem altas quantidades de GSH, o principal tiol não-proteico, que atua na inativação de compostos oxidantes e tóxicos (PUIGPINÓS et al., 2015). Recentemente, acredita-se que a GSSG também seja fundamental como protetora e reguladora de certas funções, como a S-glutathionilação, reação de conjugação entre GSSG e grupos de proteínas cis-sulfidril, promovida pela GST (DEL BUONO et al., 2014). Os resultados

demonstrando alteração no conteúdo de glutathiona e ascorbato nos tratamentos com Cd em ambos os tecidos indicam que esse metal induziu alterações no balanço celular.

Na Figura 35 podemos ver um resumo de todas as respostas do sistema antioxidante em parte foliar e radicular expostas ao Cd com relação aos controles em PDC. Estes dados indicam que num primeiro momento (T1) a planta estava sob estresse oxidativo nas folhas (vide dados de MDA), porém no maior tempo de exposição consegue reverter a situação não mais apresentando certos níveis de peroxidação lipídica. As enzimas CAT e APX, responsáveis pela detoxificação do H_2O_2 , ou não se alteraram ou responderam com diminuição de atividade, o que indica que devem existir outras peroxidases ativas ou que as quantidades de H_2O_2 não são tóxicas e sim correspondentes à sinalização devido à presença do metal. No segundo tempo (T2) a enzima SOD responde com aumento de atividade, e embora algumas isoformas tenham sido inibidas outras foram ativadas sugerindo o envolvimento dessas isoenzimas no combate ao estresse por Cd. Consequentemente os níveis de H_2O_2 também aumentam com relação a T1 e os de MDA se estabilizam. Ocorre também aumento da produção de glutathiona que juntamente com a GST e GR podem combater o aumento de H_2O_2 . Há estudos na literatura indicando que a combinação de transgenes que codificam enzimas de combate a diferentes EROs em vários compartimentos subcelulares pode apresentar um efeito sinérgico no aprimoramento da tolerância ao estresse (XU et al., 2014). Em certo grau, essa afirmação pode ser extrapolada para as condições encontradas na PDC.

Já em raízes, não ocorre peroxidação lipídica em momento algum, e as enzimas CAT e SOD permanecem sem alteração nos dois tempos, enquanto APX é ligeiramente reprimida em T2, e consequentemente observa-se aumento da relação AA/DHA. As atividades de GR e GST mantiveram-se altas nos dois tempos, bem como a concentração de GSSG, porém as alterações desta última em T2 devem-se ao estágio de desenvolvimento da planta e não especificamente uma resposta ao Cd.

Sabe-se que esse sistema altamente complexo e delicado atua em conjunto, mas no caso desse estudo em PDC pode-se dizer que de modo geral os grandes responsáveis por evitar o estresse oxidativo foram as enzimas GR, GST, SOD (especificamente em T2 folhas), e os compostos antioxidantes glutathiona e ascorbato, bem como o H_2O_2 atuando como molécula sinalizadora.

Figura 35 - Visão geral do sistema antioxidante envolvendo mecanismo enzimáticos e não-enzimáticos de PDC com base no presente estudo. SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; APX – ascorbato peroxidase; GR – glutatona redutase; GST – glutatona S-transferase; AA – ascorbato reduzido; MDHA – monodehidroascorbato; DHA – dehidroascorbato; GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona oxidada. Os quadrados vermelhos representam diminuição e os quadrados verdes representam aumento de atividade enzimática ou concentração do composto, e os quadrados cinza representam não alteração. T1 – resposta do tecido coletado após 3 dias de exposição ao Cd com relação ao controle; T2 - resposta do tecido coletado após 10 dias de exposição ao Cd com relação ao controle

O acima exposto nos leva a acreditar que a PDC apresenta algum nível de tolerância ao Cd, apresentando resposta antioxidante baseada no ciclo ascorbato-glutationa e possuindo raízes que imobilizam o Cd, característica esta que deve estar relacionada ao aumento da produção de proteínas em T2 e presença de fitoquelatinas.

3.5 Conclusão

Neste trabalho analisamos o impacto do metal pesado Cd sobre o metabolismo antioxidante de Pimenta Doce Comprida (PDC) ao longo do seu crescimento (3 e 10 dias após aplicação de Cd – T1 e T2) e os resultados permitem sugerir que:

- A maior parte do metal absorvido ficou retido nas raízes e a planta de modo geral apresentou diminuição no crescimento já em T1 na parte foliar e em T2 na parte radicular, o que deve estar relacionado a menor absorção de nutrientes pela raiz, pois o Cd pode competir pelos mesmos sítios de ligação nas membranas.

- O estresse oxidativo, estimado pela concentração de MDA, PST e H_2O_2 , ocorreu somente nas folhas em T1 e sendo revertido em T2, ou seja, houve sinalização do estresse do Cd da raiz à parte foliar.

- As enzimas antioxidantes responderam de forma variada ao estresse pelo Cd em PDC. A CAT não respondeu à exposição ao Cd e a APX foi inibida na presença do metal, enquanto a SOD somente em T2 em folhas esteve mais ativa que o controle, assim explicando o aumento de quantidade de H_2O_2 encontrado.

De todas as enzimas avaliadas, as que mantiveram atividade alta em todos os tempos e tecidos quando expostas ao Cd foram GR e GST, juntamente com o composto antioxidante glutatona induzida em folhas no T2 e em raízes no T1 com Cd. De forma que esse sistema estava bastante ativo e responsivo ao estresse em PDC na parte foliar.

Referências

AFIYANTI, M.; CHEN, H.J. Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 171, p. 35–47, 2014.

ALAM, M.M.; NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Alleviation of osmotic stress in *Brassica napus*, *B. campestris*, and *B. juncea* by ascorbic acid application. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 58, n. 4, p. 697-708, 2014.

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, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 113, p. 548-555, 1985.

ANDERSON, M.P.; GRONWALD, J.W. Atrazine resistance in a velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. **Plant Physiology**, Washington, v. 96, p. 104-109, 1991.

ANGELOVA, V.R.; BABRIKOV, T.D.; IVANOV, K.I. Bioaccumulation and distribution of lead, zinc, and cadmium in crops of *Solanaceae* family. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 40, n. 13, p. 2248-2263, 2009.

ANJUM, N.A.; GILL, S.S.; GILL, R.; HASANUZZAMAN, M.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, E.; AHMAD, I.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. **Protoplasma**, Wien, v. 251, p. 1265-1283, 2014.

ANTONIOUS, G.F. Impact of soil management practices on yield, fruit quality, and antioxidant contents of pepper at four stages of fruit development. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 49, p. 769-774, 2014.

ANTONIOUS, G.F.; KOCHHAR, T.S. Mobility of Heavy Metals from Soil into Hot Pepper Fruits: A Field Study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 82, p. 59-63, 2009.

ARAVIND, P; NARASIMHA, M; PRASAD, V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 2, p. 107-116, 2005.

ARTIUSHENKO, T.; SYSHCHYKOV, D.; GRYSHKO, V.; ČIAMPOROVÁ, M.; FIALA, R.; REPKA, V.; MARTINKA, M.; PAVLOVKIN, J. Metal uptake, antioxidant status and membrane potential in maize roots exposed to cadmium and nickel. **Biologia**, Warsaw, v. 69, n. 9, p. 1142-1147, 2014.

ASLAM, R.; ANSARI, M.Y.K.; CHOUDHARY, S.; BHAT, T.M.; JAHAN, N. Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annuum* L. – An important spice crop of India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, v. 21, p. 465-472, 2014.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; 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**, Hoboken, v. 104, p. 280-292, 1998.

AZEVEDO, R.A.; GRATÃO, P.L.; MONTEIRO, C.C.; CARVALHO, R.F. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? **Food and Energy Security**, Rothamsted, v. 1, p. 133–140, 2012.

BAZIHIZINA, N.; REDWAN, M.; TAITI, C.; GIORDANO, C.; MONETTI, E.; MASIA, E.; AZZARELLO, E.; MANCUSO, S. Root based responses account for *Psidium guajava* survival at high nickel concentration. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 174, p. 137–146, 2015.

BEGARA-MORALES, J.C.; SÁNCHEZ-CALVO, B.; CHAKI, M.; VALDERRAMA, R.; MATA-PÉREZ, C.; LÓPEZ-JARAMILLO, J.; PADILLA, M.N.; CARRERAS, A.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 527-538, 2013.

BHADURI, A.M.; FULEKAR, M.H. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. **Review in Environmental Sciences and Biotechnology**, Delft, v. 11, p. 55-69, 2012.

BLOKHINA, O.B.; CHIRKOVA, T.V.; FAGERSTEDT, K.V. Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 359, p. 1179-1190, 2001.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 71, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, R.F.; CAMPOS, M.L.; CRESTANA, S.L.; PINO-NUNES, L.E.; ZSÖGÖN, A.; LIMA, L.E.; BENEDITO, V.A.; PERES, L.E.P. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, London, v. 7, p. 1-14, 2011.

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

CHEN, C.; ZHOU, Q.; CAI, Z. Effect of soil HHCb on cadmium accumulation and phytotoxicity in wheat seedlings. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 23, p. 1996–2014, 2014.

CHEN, F.; WANG, F.; WU, F.; MAO, W.; ZHANG, G.; ZHOU, M. Modulation of exogenous glutathione in antioxidant defense system against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 663-672, 2010.

CHEN, J.; YANG, L.; GU, J.; BAI, X.; REN, Y.; FAN, T.; HAN, T.; JIANG, L.; XIAO, F.; LIU, Y.; CAO, S. MAN3 gene regulates cadmium tolerance through the glutathione-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Hoboken, v. 205, p. 570–582, 2015.

CHIRAZ, C.; HOUDA, G.; HABIB, G.M. Nitrogen metabolism in tomato plants under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, n. 8, p. 1617-1634, 2006.

CIA, M.C.; GUIMARAES, A.C.R.; MEDICI, L.O.; CHABREGAS, S.M.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 161, n. 3, p. 313-324, 2012.

CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B.; DEL RIO, L.A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, p. 145-150, 2001.

DEL BUONO, D.; MIMMO, T.; TERZANO, R.; TOMASI, N.; CESCO, S. Effect of cadmium on antioxidative enzymes, glutathione content, and glutathionylation in tall fescue. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 58, n. 4, p. 773-777, 2014.

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 109, p. 212-228, 2015.

DEWIR, Y.H.; CHAKRABARTY, D.; ALI, M.B.; HAHN, E.J.; PAEK, K.Y. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milii* hyperhydric shoots. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 93-99, 2006.

DOURADO, M.N.; SOUZA, L.A.; MARTINS, P.F.; PETERS, L.P.; PIOTTO, F.A.; AZEVEDO, R.A. *Burkholderia* sp. SCMS54 triggers a global stress defense in tomato enhancing cadmium tolerance. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 225, n. 10, p. 1-16, 2014.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 11, p. 861-905, 2009.

FREEMAN, J.L.; SALT, D.E. The metal tolerance profile of *Thlaspi goesingense* is mimicked in *Arabidopsis thaliana* heterologously expressing serine acetyl-transferase. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, n. 63, p. 1-10, 2007.

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

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, M.F.; ROSALES, E.P.; ZAWOZNIK, M.S.; GROPPA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 83, p. 33-46, 2012.

GHELFI, A.; GAZIOLA, S.A.; CIA, M.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; KUSER-FALCÃO, P.R.; AZEVEDO, R.A. Cloning, expression, molecular modeling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology**, Hoboken, v. 159, n. 2, p. 267-280, 2011.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide Dismutases .1. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GILL, S.S.; ANJUM, N.A.; HASANUZZAMAN, M.; GILL, R.; TRIVEDI, D.K.; AHMAD, I.; PEREIRA, E.; TUTEJA, N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 70, p. 204-212, 2013.

GILL, S.S.; KHAN, N.A.; TUTEJA, N. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Science**, Clare, v. 182, p. 112–120, 2012.

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, p. 79–96, 2012.

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**, Oxford, 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, 2008a.

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**, Collingwood, v. 32, p. 481–494, 2005.

GRATÃO, P.L.; POMPEU, G.B.; CAPALDI, F.R.; VITORELLO, V.A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 94, n. 1, p. 73-83, 2008b.

GROß, F.; DURNER, J.; GAUPELS, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 419, p. 1-15, 2013.

GUELFİ, A.; AZEVEDO, R.A.; LEA, P.J.; MOLINA, S.M.G. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 63-73, 2003.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty peroxidation. **Archives of 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. Calif. Agric. Exp. Sta., 1950, 32 p.

HOFFMAN, P.G.; LEGO, M.C.; GALETTO, W.G. Separation and quantitation of red pepper major heat principles by reverse-phase high pressure liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 31, p. 1326-1330, 1983.

HUNG, S-H.; YU, C-W.; LIN, C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Nankang, v. 46, p. 1-10, 2005.

IANNONE, M.F.; GROPPA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Cadmium induces different biochemical responses in wild type and catalase-deficient tobacco plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 109, p. 201-211, 2015.

ISRAR, M.; SAHI, S.; DATTA, R.; SARKAR, D. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 591-598, 2006.

JOZEFCAK, M.; KEUNEN, E.; SCHAT, H.; BLIEK, M.; HERNANDEZ, L.E.; CARLEER, R.; REMANS, T.; BOHLER, S.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Differential response of *Arabidopsis* leaves and roots to cadmium: Glutathione-related chelating capacity vs antioxidant capacity. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 83, p. 1-9, 2014.

KAMPFENKEL, K.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant-tissue. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 225, n. 1, p. 165-167, 1995.

KHAN, A.R.; ULLAH, I.; KHAN, A.L.; HONG, S.J.; WAQAS, M.; PARK, G.S.; KWAK, Y.; CHOI, J.B.; JUNG, B.K.; PARK, M.; LEE, I.J.; SHIN, J.H. Phytostabilization and physicochemical responses of Korean ecotype *Solanum nigrum* L. to cadmium contamination. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 225, n. 10, p. 1-11, 2014.

KHAN, M.I.R.; NAZIR, F.; ASGHER, M.; PER, T.S.; KHAN, N.A. Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 173, p. 9-18, 2015.

KOPITKE, P.M.; BLAMEY, F.P.C.; MENZIES, N.W. Toxicity of Cd to signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) and Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 330, p. 515-523, 2010.

KRÄMER, U. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 517-534, 2010.

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

LAI, H.Y. Effects of leaf area and transpiration rate on accumulation and compartmentalization of cadmium in *Impatiens walleriana*. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 226, n. 1, p. 1-10, 2015.

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

LEE, K.P.; KIM, C.; LANDGRAF, F.; APEL, K. EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 104, n. 24, p. 10270–10275, 2007.

LIN, L.; JIN, Q.; LIU, Y.; NING, B.; LIAO, M.A.; LUO, L. Screening of a new cadmium hyperaccumulator, *Galinsoga Parviflora*, from winter farmland weeds using the artificial high soil cadmium concentration method. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 33, n. 11, p. 2422–2428, 2014.

LIN, Y.F.; AARTS, M.G.M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 69, n. 19, p. 3187-3206, 2012.

LIU, W.; SHANG, S.; FENG, X.; ZHANG, G.; WU, F. Modulation of exogenous selenium in cadmium-induced changes in antioxidative metabolism, cadmium uptake, and photosynthetic performance in the 2 tobacco genotypes differing in cadmium tolerance. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Hoboken, v. 34, n. 1, p. 92–99, 2015.

LOMBI, E.; TEARALL, K.L.; HOWARTH, J.R.; ZHAO, F.J.; HAWKESFORD, M.J.; MCGRATH, S.P. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, Jena, v. 128, p. 1359-67, 2002.

LU, F.H.; KWON, S.W.; YOON, M.Y.; KIM, K.T.; CHO, M.C.; YOON, M.K.; PARK, Y.J. SNP marker integration and QTL analysis of 12 agronomic and morphological traits in F8 RILs of pepper (*Capsicum annuum* L.). **Molecules and Cells**, Seoul, v. 34, p. 25-34, 2012.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 319p, 1997.

MARTINS, P.F.; CARVALHO, G.; GRATÃO, P.L.; DOURADO, M.N.; PILEGGI, M.; ARAÚJO, W.L.; AZEVEDO, R.A. Effects of the herbicides acetochlor and metolachlor on antioxidant enzymes in soil bacteria. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 46, p. 1186–1195, 2011.

MISHRA, B.; SANGWAN, R.S.; MISHRA, S.; JADAUN, J.S.; SABIR, F.; SANGWAN, N.S. Effect of cadmium stress on inductive enzymatic and nonenzymatic responses of ROS

and sugar metabolism in multiple shoot cultures of Ashwagandha (*Withania somnifera* Dunal). **Protoplasma**, Wien, v. 251, p. 1031–1045, 2014.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

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**, Oxford, 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**, London, v. 5, n. 1, p. 43-48, 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen-Peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

PETERS, L.P.; CARVALHO, G.; MARTINS, P.F.; DOURADO, M.N.; VILHENA, M.B.; PILEGGI, M.; AZEVEDO, R.A. Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-12, 2014.

PIZZAIA, D. **Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.)** 2013. 98p. Tese (Doutorado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PUIGPINÓS, J.; CASAS, C.; HERRERO, E. Altered intracellular calcium homeostasis and endoplasmic reticulum redox state in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking Grx6 glutaredoxin. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 26, n. 1, p. 104-116, 2015.

RAO, T.V.R.; GOL, N.B.; SHAH, K.K. Effect of postharvest treatments and storage temperatures on the quality and shelf life of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 132, p. 18–26, 2011.

RIBEIRO, C.; CAMBRAIA, J.; PEIXOTO, P.H.P.; JÚNIOR, E.M.F. Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 24, n. 2, p. 107-116, 2012.

SANDALIO, L.M.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L.A. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. **Subcellular Biochemistry**, New York, v. 69, p. 231–255, 2013.

SERRANO, M.; ZAPATA, P.J.; CASTILLO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ-ROMERO, D.; VALERO, D. Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. **Food Chemistry**, Washington, v. 118, p. 497–503, 2010.

SINGH, P.; SHAH, K. Evidences for reduced metal-uptake and membrane injury upon application of nitric oxide donor in cadmium stressed rice seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 83, p. 180-184, 2014.

- SOUZA, L.A.; PIOTTO, F.A.; NOGUEIROL, R.C.; AZEVEDO, R.A. Use of nonhyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 4, 2013.
- TIAN, S.K.; LU, L.L.; YANG, X.E.; HUANG, H.G.; WANG, K.; BROWN, P.H. Root adaptations to cadmium-induced oxidative stress contribute to Cd tolerance in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 56, p. 344–350, 2012.
- VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, p. 701–710, 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**, Dordrecht, v. 47, n. 4, p. 561–568, 2003.
- WANG, J.; ZHANG, Z.; HUANG, R. Regulation of ascorbic acid synthesis in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 8, n. 6, p. 1–3, 2013.
- WHITE, P.J.; BROWN, P.H. Plant nutrition for sustainable development and global health. **Annals of Botany**, Oxford, v. 105, p. 1073–1080, 2010.
- XU, J.; YANG, J.; DUAN, X.; JIANG, Y.; ZHANG, P. Increased expression of native cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase improves tolerance to oxidative and chilling stresses in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 208, p. 1–13, 2014.
- XU, X.; LIU, C.; ZHAO, X.; LI, R.; DENG, W. Involvement of an antioxidant defense system in the adaptive response to cadmium in maize seedlings (*Zea mays* L.). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 93, p. 618–624, 2014.
- YADAV, S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 76, p. 167–179, 2010.
- ZABLOTOWICZ, R.M.; HOAGLAND, R.E.; LOCKE, M.A.; HICKEY, W.J. Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1054–1060, 1995.
- ZHANG, W.B.; LI, N.N.; QI, F.; CHEN, X.; HAO, J.; YU, C.R.; LIN, X.F. Isolation and expression analysis of Cu/Zn superoxide dismutase genes from three *Caragana* species. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 61, n. 5, p. 656–663, 2014.
- ZHAO, Y.; WU, J.; SHANG, D.; NING, J.; ZHAI, Y.; SHENG, X.; DING, H. Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in the edible seaweed, *Porphyra yezoensis* Yanfang. **Food Chemistry**, Washington, v. 168, p. 48–54, 2015.
- ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; TARUN, A.S.; WEBER, S.U.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing g-glutamylcysteine synthetase. **Plant Physiology**, Jena, v. 121, p. 1169–1177, 1999.