RESPOSTA DE LINHAGENS DE ARROZ À EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Patrícia Felipe Cardoso

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 2000

RESPOSTA DE LINHAGENS DE ARROZ À EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Patrícia Felipe Cardoso

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Novembro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Cardoso, Patrícia Felipe

Resposta de linhagens de arroz à exposição ao cádmio / Patrícia Felipe Cardoso. -- Piracicaba, 2000
55 p.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Arroz 2. Atividade enzimática 3. Cádmio 4. Fitotoxicidade 5. Linhagem vegetal 6. Metal pesado 7. Poluente químico I. Título

CDD 633.18

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

*Aos meus pais Elisario e Rosalva por contar sempre com seu amor e
por toda dedicação de suas vidas a minha formação pessoal e profissional
A minha avó Anna pelo amor e pelo exemplo de bondade*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre orientou meus passos.

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, especialmente ao Departamento de Genética pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes Azevedo, pela orientação, apoio e amizade.

A Prof.^a. Maria Flor do Céu Araújo Moura, orientadora na graduação, pelos primeiros ensinamentos e amizade.

A Prof.^a. Silvia Maria Guerra Molina, pela valiosa ajuda nas análises estatísticas e pela amizade

Ao Capelão Militar Vítor Tome Menuti, pela atenção, compreensão e lições de sabedoria que transportou para minha mente.

A minha Família, pela alegria, carinho e união nos momentos mais difíceis.

Aos velhos amigos, Leandro. J. Neves, Eliza Adriana. A. Carvalho, Fernanda. N.G. Netto, Gabriela. R. Coutinho, apesar da distância sempre pude compartilhar da amizade.

Aos amigos Guy. M. Tsumanuma, Alessandra. A. Santos, Ana Paula. S. Aguiar, Barbara. M. Padovan, Monica. S. Camargo e Roberta. E. Nascimento por dividirem os bons e maus momentos desta etapa de nossas vidas em Piracicaba.

A André Luiz. S. Lacerda, Cantídio Fernando Gouveia, Claudio.Yuji Tsutsumi, Gilberto Ken - iti Yokomizo, Gustavo. J. M. Brito, Maurisrael. M. Rocha, Fábio Pandini (In memoria), Andréa Mittelman, Ana Luiza Ramos, Ana Lídia V. Bonatto, Betania L.R. Cabral e Edina Regina Moresco pela companhia alegre.

Ao pessoal do Laboratório, Guilherme J. G. Pereira, Leonardo. O. Medici, Renato. R. Ferreira, Ricardo. F. Fornazier, Vanderlei. A. Varisi, **Ana Paula**, Angela. P. Vitoria, Cristina. C. Rodriguez e Salete. A. Gaziol, os quais efetivamente contribuíram para a execução deste trabalho de tese em todas as ocasiões solicitadas, sempre com muita amizade e respeito.

A todos os funcionários do Departamento de Genética

Ao CNPq pela bolsa concedida

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	Xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Efeito tóxico do Cádmio.....	3
2.1 Importância do Arroz.....	8
2.2.1 Fitoquelatinas.....	9
2.2.2 Sistema Oxidante de Resposta.....	10
2.2.3 Superóxido Dismutase.....	13
2.2.4 Catalase.....	15
2.2.5 Glutathione Redutase.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Material e Condução Experimental.....	20
3.1.1 Alterações no Sistema Radicular.....	20
3.1.2 Alterações Bioquímicas.....	21
3.2 Cultivo das Plântulas	21
3.3 Extração de Proteínas	22
3.4 Determinação das Proteínas.....	22
3.5 Atividade da Catalase.....	23
3.8 Atividade da Glutathione Redutase.....	24
3.9 Análise Estatística.....	24
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	25

	Página
5 CONCLUSÃO.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do efeito do Cd em plantas

Figura 2. Esquema da via de limpeza de EAOs.

Figura 3. Esquema da reação catalizada pela SOD

Figura 4. Esquema da reação catalizada pela CAT

Figura 5 Esquema da reação catalizada pela GR no ciclo da Glutathione Ascorbate

Figura 6. Efeito do Cd no Crescimento Radicular de linhagens de arroz

Figura 7. Atividade específica de CAT e GR ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) em folhas e raízes de plântulas de arroz à diferentes concentrações de CdCl_2 tempo de tratamento (valores brutos)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de variância para médias de crescimento radicular de plântulas de linhagens de arroz.

Tabela 2. Médias de crescimento radicular de plântulas de linhagens de arroz.

Tabela 3. Regressão Polinomial para o efeito dos níveis de dosagem de CdCl_2 sobre o crescimento radicular de plântulas de linhagens de arroz.

Tabela 4. Análises de variância para atividades de CAT e GR

Tabela 5. Regressão polinomial para efeito dos níveis de dosagem de CdCl_2 e tempo de tratamento sobre as atividades enzimáticas de CAT e GR em folhas de plântulas de arroz da linhagem IAC-165.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4 – D = ácido diclorofenoxiacético

γ -Glu-Cys = gama-glutamilcisteína

$^1\text{O}_2$ = oxigênio "singlet"

a.a. = aminoácido

AA = ascorbato

APX = ascorbato peroxidase

BSA = soro albumina bovina

CAT = catalase

Cat1 = gene codificante da isoforma de catalase 1

Cat2 = gene codificante da isoforma de catalase 2

Cat3 = gene codificante da isoforma de catalase 3

Cd = cádmio

CdCl_2 = cloreto de cádmio

cDNA = DNA complementar

CdSO_4 = sulfato de cádmio

Cu = cobre

Cu/ZnSOD = cobre/zinco superóxido dismutase

d.d = deionizada

DHA = desidroascorbato

DHAR = desidroascorbato redutase

DTNB = 5,5"- ditiobis (2- ácido nitrobenzóico)

DTT = ditioneitol

EAOs = espécies ativas de oxigênio

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

FAD = flavina adenina dinucleotídeo

FADH = flavina adenina dinucleotídeo reduzida

Fe = ferro

Fd = Ferredoxina

FeCl₃ = cloreto férrico

Fe-SOD = ferro superóxido dismutase

GR = glutathione redutase

GSH = glutathione reduzida

GSSG = glutathione oxidada

K₃Fe(CN)₆ = ferricianeto de potássio

KCN = cianeto de potássio

MDA = malonaldeído

MDHAR = monodesidroascorbato redutase

Mn = manganês

MnSOD = manganês superóxido dismutase

NaCl = cloreto de sódio

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT = nitro blue tetrazolium

Ni = níquel

NO₃ = nitrato

O₂ = oxigênio molecular

O₂^{•-} = radical superóxido

O₂¹ = oxigênio "single"

.OH = radical hidroxila

PA = persulfato de amônia

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

Pb = chumbo

PCs = fitoquelatinas

POX = peroxidase

PSI = fotossistema I

PSII = fotossistema II

(p/v) = proporção peso/volume

PVPP = polivinil polipirrolidona

SH = grupo sulfidril

SOD = superóxido dismutase

TEMED = N, N, N', N'- tetrametilenodiamina

TRIS = Tris (hidroximetil)-Aminometano

Zn = zinco

RESPOSTA DE LINHAGENS DE ARROZ A EXPOSIÇÃO AO CÁDMIO

Autora: PATRÍCIA FELIPPE CARDOSO

Orientador: Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

Resumo

Existe uma grande preocupação com relação aos efeitos a longo prazo que muitos poluentes químicos possam ter sobre a saúde e o ambiente. Tal é o número de diferentes poluentes e a complexidade de suas interações que seus efeitos não podem ser prontamente definidos em programas de monitoramento que determinam a presença de poluentes no ambiente.

Recentemente, pesquisas identificaram um grupo de enzimas conhecidas coletivamente como proteínas antioxidantes, que são induzidas em resposta aos poluentes, como os metais pesados e parecem proteger as células contra os possíveis danos causados por estes agentes.

É possível que a análise da indução e acumulação de proteínas antioxidantes e/ou de defesa, possa fornecer um sistema biológico versátil de monitoramento dos efeitos da poluição.

E assim, o estudo da atividade enzimática poderá vir a se configurar como um critério de avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas.

Com esse propósito, foi desenvolvido um trabalho com o objetivo de estudar as alterações de crescimento e bioquímicas causadas pelo efeito do Cádmio (Cd) em arroz.

Experimentos foram montados utilizando 8 diferentes genótipos de arroz da espécie *Oryza sativa*: F222, IAC202, Caipó, J199, IAC165, J79, F133, F35 e mais duas espécies: Arg2 (*Oryza latifolia*) e *Oryza glumaepapulo* nos quais foram submetidas a diferentes concentrações de Cd em solução nutritiva (0mM, 0,05mM, 0,5mM) durante um período de 3 e 7 dias para avaliação do efeito desse metal pesado no comprimento do sistema radicular. Foi realizado um segundo ensaio utilizando a cultivar IAC165, submetida a diferentes concentrações de CdCl₂ (0mM, 0,01mM, 1,0mM). Nestas concentrações, coletas de folhas e raízes foram feitas em períodos de tratamentos constituídos de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72horas. Com relação ao crescimento radicular do 1º ensaio foram identificados três padrões de resposta: um primeiro, cuja resposta à menor dosagem (0,05 mM de CdCl₂) é significativa e esta se mantém na dosagem seguinte (0,5 mM); um segundo, onde também é significativa a resposta à menor dosagem, mas esta se intensifica significativamente com o aumento da dosagem e um terceiro, no qual as linhagens mostraram-se resistentes às dosagens testadas, não sendo afetadas em seu padrão de crescimento de raízes no tempo desse estudo.

O parâmetro bioquímico analisado no 2º ensaio foi relativo aos níveis de atividade de enzimas antioxidantes, como Catalase e Glutathione Redutase. que mostraram padrões semelhantes de resposta tanto para Catalase como para Glutathione Redutase, observando-se elevação das atividades dessas enzimas antioxidantes em folhas e raízes, sendo o aumento de atividade da Glutathione Redutase nas raízes altamente significativo, sugerindo que a síntese de Glutathione reduzida possa estar estimulada para subsequente síntese de fitoquelatinas.

RESPONSE OF RICE INBRED LINES TO CADMIUM EXPOSURE

Author: PATRÍCIA FELIPPE CARDOSO

Adviser: Prof. Dr. RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO

SUMMARY

The response of a group of rice genotypes to cadmium exposure was tested using the root growth as a parameter during the time length of the treatment. Three distinct response patterns were identified: a significant initial (0.01 mM) dosage effect, which was maintained with the increase of CdCl₂ concentration to 1 mM; a significant initial effect, which was intensified with the increase of CdCl₂ concentration, and a group of varieties resistant to the CdCl₂ concentration tested. Significant interactions between dosage and varieties were observed.

Enzymatic assays for catalase and glutathione reductase were also carried out for in plants exposed to CdCl_2 . Similar response patterns for both enzymes were observed. The activities of catalase and glutathione reductase in leaves and roots were increased and in the case of glutathione reductase in roots, such an increase was highly significant, suggesting that the synthesis of reduced glutathione may be stimulated for subsequent synthesis of phytochelatins.

1. INTRODUÇÃO

A crescente industrialização nas últimas décadas tem exposto animais e vegetais a muitos elementos químicos potencialmente tóxicos. Metais pesados representam o maior contaminante industrial de solos, plantas e animais no ecossistema (Ghoshroy et al., 1998).

Dentre os metais pesados, o Cádmio (Cd) é um dos elementos que tem despertado crescente interesse, uma vez que este metal tem sua concentração aumentada no ambiente devido a diversas atividades humanas, como a mineração, adubação com lodo de esgoto e efluentes industriais, fabricação de baterias automotivas, aplicações militares, aeroespaciais, estabilização de plástico e formulação de pigmentos, entre outros. Esse metal é translocado via cadeia alimentar, do solo para raízes, animais e o homem (Prada, 1995).

No homem, a exposição prolongada ao Cd provoca distúrbios renais, enfisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritrócitos e câncer (Ghosroy et al., 1998) Em plantas a presença do Cd pode diminuir o crescimento, reduzir a taxa de fotossíntese e provocar alterações tanto nas atividades enzimáticas quanto metabólicas, de maneira geral (Cobbet et al., 2000).

O Cd liberado no solo é facilmente absorvido pelas plantas e translocado para seus órgãos (Malan & Farrant, 1998). Assim, as plantas expostas a esse metal desenvolveram algumas adaptações em resposta a esta agressão como a formação de peptídeos ricos em cisteínas, conhecidos como fitoquelatinas. Além das fitoquelatinas, outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas

para conferir maior tolerância à exposição aos metais pesados envolve indução de um sistema antioxidante de defesa, que inclui componentes de baixa massa molecular tais como Glutathione, Ascorbato, Carotenóides e α -tocoferol e um sistema de enzimas antioxidantes capazes de remover, neutralizar radicais livres. Dentre estas enzimas antioxidantes destacam-se a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Redutase (GR), entre outros (Scandalios, 1993).

De acordo com Menche et al. (1994), o estudo da atividade enzimática serve como um critério de avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas. Assim, sabendo-se a via preferencial de desintoxicação deste metal em plantas pode-se eventualmente traçar estratégias, como por exemplo a manipulação de enzimas que possam condicionar tanto sensibilidade como tolerância a esse metal em diferentes cultivares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Efeito Tóxico do Cádmio (Cd)

Metais pesados representam o maior contaminante industrial de solos e plantas no ecossistema (Ghoshroy et al., 1998).

A designação “metais pesados” vem do peso específico destes elementos ser maior que 5g cm^{-3} , sendo também conhecidos como “elementos traço”, por serem naturalmente encontrados em concentrações de poucas partes por milhão (Mattiazzo-Prezotto, 1994). Durante a última década, o estudo da toxicidade de metais pesados em plantas tem atraído a atenção de muitos cientistas ambientalistas (Prasad, 1995).

O Cádmio (Cd) é o principal contaminante ambiental e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (Chen & Kao, 1995).

Descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco, este elemento químico pertence ao grupo IIB da tabela periódica, juntamente com o Zinco (Zn) e o Mercúrio (Hg) (Mattiazzo-Prezotto, 1994). Esta autora relata que nos dias atuais, a concentração de Cd na crosta terrestre varia entre $0,15$ e $0,20\text{mg Kg}^{-1}$ sendo o 67º metal em ordem de abundância.

O Cd tem sua concentração aumentada no ambiente devido as atividades humanas de mineração, adubação com lodo de esgoto e efluentes industriais contaminados (Page et al., 1972), fabricação de baterias de automóveis, aplicações militares, aeroespaciais, estabilização de plástico e formulação de pigmentos, entre outros (Prasad, 1995).

Diversos fatores do meio podem influenciar a absorção do Cd pela planta, como por exemplo: a concentração do metal no meio, pH e a espécie de planta (Brown & Beckett, 1985).

Este metal é facilmente absorvido pelo sistema radicular das plantas e translocado, via xilema, para a parte aérea, através da transpiração (Prasad, 1995). De acordo com Melo et al. (1997), o estágio de desenvolvimento da planta e o tempo de exposição ao metal pesado afetam a absorção e distribuição de Cd em diferentes partes do vegetal. Genótipos distintos de uma mesma espécie podem responder diferentemente quanto a capacidade de absorver e transportar metais pesados dentro da planta (Gabrielli et al., 1990).

A presença de Cd pode diminuir o crescimento, reduzir a taxa de fotossíntese e provocar alterações tanto enzimáticas quanto metabólicas (Gallego et al., 1996a). Isto ocorre devido a alterações provocadas por esse metal nas funções dos estômatos, transporte de elétrons, Ciclo de Calvin e desordens na estrutura dos grana e na síntese de clorofila (Barceló et al., 1988). O Cd também afeta a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (Kesseler & Brand, 1995).

Outro sintoma identificado por este metal em plantas é a clorose, provocado pela competição de Cd com o Fe por sítios de absorção na membrana plasmática (Siedlecka & Krupa, 1999). Este processo também foi verificado por Kuboi et al. (1987) que ao aplicarem Cd em soja e rabanete e observaram sintomas de clorose nas folhas destas cultivares.

Jorhem & Slanina (2000), realizaram um estudo comparativo do sistema de plantio tradicional e orgânico em centeio, cenoura e batata e não verificaram diferença significativa na concentração de metais pesados presentes nos dois sistemas. Segundo os autores, em um curto espaço de tempo, o manejo orgânico não necessariamente reduzirá o nível de Cd e outros metais pesados nos alimentos de origem vegetal.

Uma vez conhecida a toxicidade do Cd tanto em plantas quanto em animais (Ghoshroy et al., 1998), o acúmulo de Cd em certos tecidos da planta pode levar a uma rejeição comercial de certos cultivares (Völlegi-Lange & Wagner, 1996), além de se tornar risco à saúde humana (Wagner, 1998). Rauser (1995) relata que mais de 70% do Cd absorvido pelo homem tem origem na ingestão de vegetais. Cobbet et al. (2000), relatam que ao estudarem o efeito de Cd em tomate e feijão constataram um pequeno translocamento deste metal para os frutos.

Desta forma, as plantas funcionam como principal ponto de ligação entre metais pesados e o homem via cadeia alimentar ao homem (Galli et al., 1996), tornando-se necessário o estudo do efeito do Cd em plantas, uma vez que em animais a exposição prolongada de Cd provoca distúrbios renais e enfisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritrócitos e câncer (Ghosroy et al., 1998). Além disso, este metal pode se acumular no corpo humano com meia vida excedentes 10 anos (Salt et al., 1995).

Vários pesquisadores têm avaliado o efeito do Cd sobre a anatomia vegetal e a genética em muitas espécies de plantas. Das et al. (1997), observaram que em plantas expostas ao Cd, ocorre a inibição da divisão celular e alterações nos cromossomos. Este metal também pode se ligar a grupos SH de enzimas, inibindo sua atividade (Lagriffoul et al., 1998).

Em soja, o Cd afeta o crescimento e inibe a fotossíntese, também sendo verificada redução mais acentuada no crescimento das raízes do que na parte aérea (El-Shintinawy, 1999). Em *Amaranthus lividus* o Cd provoca alterações na estrutura da membrana e facilita a peroxidação lipídica (Bhattacharjee, 1998). Em milho tratado com Cd, constatou-se diminuição da massa fresca nas raízes (Galli et al., 1996). Resultados semelhantes foram obtidos por Lagriffoul et al. (1998) que trataram plantas de milho em solução nutritiva, com Cd e apresentaram diminuição da parte aérea e redução da biomassa.

Wojcik & Tukendorf (1999) trabalhando com milho, trigo e centeio verificaram que a presença do Cd causou inibição do crescimento radicular, diminuição da massa fresca e de conteúdo de água nas raízes e na parte aérea.

Em cevada foi observada redução da massa seca em raízes e na parte aérea (Boussama et al., 1999). Estes autores também detectaram que este metal teve efeito mais pronunciado sobre o desenvolvimento das raízes.

Lozano-Rodriguez et al. (1997) mostraram que a exposição de ervilha e milho provocou redução no comprimento das raízes e na parte aérea. Também observaram que nessas espécies, esse metal pesado encontra-se em maior concentração na região das raízes.

A translocação do Cd da raiz para a parte aérea tem sido estudada em várias espécies (Prasad, 1995). Em pepino Moreno-Casseles et al. (2000), detectaram o acúmulo do Cd em raízes, folhas, e caules e frutos desta planta. Este estudo indicou que o Cd não foi totalmente imobilizado na raiz, sendo translocado para a parte aérea e então para o fruto. Resultado semelhante foram obtidos por Reed et al. (1999), em *Panicum virgatum* que, verificaram o acúmulo deste metal em todas as partes da planta. Em feijão, além do Cd provocar a redução da massa fresca e da área foliar, também foi verificado o deslocamento deste metal das raízes para parte aérea (Leita et al., 1991).

Entretanto, em cenoura, foi verificado um acúmulo de Cd sem alterações na sua massa fresca e no seu conteúdo protéico (Di Toppi & Gabbrielli, 1999). Estes autores sugerem que a cenoura possivelmente possui um sistema de proteção contra o estresse provocado por este metal. Boussama et al. (1999) ao pesquisarem o efeito do estresse provocado por Cd em milho, verificaram que este metal é capaz de modificar a absorção e transporte de NO_3 , alterando a atividade da Nitrato Redutase e Glutamina Sintase duas enzimas essenciais para a síntese de aminoácidos (aa).

As plantas desenvolveram alguns mecanismos para reduzir a concentração de Cd livre no citossol das células, os quais incluem: a compartimentalização deste metal em estruturas sub celulares, exclusão e(ou)

diminuição do transporte através da membrana e a formação de peptídeos ricos em cisteínas, conhecidos como fitoquelatinas, que podem complexar esse metal (Lozano-Rodríguez et al., 1997).

Além das fitoquelatinas, outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas para tolerância à exposição aos metais pesados é a produção de um sistema oxidante de defesa, que inclui componentes de baixa massa molecular tais como glutathione e um sistema de enzimas antioxidantes capazes de remover, neutralizar ou limpar radicais livres e que inclui a Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione Redutase (Scandalios, 1993).

Figura1 Esquema do efeito do Cd em plantas

2.2 -Importância do Arroz

O gênero *Oryza* é composto de 22 espécies, sendo duas cultivadas. *O. glaberrima* sterid (2n=24) de origem africana e *O.sativa* L (2n=24) de origem asiática e encontrado em todo mundo (Krush, 1997). Dentro do sistema alimentar mundial, o arroz ocupa posição preponderante sendo que mais de um terço da população mundial depende do arroz como alimento básico (Silva, 1994).

O arroz constitui-se num dos componentes da dieta básica da população brasileira assumindo uma importância relevante nas ações sociais e governamentais de incentivo a seu cultivo, que visam assegurar os níveis de oferta e de consumo, estimados em 11,274 milhões de toneladas nos últimos dez anos (AGRIANUL, 1998).

Sabe-se hoje que o arroz é uma planta que acumula metais pesados naturalmente (Rubio et al., 1994). Estes autores relatam que a distribuição não é homogênea, sendo que a maior proporção permanece nas raízes. Em Taiwan, por exemplo, o Cd provocou sérios problemas em plantações de arroz, onde verificou-se seu acúmulo nas raízes dessa planta (Chen & Kao, 1995).

No Japão, pessoas que se alimentaram e beberam água de arroz que continham altas concentrações deste elemento, desenvolveram a doença chamada de itaí-itaí, caracterizada por apresentar problemas neurotóxicos e descalcificação óssea acentuada (Kuboi et al., 1987).

Shah & Dubey (1995), ao estudarem o efeito de Cd em arroz observaram que este metal provocou diminuição no crescimento das raízes e parte aérea, alterações na atividade de RNA, inibição das ribonucleases e concomitante alteração de suas isoformas.

Maiores informações de mecanismos de tolerância ao Cd e suas características de ação em plantas, poderão eventualmente permitir a utilização de métodos de manipulação do controle do conteúdo de Cd em diferentes cultivares agrícolas.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar as possíveis diferenças de natureza bioquímica e morfológicas provocados pelo Cd em plantas de arroz por determinação das alterações na atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione redutase e na morfológia das plantas, pelo estudo da inibição do crescimento radicular entre as diferentes cultivares.

2.2.1-Fitoquelatinas (PCs)

Em plantas a exposição ao metal pesado induz a formação de peptídeos ricos em cisteína, que são quimicamente caracterizados como poli(γ -glutamilcisteinil), com a estrutura geral $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ onde $n=2$ a 7, conhecidos como fitoquelatinas (PCs) (Howdem et al., 1995). Estes peptídeos são sintetizados pela fitoquelatila sintase (γ glutamilcisteína dipeptidiltranspeptidase), que transfere a γ -glutamilcisteína de uma molécula de Glutathione Reduzida (GSH) para o polímero de γ -glutamilcisteína (Grill et al., 1985). Prada (1995), relata que PCs podem diminuir a toxicidade citoplasmática através da complexação intracelular do metal pesado.

Zhu et al. (1999), sugerem que o aumento da concentração de PCs em raízes pode aliviar danos causados por Cd em plantas a solução aquosa. Resultados semelhantes foram observados por Grill et al. (1985), que detectaram que várias espécies de planta que na presença de metais pesados são capazes de sintetizar fitoquelatinas. Entretanto, Leopold et al. (1999), ressaltam que apenas alguns metais pesados podem formar complexos com fitoquelatinas.

Muitos estudos têm relacionado a síntese de PCs em plantas à presença de metais pesados.

Grill et al. (1985) consideram dentre vários metais pesados o Cd como principal indutor da síntese de fitoquelatinas em plantas. De acordo com Tukendorf et al. (1997) plantas de arroz e trigo ao serem expostas a metais pesados como Cd, Pb e Zn passam a produzir fitoquelatinas. Também foi constatado neste

estudo, um acúmulo inicial de PCs que rapidamente diminuía com o aumento do tempo de exposição ao Cd. Leopold et al. (1997), ao estudarem o efeito de Cu e Cd em culturas de tomate e *Silene vulgares* verificaram a formação de PCs como uma tentativa de desintoxicação deste metais no citoplasma.

Em *Lúpus luteis*, Gwozdz et al. (1997), detectaram que o Pb e o Cd estimulam a formação de PCs. Em feijão o Cd induz a síntese de fitoquelatinas em folhas, caules e raízes (Leita et al., 1991). Em plantas de tabaco expostas ao Cd ocorre uma diminuição da concentração de GSH, estas plantas passam a sintetizar PCs. (Vögeli-Lange & Wagner 1996). Em tomate, a ação de metais pesados altera a atividade de PCs tanto em raízes como na parte aérea da planta, sendo sugerido que a síntese de PC pode ser regulada apenas pela exposição ao metal pesado (Chen et al., 1997).

2.2.2- Sistema Oxidante de Resposta

O acúmulo de oxigênio molecular (O_2) na atmosfera da Terra permitiu a evolução de organismos aeróbios que utilizam o O_2 comoceptor final de elétrons. O O_2 é pouco reativo, mas tem a capacidade de assumir estados excitados reativos como radicais livres e derivados (Scandalios, 1993). Este autor relata que a transformação de O_2 a água, ocorre pela utilização de 4 elétrons em um ciclo em que são originadas espécies intermediárias. Estas Espécies Ativas de Oxigênio (EAOs) incluem o Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), Peróxido Hidrogênio (H_2O_2), Radical Hidroxila ($\cdot OH$) e Oxigênio "single" (O_2^1). Em condições de estresse estas EAO, podem se acumular nos tecidos resultando na alteração da atividade de enzimas como SOD, CAT e POX (Creissen et al., 1994), as quais são responsáveis pela proteção antioxidante e preservação da integridade da membrana (Lagriffoul et al., 1998).

Os radicais Superóxidos são produzidos pela reação do oxigênio molecular no fotossistema na reação Meyer. Estes $O_2^{\bullet-}$ são rapidamente

convertidos a H_2O_2 pela SOD que está associada ao tilacóide (Allen et al., 1995). O H_2O_2 pode ser então convertido pela catalase ou pela ascorbato peroxidase a $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Fadzilhah et al., 1996).

O H_2O_2 produzido pela glicolato peroxidase é degradado pela CAT principalmente nos peroxissomos. (Scandalios, 1990; Azevedo et al., 1998).

Segundo Foyer et al. (1994), a catalase está ausente no cloroplasto e a degradação do H_2O_2 nos cloroplastos é feita pela ascorbato peroxidase (APX) associada à membrana do tilacóide. As moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 que escapam da destruição no tilacóide são destruídos no estroma pela SOD e APX. Radicais monodesidroascorbato produzidos pela APX são convertidos a ascorbato (AsA) via ferredoxina (Fd) ou pela enzima Monodesidroascorbato Redutase (MDHAR).

Uma outra alternativa da reação com APX é a formação de ácido ascórbico e ácido desidroascorbato, que podem ser convertidos a ascorbato através da enzima Desidroascorbato Redutase (DHAR), que utiliza a GSH como doador de elétrons. A subsequente regeneração da GSH requer a participação de GR e NADPH (Allen et al., 1995). Essas EAOs são altamente reativas e citotóxicas para todos os organismos, uma vez que as EAOs podem reagir com ácidos graxos insaturados das membranas e alterar a peroxidação lipídica.

A produção de EAO em plantas é estimulada durante a infecção por patógenos e processos fotossintéticos induzidos durante condições abióticas como frio, seca e estresses provocado por ozônio e metais pesados (Bowler et al., 1994).

Stroinski & Kozłowska (1997) ao estudarem o efeito do Cd em plantas verificaram que este metal é capaz de induzir o estresse oxidativo. O Cd ao se ligar a componentes fosfolipídicos da membrana, pode alterar o padrão das interações entre lipídeos e proteínas. Parece ser dessa maneira que o Cd diminui o funcionamento e organização da membrana (Ouariti et al., 1997), contribuindo para a formação de EAO e conseqüente peroxidação dos lipídios que a constituem. De fato, o aumento do estresse por metais pesados foi proporcional ao nível de malonaldeído (MDA), indicando a ocorrência de peroxidação lipídica (Bhattacharjee, 1998).

As células fotossintéticas são propensas ao estresse oxidativo pois elas contêm pigmentos fotossensíveis que tanto formam quanto consomem oxigênio (Foyer et al., 1994). Estudos recentes sugerem que o aumento da radiação UV-B altera a permeabilidade da membrana, aumentando a peroxidase lipídica induzindo ao aumento dos níveis de EAO (Dai et al., 1997). Estes autores ao estudarem o efeito de UV-B em arroz, observaram um aumento inicial de enzimas antioxidantes SOD e CAT. Porém, detectaram que a longa exposição ao UV-B provocava declínio dos componentes enzimáticos e não enzimáticos nesta planta.

Em ambientes sob condições de baixas temperaturas, o aumento da produção das EAO pode ocorrer devido à diminuição das reações de biossíntese ou por causa da diminuição da concentração de ATP (Scebblá et al., 1998).

De acordo com Foyer et al. (1994) a capacidade de cada reação ocorrer em condições não estressantes é debatida mas, geralmente, acreditasse que a produção de EAOs é uma consequência inerente ao funcionamento no cloroplasto e/ou na mitocôndria.

Assim, o balanço entre a formação e detoxificação das EAO é crítico para a sobrevivência da célula em condições de estresse (Yan et al., 1996).

Figura 2 Esquema da via de limpeza de EAOs

2.2.3-Superóxido Dismutase (SOD)

A Superóxido Dismutase (EC 1.15.1.1) foi isolada em eritrócidos bovinos por Man e Kalwm em 1938. Porém, a função desta enzima somente foi descrita em 1969 por Mc Corde e Fridovick (Alscher et al., 1997). Esta enzima está presente em organismos aeróbios e anaeróbios facultativos.

A Superóxido Dismutase é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EAO nas células (Alscher et al., 1997). Sob essa denominação agrupam-se um grupo de metaloenzimas que catalisam a dismutação de radicais livres de oxigênio $O_2^{\bullet-}$, a H_2O_2 (Scandalios, 1993).

Como SOD podem ser identificados em três grupos de metaloenzimas classificados, a partir da presença do metal no sítio ativo; Cobre-Zinco (Cu/ZnSOD), Manganês (MnSOD) e Ferro (FeSOD) (Bowler, 1994). De acordo com esse autor, FeSOD é uma enzima dimérica formada por 2 sub-unidades idênticas e está localizada no cloroplasto, MnSOD é uma enzima que possui estrutura similar a FeSOD sendo observada na matriz mitocondrial. Ambas são encontradas em procariontes e eucariontes. Entretanto Cu/ZnSOD está presente geralmente no citoplasma de células eucarióticas e no cloroplasto.

A FeSOD e a MnSOD parecem ser bastante similaridades quanto às estruturas primária e tridimensional e em outras propriedades físico-químicas. A Cu/ZnSOD não apresenta tal similaridade. Assim, presume-se que a FeSOD e MnSOD podem ter um ancestral comum, sendo que a Cu/Zn-SOD possivelmente evoluiu independentemente (Chen & Liu, 1996).

Segundo Van Camp et al. (1996), essas isoenzimas de SOD apresentam alto grau de homologia entre as diferentes espécies de plantas. Contudo o número e tipo destas isoenzimas varia de planta para planta (Scandalios, 1993). A Cu/ZnSOD foi encontrada no citossol de arroz (Pan & Yau, 1991), nas mitocôndrias de girassol (Corpas et al., 1991) e no cloroplasto de *Arabidopsis* (Kliebenstein et al., 1998). MnSOD foi encontrada em mitocôndria de aveia (Sehmer & Dizengremel, 1998) e em feijão (Corpas et al., 1991). A FeSOD é

rara sendo, recentemente encontrada em plantas como *Arabidopsis* (Kliebenstein et al., 1998)

Figura 3. SOD: catalisa a reação acima, eliminando EAO e formando H_2O_2

Kliebenstein et al. (1998), relatam que vários fatores ambientais e biológicos levam a formação de superóxido dentro do tecido vegetal da planta. Estes autores comentam que as plantas passam a induzir a síntese da enzima SOD como mecanismo de defesa.

Sob efeito da seca além da ou redução da taxa de fotossíntese e transpiração em ervilha, também ocorreu um aumento da atividade da SOD (Moran et al., 1994). Resultado semelhante foi obtido por Li et al. (1998), ao submeter cultivares de milho a seca. Sendo sugerido que a tolerância ao estresse hídrico deve-se ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

Em trigo foi observado um aumento da atividade da SOD, a qual foi correlacionada à presença do herbicida paraquat que tem um efeito citotóxico via produção de EAO (Kraus et al., 1995). Estes autores, ao estudarem o efeito do paraquat em trigo, observaram o aumento da atividade da SOD correlacionado com a presença deste herbicida.

Em cevada, o aumento da atividade de SOD parece proteger a planta contra injúrias provocadas pelo ozônio (Azevedo et al., 1998). Em plantas de arroz expostas ao estresse salino é observado um aumento inicial da atividade da MnSOD e Cu/ZnSOD, entretanto com aumento do tempo de exposição a esse tipo de estresse ocorreu uma diminuição da atividades destas enzimas. (Fadzilla et al., 1997). Em girassol os metais Fe e Cd foram capazes de diminuir a atividade da SOD (Gallego et al., 1996). Resultados semelhantes foram obtidos em Sung

(1996), ao tratar *Persicaria vulgaris* submetida ao Cd, Cu, Zn e Al onde ocorreu uma diminuição na atividade de SOD em folhas e no caule. Por outro lado, estes autores observaram a alta manutenção da atividade de SOD em raízes. Stroinski & Kozlows (1997), ao pesquisarem o efeito de Cd em batata, verificaram que esse metal foi capaz de inibir a atividade da SOD durante a primeira hora de tratamento de estresse. Folhas e raízes de feijão submetidas à exposição ao Cd também apresentaram alterações na atividade de SOD (Alscher et al., 1997).

Resultados semelhantes foram obtidos por Battacharjee (1998) ao pesquisar o efeito do Cd em *Amaranthus lividus*, verificando uma diminuição da atividade da SOD, com conseqüente acúmulo de superóxido, o que contribuiu para alterar a integridade da membrana.

2.2.4-Catalase

As Catalases (1.11.1.6), são hemoproteínas tetraméricas. Descrita em 1901 por Loew (Frugololi et al., 1996), esta enzima tem a função de catalisar a produção de moléculas de H_2O_2 formadas durante a β -oxidação de ácidos graxos e em peroxissomos de folhas verdes durante a fotorrespiração, pela transformação do glicolato em glioxilato (Havir, 1989). Existem três tipos distintos de isoenzimas de catalase identificadas (Cat1, Cat2, Cat3) (Scandalios, 1993). Em plantas a CAT-1 é responsável por 80% da atividade total desta enzima e está localizada no interior dos peroxissomos, sendo responsável pela transformação do H_2O_2 produzido na fotorrespiração em H_2O e O_2 (Willekens et al., 1995). A Cat 2 é encontrada nos tecidos vasculares. A Cat3 está localizada no mesófilo das células (Scandalios, 1990).

Scandalios (1994), sugere que as isoformas de CAT podem ser reguladas no tempo e no espaço em resposta a diferenças de luz. Este fato foi confirmado por Lall et al. (1998) que ao submeterem *Impatiens flanaganii* a alta intensidade de luz detectaram o aumento da atividade da CAT.

De acordo com Foyer (1994) a CAT torna-se essencial para a destruição de H_2O_2 formado na fotorrespiração de plantas C_3 . Em plantas C_4 onde a fotorrespiração é reduzida, existe reduzida atividade de CAT

Figura 4 CAT catalisa a transformação de H_2O_2 em O_2

Segundo Willekens et al. (1995), a ausência da atividade da CAT em plantas, as tornam mais sensíveis a uma variedade de estresses.

Em *Calathea* e *Spathiphyllum* submetidas ao frio foi verificado um aumento da atividade da CAT e da SOD durante as 4 primeiras semanas de aclimação (Van Huylenbroeck et al., 1998).

De acordo com esses autores o aumento da atividade destas enzimas seria uma necessidade adaptativa ao aumento da concentração de H_2O_2 durante esse período. Em contrapartida em arroz, o frio diminuiu a atividade da CAT e GR, além de alterar a permeabilidade da membrana (Fadzilla et al., 1996).

Shaw & Rout (1997), com objetivo de estudar o efeito de metais pesados em feijão, submeteram esta planta a Hg e Cd separadamente. Estes autores verificaram que os dois metais aumentaram significativamente o nível de clorose na planta e detectaram que o Cd inibiu a atividade da CAT. Resultado semelhante foi obtido por Bhattacharjee et al. (1998), que verificaram em arroz a diminuição da atividade da CAT na presença deste metal.

Folhas de ervilha tratadas com Cd apresentavam diminuição da atividade da CAT enquanto que a atividade da SOD aumentou (Dalurzo et al., 1997). Usha & Mukherji (1997), por outro lado, constataram como efeito Cd em *Vigna radiata* e aumento de atividade da CAT mas, foi observado concomitantemente, redução da atividade fotossintética nesta planta.

2.2.5-Glutationa Redutase (GR)

Glutationa, γ -glutamil- γ cistenil-glicina (GSH), é o componente tiol mais abundante em plantas, sendo considerado essencial para células de plantas e animais contra uma variedade de estresse oxidativos, incluindo poluição do ar, calor, frio e seca (Lea et al., 1998). Fadzillah et al. (1996), verificaram que em plantas de arroz submetidas ao frio ocorreu um aumento da concentração de H_2O_2 e mudanças na razão de GSH para GSSG em seus tecidos.

A glutatona tem papel importante como antioxidante e na síntese de PCs (Gallego et al., 1996b). Singhal et al. (1987), sugerem a GSH como a primeira defesa contra a exposição ao Cd. O papel da GSH na tolerância ao metal pesado foi pesquisado por Gallego et al. (1996b), que ao tratarem plantas de girassol com Cd observaram a diminuição do nível de GSH e a indução de PCs, 3 dias após o início do tratamentos.

Segundo Zhu et al. (1999), a alta concentração de GSH em raízes de plantas tem contribuído para aumentar a tolerância ao Cd. Resultados semelhantes foram obtidos por Chaoui et al. (1997), ao estudarem a ação do Cd em plantas de *Indian mustard* onde verificaram que na presença desse metal, a razão da enzima GS na raiz diminuía e atribuíram este fato à biossíntese de PCs. Em arroz o efeito positivo da ação da GSH é verificado, sendo este mediante a síntese de fitoquelatinas o que conduziu a uma redução do nível de Cd livre nas raízes desta planta (Chen & Kao 1995). Meuwly et al. (1995), verificaram a redução da atividade da GSH em milho submetido ao Cd.

A GSH pode controlar a quantidade de Cd livre no citossol além de promover a remoção do peróxido de hidrogênio no cloroplasto (El-Shintinawy, 1999). De acordo com Creissen et al. (1994), para realização destas funções, a GSH deve estar na sua forma reduzida. Essa oxi-redução da glutatona GSSG a GSH é catalisada pela Glutationa Redutase (GR), na presença da NADPH.

Shalata & Tal (1998), mostraram o efeito do estresse salino em tomate e observaram uma alta atividade da GR. Segundo estes autores, este efeito deve-

se a uma alta concentração da atividade de GSH, que seria utilizada pela DHA para formar ascorbato.

Desta forma a GR tem importante papel na proteção do cloroplasto contra danos oxidativos mantendo a razão entre os níveis de GSH e GSSG (Gallego et al., 1996).

Figura 5 Atividade específica da GR no ciclo da Glutathiona Ascorbato

A Glutathiona Redutase (GR), é amplamente distribuída em compartimentos das células eucariontes (Vallejos, 1983). Em folhas de ervilha encontra-se presente no cloroplasto, mitocôndrias e compartimentos celulares (Edwards et al., 1990). Essa enzima contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons, que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathiona oxidada (GSSG) para a Glutathiona Reduzida (GR) (Creissen et al., 1994).

O gene codificante para GR de ervilha e tabaco foi clonado e sequenciado (Foyer, 1997) e mais recentemente, clones de cDNA têm sido obtidos a partir de enzimas humanas, o que confirmou a homologia na sequência de a.a de seres humanos e plantas (Tutic et al., 1990). Entretanto, dificuldades na purificação e sequenciamento em plantas superiores, vinham até recentemente impedindo algumas comparações diretas entre a sequência de a.a. de uma GR de planta e de outros organismos (Creissen et al., 1994).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas para investigar as respostas desta enzima a diferentes fatores de estresses.

Boo & Jung (1999), investigaram o efeito do estresse hídrico em arroz, detectaram diminuição de várias enzimas enquanto a GR mostrou um aumento de atividade. Assim foi sugerido que a GR seria uma primeira resposta de defesa da planta ao estresse hídrico. A radiação UV-B em folhas de trigo determina o aumento da atividade da GR e diminuição do nível de GSSG como parte da adaptação evolutiva. (Barabás et al., 1998).

Romero-Puertas et al. (1999) ao estudarem o efeito de Cd em ervilha verificaram o aumento da concentração de H_2O_2 na planta, associado a um aumento da atividade da GR. Stroinski & Kozlows (1997) ao pesquisarem o efeito de Cd em tubérculo de batata, verificaram que a indução de mudanças na atividade da GR depende da concentração do metal fornecido à planta. Resultados semelhantes foram obtidos por Schicker & Caspi (1999), em plantas do gênero *Alyssum* na qual verificaram que altas concentrações do Cd diminuíam a atividade da GR. Em cevada, verificou-se que Cd provocou uma inibição significativa da atividade da GR (Patra & Panda, 1998). Porém, nesse trabalho, foi observado também um aumento da concentração de fitoquelatinas. Resultados similares foram obtidos por Chen & Kao (1995), em raízes de arroz, onde foi verificado que a GSH regula a diminuição da ação do Cd sugerindo, a participação da GSH na síntese de fitoquelatinas.

3. Material e Métodos

3.1- Material e Condução Experimental

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

3.1.1- Alterações no Sistema Radicular Radicular

Com o objetivo de se estudar as alterações causadas pelo efeito do Cádmio (Cd) em arroz foi montado um ensaio utilizando 8 diferentes genótipos de arroz da espécie *Oryza sativa*: F222, IAC202, Caipó, J199, IAC165, J79, F133, F35 e mais duas espécies: Arg2(*Oryza latifolia*) e *Oryza glumaepapulo* no qual foram submetidas a diferentes concentrações de Cd em solução nutritiva (0mM, 0.05mM, 0.5mM) utilizando –se o crescimento radicular como indicador.

3.1.2- Alterações Bioquímicas

Com o objetivo de se estudar as alterações bioquímicas causadas pelo efeito do Cádmio (cd) em arroz, foi ontado um segundo ensaio utilizando – se a cultivar IAC 165 submetida a diferentes concentrações de CdCl_2 (0mM, 0.1mM, 1.0mM).

3.2-Cultivo das Plântulas

As sementes das linhagens de arroz IAC165 foram colocadas para germinar em papel de germinação umedecido e parcialmente imerso em água destilada em estufa em temperatura de 32°C. Uma semana após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,7 litros contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnom, 1950).

Após o período de uma semana uma nova solução nutritiva idêntica à descrita anteriormente foi colocada com doses crescentes de CdCl_2 (0mM), (0.05mM), (0.5 mM).

As raízes foram lavadas em água deionizada (d.d) durante aproximadamente 1 minuto visando remover os ions sendo estão secas com papel toalha.

As sementes das linhagens de arroz IAC 165 foram colocadas para germinar em papel de greminação umedecido e parcialmente imerso em água destilada em estufa a 32°C. Uma semana após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,7 litros contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnom, 1950).

Após o período de uma semana uma nova solução idêntica à descrita anteriormente foi colocada com doses crescentes de CdCl_2 (0mM), (0.01mM), (1.0mM).

Decorridos os períodos de 0,3,6,9,12,15,18,21,24,30,36,42,48,54,60,66,72 horas de exposição das plântulas ao Cd grupos de plântulas foram coletadas e divididas em raiz e parte aérea.

As raízes foram lavadas em água deionizada (d.d) durante aproximadamente 1minuto visando remover os ions sendo então secas com papel toalha. As amostras foram congeladas em nitrogênio e guardadas em freezer a - 80° C.

3.3-Extração das Proteínas

A extração enzimática foi feita de folhas e raízes. Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) (4 g : 1 ml) contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% (p/v) de PVPP. O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 min à 4°C, utilizando-se uma centrífuga Beckmam modelo J2-MC.

O sobrenadante foi coletado, dividido em alíquotas e congelados à - 80°C, sendo utilizadas para os ensaios das atividades enzimáticas.

3.4-Determinação de Proteínas

A concentração de proteína foi determinada em espectrofometria à 595 nm como descrito por Bradford (1976), utilizando-se o kit da Bio-Rad e BSA como padrão.

3.5-Atividade da catalase

A atividade de CAT foi avaliada por dois métodos: Espectrofotometria e PAGE.

A atividade de SOD e suas isoformas, em ambos os tecidos de arroz, foram determinadas em PAGE não-desnaturante , como descrito por Azevedo et al., 1998.

3.6-Atividade da Glutathione Redutase

A atividade de GR foi determinada pelo método espectrofotométrico, como descrito por Azevedo et al. (1998). A atividade enzimática foi determinada calorimetricamente a 30°C em uma solução consistindo de 1 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB, 1 mM de GSSG e 0,1 mM de NADPH. A reação foi iniciada com a adição de 50µl de extrato vegetal. A taxa de redução da GSSG foi monitorada pelo aumento, à cada segundo, na absorbância a 412 nm por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em µmol/min/mg prot.

3.7-Análise Estatística

Os experimentos foram repetidos três repetições por tratamento. Os dados foram estatisticamente analisados em cada experimento e os resultados expressos pelo teste de Duncan para médias de linhagens e Regressão Polinomial para efeito de dosagem.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do metal pesado Cd em plantas tem sido investigado em detalhes para alguns determinados aspectos do metabolismo celular, tais como biossíntese de clorofila (Van Assche & Clijsters, 1990) enzimas do Ciclo de Calvin (Van Assche & Clijsters, 1990), enzimas do metabolismo do nitrogênio (Boussama et al., 1999a,b; Kumar & Dubey, 1999), assim como enzimas antioxidantes (Vitória et al., 2001) e da via de assimilação de sulfato (Lee & Leustek, 1999). Contudo, estudos relacionados a resposta que diferentes variedades de uma mesma espécie possam produzir com relação ao crescimento na presença do metal, tem sido pouco investigado. Apesar da resposta antioxidante ter sido estudada pela análise de enzimas em algumas espécies como soja (Ferreira, 2000), rabanete (Vitória et al., 2001) e cana-de-açúcar (Fornazier, 2000), em arroz tal mecanismo de defesa ainda é desconhecido.

Como pode ser observado na Tabela 1, os ensaios do presente trabalho evidenciaram diferenças significativas entre as respostas das linhagens ao Cd (prob.>F=0,0121), além de intenso efeito de dosagem (prob.>F=>0,00001) e de tempo (prob.>F=0,0082). Dentre as interações desses fatores, foi significativa apenas aquela verificada entre linhagem e dosagem (prob.>F=0,0004). Para as análises estatísticas os dados foram transformados segundo a expressão $(x+5)^{1/2}$.

Nos tratamentos sem exposição ao Cd (Tabela 2A), destacou-se o crescimento das linhagens Caiapó e IAC-202 e como a de menor crescimento no experimento, a linhagem ARG-2. Na dosagem 0,05 mM de CdCl₂ (Tabela 2B), a linhagem Caiapó continuou a apresentar maior crescimento que as demais.

Ao contrário dessa, a linhagem IAC-202, mostrou-se altamente sensível a esse metal, passando a apresentar a maior perda de comprimento da raiz em função da exposição ao Cd. Na dosagem 0,5 mM (Tabela 2C) entretanto, constatou-se nova alteração significativa nesse padrão destacando-se como menos sensível a linhagem F-133, seguida pela ARG-2, que anteriormente aparecera respectivamente como a de menor desenvolvimento (sem exposição ao Cd; Tabela 2A) e grande perda de comprimento radicular (na dosagem 0,05 mM, Tabela 2B). Na maior dosagem (Tabela 2C), a linhagem que se destacou como mais suscetível foi a F-35, seguida pela Caiapó, que em menor dosagem (0,05 mM, Tabela 2B) e sem exposição ao Cd apresentou o maior desenvolvimento.

A Tabela 2 evidencia ainda o comportamento particularmente interessante de algumas linhagens nos diferentes tratamentos, como por exemplo a Caiapó, IAC-202, ARG-2 e F-133. Com relação à linhagem Caiapó, observou-se que seu crescimento foi superior ao das outras no tratamento controle (sem exposição ao Cd), mantendo o mesmo padrão de comportamento quando submetida a crescimento em 0,05 mM de CdCl_2 . Já a IAC-202, que apresentou desempenho similar ao da Caiapó quando submetida a crescimento livre de CdCl_2 , apresentou intensa inibição em seu crescimento radicular quando exposta a pequena dosagem (0,05 mM), em oposição ao comportamento da Caiapó, o que indicou que sua resposta ao Cd é rápida, mesmo em baixas concentrações desse metal. Quando ambas linhagens foram submetidas a 0,5 mM de CdCl_2 , a Caiapó, que em 0,05 mM ainda permanecia com o maior nível de resistência entre o grupo de linhagens analisadas, mostrou-se altamente sensível ao metal, confirmando o comportamento diferente da IAC-202 quanto à resposta ao Cd. Por outro lado, a ARG-2 que no controle, apresentou a menor média de crescimento radicular, com o aumento da concentração sucessivamente para 0,05 e 0,5 mM, mostrou-se altamente resistente, em relação ao grupo de linhagens estudadas, sendo inferior na concentração máxima de Cd, apenas à F-133.

Desta forma, a dose 0,5 mM aparentemente teve um efeito de estimular o crescimento radicular na linhagem ARG-2; sendo que a F-133 foi sendo progressivamente estimulada em seu desenvolvimento radicular tanto pela exposição inicial como pelo aumento da dosagem de Cd. As demais linhagens tenderam a manter seu nível de desempenho relativo entre as dosagens testadas (Tabela 2).

Cabe observar que as concentrações de CdCl_2 selecionadas para esse experimento apresentaram uma relação de 1:10 (0,05 e 0,5 mM), e assim, os resultados observados no presente trabalho permitem questionar se concentrações intermediárias poderiam caracterizar com maior precisão o efeito desse metal sobre cada uma das linhagens estudadas. Tal sugestão é reforçada pelas análises do efeito das dosagens de Cd em cada linhagem, especificamente naquelas em que as médias de crescimento de raiz ajustaram-se a uma equação quadrática, porque essas equações permitiram o cálculo das dosagens de 0,27 e 0,28 mM de CdCl_2 como aquelas em que deveria ocorrer a maior inibição do crescimento da raiz no intervalo de dosagens testado (Tabela 3 e Fig. 1). A escolha das dosagens empregadas no presente trabalho, entretanto, foi baseada em dados obtidos para outras espécies, como por exemplo, cana-de-açúcar, para a qual a concentração de 0,01 mM de Cd estimulou o crescimento de calos e concentrações apenas um pouco mais altas, apresentaram um efeito estimulante sobre o crescimento de plântulas (Fornazier, 2000). No mesmo sentido, em *Aspergillus nidulans* observou-se que com pequenas dosagens de CdCl_2 (0,05 mM) houve estímulo ao desenvolvimento da massa micelial. Outro fator que poderia elevar a precisão dos dados observados seria a utilização da massa radicular seca como indicador do efeito do Cd sobre desenvolvimento da raiz e não apenas o crescimento linear da maior das raízes.

Embora os dados do efeito de dosagem sobre o crescimento radicular das linhagens consideradas em conjunto se ajustem a uma regressão quadrática ($P > 0,00006$; equação na Tabela 3; gráfico não apresentado), isso não reflete o comportamento de cada linhagem individualmente, face às diferentes dosagens de CdCl_2 . Enquanto as médias de crescimento radicular das linhagens F-22, J-79 e IAC-202 ajustaram-se significativamente a regressão quadrática, as linhagens Caiapó, F-35 e IAC-165 apresentaram ajuste significativo a regressão linear. Já as linhagens ARG-2, F-133, J-199 e Ory-20, não tiveram seus dados ajustados significativamente a regressão linear ou quadrática (Tabela 3 e Fig. 1). Desta forma, no conjunto de linhagens estudadas, evidenciaram-se três padrões característicos de respostas ao Cd, a saber, 1- inibição significativa do crescimento radicular por pequena dosagem (0,05 mM), padrão este mantido para a dosagem superior (0,5 mM) nas linhagens que tiveram ajuste a regressão quadrática; 2- inibição significativa e proporcional ao aumento da dosagem, nas linhagens cujos dados tiveram ajuste a regressão linear e finalmente, 3- ausência de resposta às dosagens testadas de Cd, nas linhagens que não tiveram seu padrão de crescimento significativamente alterado nas condições do presente experimento.

O crescimento linear das raízes ao longo do tempo de exposição ao Cd (4 e 7 dias) foi significativo ($\text{prob.} > F = 0,0082$; Tabela 1), sendo que os dados ajustaram-se a uma regressão linear ($\text{prob.} > F = 0,0082$; $R^2 = 1,00$) e indicaram que apesar da presença de dosagens crescentes de Cd, ainda se verificou, em média algum crescimento, uma vez que a 4 dias de tratamento, o crescimento médio foi de 0,94 cm e a 7 dias, 1,84 cm. Por outro lado, nas condições do presente ensaio, não foram significativas as interações de tempo e dosagem, nem de linhagem e tempo, o que impede maior detalhamento do efeito desses fatores no presente trabalho.

Foram conduzidos separadamente ensaios bioquímicos das atividades enzimáticas de CAT e GR para folhas e para raízes de plântulas de arroz da linhagem IAC-165, submetidas a diferentes concentrações de CdCl_2 (0 mM, 0,1 mM e 1 mM). Os valores obtidos foram agrupados em classes por tempo médio de tratamento 7,5; 22,5, 39 e 63 h. A atividade de CAT em folhas (Tabela 4A) mostrou-se significativamente alterada em função da exposição ao Cd (prob.>F=0,00001), mas não houve alterações significativas em função do tempo de tratamento (prob.>F=0,127), o que indicou que a resposta obtida nas primeiras 7,5 h de tempo médio de tratamento, se manteve ao longo dos demais tempos de tratamento estudados (Tabela 5 e Fig. 2). Os valores da atividade de CAT em folhas para os níveis de dosagem de CdCl_2 , por sua vez, ajustaram-se a uma regressão quadrática, indicando que nas condições do presente experimento, a atividade máxima de CAT em folhas deve ocorrer por exposição ao CdCl_2 na concentração de 0,6 mM, atingindo atividade correspondente a $18,81 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$ (Tabela 5 e Fig. 2). Dessa forma, obteve-se indicações de que seria interessante introduzir dosagens, intermediárias às testadas no presente trabalho, para melhor caracterizar o efeito do Cd sobre a atividade de CAT em folhas de plântulas de arroz. Quanto ao efeito das dosagens de CdCl_2 sobre a atividade de CAT em raízes, este não foi significativo (prob.>F=0,17, Tabela 4B). Por outro lado, o tempo de tratamento mostrou-se significativo (prob.>F=0,0047, Tabela 4B) e os valores de atividade ajustaram-se a uma regressão cúbica, indicando que houve variações significativas de atividades entre todos os tempos testados (Tabela 5 e Fig. 2), ou seja, tanto o decréscimo de atividade de CAT verificado entre a classe com tempo médio de tratamento de 7,5 h e a classe de 22,5 h foi significativo, quanto foi significativa a elevação subsequente, entre essa última classe e a seguinte, de 39 h. E ainda, foi significativa a próxima elevação de atividade, verificada entre as classes 39 e 63 h de tratamento, cabendo enfatizar que este se caracterizou como um padrão de atividade de CAT em raízes dessa linhagem de arroz, o qual não foi afetado por exposição ao Cd nas dosagens testadas, nas condições do presente experimento.

A atividade de GR, por sua vez, tanto em folhas quanto em raízes foi significativamente afetada tanto pelas dosagens de CdCl_2 como pelos tempos de tratamento (Tabela 4C e 4D). Nas folhas, o significativo efeito de dosagens ($\text{prob.} > F = 0,00001$) gerou dados que se ajustaram também significativamente a uma regressão quadrática ($\text{prob.} > F = 0,00001$). Os dados associados ao ponto de inflexão dessa curva (Tabela 5 e Fig. 2) indicaram porém, que a uma dosagem de 0,58 mM de CdCl_2 , a atividade de GR em folhas atingiria o valor de $3,09 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$, sugerindo, como constatado para CAT em folhas, que seria interessante introduzir dosagens intermediárias às do presente estudo, para melhor caracterizar a resposta ao Cd em folhas de plântulas de arroz, também para esse indicador do efeito do Cd (atividade de GR). Cabe salientar também, que essa dosagem (0,58 mM) apresentou-se extremamente próxima àquela calculada como correspondente à maior atividade de CAT (0,6 mM) em folhas, reforçando a indicação de que seja aproximadamente essa concentração aquela que provoque resposta enzimática mais intensa ao Cd nessas plântulas, e portanto o ponto de maior capacidade de defesa desses organismos, após o qual deverá ocorrer declínio na intensidade de resposta frente à exposição a esse metal. Para o indicador crescimento radicular, tal dosagem referiu-se a 0,28 mM, mas foram estudadas as concentrações de 0, 0,05 e 0,5 mM, enquanto que no presente ensaio, empregou-se 0, 0,1 e 1 mM de CdCl_2 . Ainda com relação à atividade de GR em folhas, o significativo efeito do tempo de tratamento ($\text{prob.} > F = 0,0078$; Tabela 4C) foi avaliado por dados que se ajustaram a uma regressão cúbica ($\text{prob.} > F = 0,0096$; Tabela 5 e Fig. 2), indicando significativa queda de atividade da primeira para a segunda categoria de tempo (de 7,5 h a 22,5 h), seguida de elevação significativa desta última categoria citada para a seguinte (de 22,5 h para 39 h), havendo nova queda significativa na atividade de GR nas folhas, na classe de 63 h de tratamento.

Para a análise dos dados referentes à atividade de GR em raízes, os dados foram transformados segundo a expressão $(x)^{1/2}$. Como mencionado acima, o fator dosagem produziu efeito significativo (prob.>F=0,0016, Tabela 4C) e os dados gerados nesse ensaio ajustaram-se a uma regressão linear (prob.>F=0,0009, Tabela 5 e Fig. 2) sugerindo que maiores dosagens de CdCl₂ estariam associadas a maiores atividades de GR em raízes. Ainda que tenha ocorrido uma pequena queda dessa atividade devido à exposição à dosagem 0,1 mM, essa não foi considerada significativa, nas condições do presente experimento. Quanto aos níveis do fator tempo de tratamento, também houve efeito significativo (prob.>F=0,00685, Tabela 4D), sendo os dados correspondentes ajustados significativamente a uma regressão cúbica (prob.>F=0,02389, Tabela 5 e Fig. 2). Isso indicou que houve significativa queda de atividade entre a classe de 7,5 h e 22,5 h, seguindo-se significativa elevação desta classe para a de 22,5 h e nova elevação significativa desta última categoria citada para a de 63 h. Ensaios realizados com maior número de repetições permitiriam explorar com maior precisão a resposta de plântulas de arroz ao Cd, uma vez que seria possível estudar a significância da interação entre os fatores dosagem e tempo de tratamento.

A variação das atividades de CAT e GR em plantas expostas ao Cd tem sido altamente variável e por vezes contraditória, sendo dependente de concentração e do tecido estudado (Fornazier, 2000). A atividade de CAT foi estimulada pelo Cd em rabanete (Vitoria et al., 2001) em *Agropyron repens* (Brej, 1998), assim como declinou em *Phaseolus vulgaris* (Somashekariah et al., 1992) e *Pisum sativum* (Darluzo et al., 1997). No caso de GR, apesar de se ter relatado igual variabilidade, os trabalhos mais recentes vêm mostrando aumento significativo dessa atividade, em resposta ao Cd, principalmente em raízes (Ferreira, 2000; Fornazier, 2000; Vitória et al., 2001).

Tal aumento deve estar associado a duas causas principais:

1- intensa atividade do ciclo glutathiona/ascorbato visando a eliminação dos EAOs, ou 2- a necessidade de glutathiona reduzida para a incorporação da produção de fitoquelatinas a partir da necessidade de glutathiona na forma reduzida para sua incorporação em fitoquelatinas que irão se ligar ao Cd, neutralizando seus efeitos potencialmente danosos à célula. No presente estudo, constou-se significativa e progressiva elevação da atividade de GR em raiz, em concordância com o segundo mecanismo aqui apresentado. Essa possibilidade é reforçada pelo fato de que tanto CAT com GR aumentaram sua atividade em folhas, pela exposição ao Cd, sugerindo que tanto uma enzima como a outra devem responder à geração dos EAOs translocado para parte aérea desse tecido, como observado para rabanete (Vitória et al., 2001).

TABELA 1. Análise de variância para médias de crescimento radicular de plântulas de linhagens de arroz.

Fontes de Variação	GL	QM	Prob.> F
Linhagem	9	0,478	0,0121
Dosagem de Cd	2	4,300	0,00001
Tempo	1	1,390	0,0082
Linhagem * Dosagem	18	0,560	0,0004
Linhagem * Tempo	9	0,218	0,3481
Dosagem * Tempo	2	0,214	0,3342
Resíduo	138	0,194	
Total	179		
Média Geral = 2,527	CV (%) = 17,414		

TABELA 2. Médias de crescimento radicular de plântulas de linhagens de arroz.

A. Controle - sem Cd				B. Cd - 0,05 mM				C. Cd - 0,5 mM			
Linhagem	Médias Originais	5%	1%	Linhagem	Médias Originais	5%	1%	Linhagem	Médias Originais	5%	1%
Caiapó	5,926	a	A	Caiapó	4,620	a	A	F-133	2,640	a	A
IAC-202	5,648	a	ABC	IAC-165	2,110	ab	AB	ARG-2	1,456	ab	AB
F-222	4,072	ab	ABC	F-133	1,781	abc	AB	IAC-202	0,726	abc	AB
IAC-165	3,847	ab	ABC	F-222	0,999	bc	AB	F-222	0,619	abc	AB
J-79	3,633	abc	ABC	F-35	0,904	bc	AB	J-79	0,475	abc	AB
F-35	3,293	abcd	ABC	Ory-20	0,606	bc	B	IAC-165	0,432	abc	AB
Ory-20	2,218	bcd	ABC	J-79	0,041	bc	B	Ory-20	0,266	abc	AB
F-133	1,381	bcd	BC	ARG-2	-0,006	bc	B	J-199	0,048	abc	AB
J-199	0,723	cd	C	J-199	-0,575	bc	B	Caiapó	-0,900	bc	AB
ARG-2	0,407	d	C	IAC-202	-0,804	c	B	F-35	-1,233	c	B

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado pelo teste de Duncan.

TABELA 3. Regressão Polinomial para o efeito dos níveis de dosagem de CdCl₂ sobre o crescimento radicular de plântulas de linhagens de arroz

Linhagem	Regressão (Prob. > F)	Equação	R ² (%).	Estimativa da dosagem de maior inibição do crescimento (mM)	Estimativa da menor diferença de crescimento (cm)
Todas	0,00006	$y = 2,83 - 8,82x + 15,76x^2$	1,00	0,28	1,57
F-222	0,0390	$y = 3,01 - 12,36x + 22,16x^2$	1,00	0,28	1,29
IAC-202	0,00006	$y = 3,26 - 26,80x + 50,11x^2$	1,00	0,27	0,87
J-79	0,0097	$y = 2,94 - 15,27x + 28,14x^2$	1,00	0,28	-0,32
Caiapó	0,00001	$y = 3,26 - 2,50x$	0,997	-	-
F-35	0,0013	$y = 2,70 - 1,56x$	0,842	-	-
IAC-165	0,0202	$y = 2,85 - 1,07x$	0,843	-	-
ARG-2	n,s,	-	-	-	-
F-133	n,s,	-	-	-	-
J-199	n,s,	-	-	-	-
Ory-20	n,s,	-	-	-	-

TABELA 4. Análises de variância para atividades de CAT e GR.

A. Atividade de CAT em Folhas			
Fontes de Variação	GL	QM	Prob,> F
Dosagem de Cd	2	111,24	0,00001
Tempo	3	6,20	0,12711
Resíduo	31	3,03	
Total	36	335,111	
Média Geral = 10,699	C.V. =	16,278 %	
B. Atividade de CAT em Raízes			
Fontes de Variação	GL	QM	Prob,> F
Dosagem de Cd	2	6,195	0,17033
Tempo	3	17,822	0,00468
Resíduo	30	3,316	
Total	35	165,349	
Média Geral = 7,449	C.V. =	24,448 %	
C. Atividade de GR em Folhas			
Fontes de Variação	GL	QM	Prob,> F
Dosagem de Cd	2	3,366	0,00001
Tempo	3	0,224	0,00781
Resíduo	27	0,046	
Total	32		
Média Geral = 1,356	C.V. =	15,782 %	
D. Atividade de GR em Raízes			
Fontes de Variação	GL	QM	Prob,> F
Dosagem de Cd	2	1,152	0,00163
Tempo	3	0,684	0,00685
Resíduo	34	0,142	
Total	39		
Média Geral = 1,537	C.V. =	24,504 %	

TABELA 5. Regressão polinomial para efeito dos níveis de dosagem de CdCl₂ e tempo de tratamento sobre as atividades enzimáticas de CAT e GR em folhas e raízes de plântulas de arroz da linhagem IAC-165.

Enzima	Órgão	Fator	Regressão (Prob > F)	Equação	R ² (%)	Estimativa da dosagem de máxima atividade (mM)	Estimativa da atividade máxima ($\mu\text{mol.mim}^{-1}.\text{mg prot}^{-1}$)
CAT	Folhas	Dosagem	0,0006	$y = 7,825 + 36,52x - 30,35x^2$	1,00	0,60	18,81
		Tempo	n.s.	-	-	-	-
	Raízes	Dosagem	n.s.	-	-	-	-
		Tempo	0,0106	$y = 11,502 - 0,707x + 0,025x^2 - 0,0002x^3$	1,00	-	-
GR	Folhas	Dosagem	0,00001	$y = 0,748 + 8,122x - 7,040x^2$	1,00	0,58	3,09
		Tempo	0,00096	$y = 2,150 - 0,117x + 0,004x^2 - 0,00004x^3$	1,00	-	-
	Raízes	Dosagem	0,00094	$y = 1,391 + 0,504x$	0,85	-	-
		Tempo	0,02389	$y = 2,442 - 0,135x + 0,004x^2 - 0,00004x^3$	1,00	-	-

5-CONCLUSÕES

1- Quanto ao efeito do Cd sobre o crescimento das linhagens de arroz, foram caracterizados 3 grupos: um primeiro, cuja resposta à menor dosagem (0,05 mM de CdCl_2) é significativa e esta se mantém na dosagem seguinte (0,5 mM); um segundo, onde também é significativa a resposta à menor dosagem, mas esta se intensifica significativamente com o aumento da dosagem e um terceiro, no qual as linhagens mostraram-se resistentes às dosagens testadas, não sendo afetadas em seu padrão de crescimento de raízes no tempo desse estudo.

2- Para CAT e GR em folhas e raízes, tanto para dosagens como para tempo observou-se padrões semelhantes de resposta ao Cd. No caso do efeito de dosagem em folhas, verificou-se uma elevação de atividade mediante exposição à dosagem inicial (0,1 mM de CdCl_2), o qual tendeu a se manter na maior dosagem testada (1 mM). Em raízes, ao contrário, houve tendência de queda dessa atividade diante da exposição à dosagem 0,1 mM, padrão este que tendeu a se inverter com nova elevação da atividade com o aumento da dosagem para 1mM. O efeito do tempo sobre a atividade dessas enzimas inverteu-se a cada média de tratamento estudada, ainda que não de forma significativa para CAT, mas sim para GR, com decréscimo de 7,5 para 22,5, aumento para 39 e nova queda para 63 h. Nas raízes verificou-se este mesmo padrão exceto que de 39 para 63 h houve novo aumento significativo de atividade.

6-Referências Bibliográficas

AGRIANUAL MERCADO E PERSPECTIVAS, FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO
p.121- 130,1998

ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants.
Plant Physiology, v.107, n.4, p. 1049-1054, 1995.

ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, L. Reactive oxygen species and
antioxidants relationship in green cells **Physiologia Plantarum**, v.100,
p.224-233, 1997

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 leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient
mutant of barley. **Physiologia Plantarum** , v.104, p.280-292, 1998.

BARCELÓ, J.; VÁSQUES.; M.D.; POSCHENRIEDER, C. Structural and
ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus
vulgaris* L.). **New Phytologist**, v.108, n.1, p.37-49, 1988.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers
and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium.
Biologia Plantarum, v.40, n.1, p.131-135, 1997/98.

- BARABÁS, K.N; SZEGLETES, Z; PESTENÁCZ, A.; FÜLÖP, K; ERDEI, L Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defense mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L) seedling **Journal of Physiologia Plantarum** , v.153, p.146-153, 1998.
- BOO, Y.C; JUNG, J. Water deficit- induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. **Journal of Plant Physiology**, v.155,n.2, p.255-261, 1999.
- BOUSSAMA, N; OUARITI, O; SUZUKI, A; GHORBAL, M.H. Cd-stress on nitrogen assimilation. **Journal of Plant Physiology**, v.155, n.3, p.310-317, 1999.
- BOWLER, C; VANCAMP, W; VANMONTAGU, M; INZE, D. Superoxide-dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, n.3, p.199-218, 1994.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-259, 1976.
- BROWN, D.P; BECKETT, R. P Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus-Squarrosus*. **Annals of Botany**, v55, n.2, p.179-188, 1985.
- CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORGBAL, M.H.; EL FERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidants enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v.127, n.2, p.139-147, 1997.

- CHEN, H.Y.; LIU, W.Y. The molecular evolution of superoxide dismutase based on its distribution and structure. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, v.23, n.5, p.408-413, 1996.
- CHEN, J.J.; ZHOU, J.M.; GOLDSBROUGH, P.B. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. **Physiologia Plantarum**, v.101, n.1, p.165-172, 1997.
- CHEN, S.L.; KAO, C.H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium **Plant Growth regulation**, v.16, p.249-252, 1995.
- COOBET, G.P.; SANDS, K.; WATERS, M.; WIXSON, B.G.; DORWARD-KING, E. Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes. **Environmental Toxicology and chemistry**, v.19, n.3, p.600-607, 2000
- CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; LEIDI, E.O.; HERNANDEZ, J.A.; SEVILLA, F.; DEL RIO, L.A. Subcellular-distribution of superoxide-dismutase in leaves of ureide-producing leguminous plants. **Physiologia Plantarum**, v.82, n.2, p.285-291, 1991.
- CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. **Glutathione reductase and ascorbate peroxidase.** In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (Ed.) Causes of photooxidative stress and amelioration of defence systems in plants. CRC Press: Boca Raton, Florida, 1994. p.343-364.

- DAI, Q.; YAN, B.; HUANG, S.; LIU, X.; PENG, S.; MIRANDA, M.L.L.; CHAVEZ, A.Q.; VERGARA, B.S.; OLSZYK, D.M. Response of oxidative stress defence systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. **Physiologia Plantarum**, v.101, p.301-308, 1997.
- DALURZO, H.C.; SCANDALIO, L.M.; GOMEZ, M.; DEL RIO, L.A. Cadmium infiltration of detached pea leaves Effect on its activated oxygen metabolism. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v.37, n.3, p 59-64, 1997.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, v.98, n.1, p.29-36, 1997.
- DI TOPPI, L.S.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.41, n.2, p.105-130, 1999.
- EDWARDS, E.A.; RAWSTHORNE, S.; MULLINEAUX, P.M. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). **Planta**, v.180, n.2, p.278-284, 1990.
- EL-SHINTINAWY, F. Glutathione counteracts the inhibitory effect induced by cadmium on Photosynthetic process in soybean. **Photosynthetica**, v.36, n.1/2, p.171-179, 1999.
- FADZILLA, N.M.; GILL, V.; FINCH, R.P.; BURDON, R.H. Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Planta**, v.199, p.552-556, 1996.
- FADZILLA, N.M.; FINCH, R.P.; BURDON, R.H. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.307, p.325-331, 1997.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants.
Physiologia Plantarum, v.92, n.4, p.696-717, 1994.

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

GABBRIELLI, R.; PANDOLFINI, T.; VERGNANO, O.; PALANDRI, M.R.
Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance
strategies. **Plant and Soil**, v.122, n.2, p.271-277, 1990.

GALLEG0, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Oxidative damage caused
by cadmium choride in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants.
Phyton-International Journal of Experimental Botany, v.58,
n.1/2, p.41-52, 1996a.

GALLEG0, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of reavy metal ion
excess on sunflower leaves: evidence for involvment of oxidative stress.
Plant Science, v.121, n.2, p.151-159, 1996b.

GALLI, U.; SCHUEPP, H.; BRUNOLD, C. Thiols in cadmium and copper-
treated maize (*Zea mays* L.). **Planta**, v.198, n.1, p.139-143, 1996.

GHOSHROY, S.; FREEDMAN, K.; LARTEY, R.; CITOVSKY, V. Inhibition of
plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium.
The Plant Journal, v.13, n.5, p.591-602, 1998.

- GRILL, E.; WINNACKER, E.L.; ZENK, M.H. Phytochelatins – the principal heavy- metal complexing peptides of higher plants. **Science**, v.230, n.4726, p.674-676, 1985.
- GUPTA, S.C.; GOLDSBROUGH, P.B. Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines. **Plant Physiology**, v.97, n.1, p.306-312, 1991.
- GWOZDZ, E.A.; PRZYMUSINSKI, R.; RUCINSKA, R.; DECKERT, J. Plant Cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.19, n.4, p.459-465, 1997.
- HART, J.J.; WELCH, R.M.; NORVELL, W.A; SULLIVAN, L.A; KOCHIAN, L.A. Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivares **Plant Physiology**, v.116, p.1413-1420, 1998.
- HAVIR, E.A.; McHALE, N.A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. **Plant Physiology**, v.89, p.952-957, 1989.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plant without soil.** Bekerley: University of California agricultural experiment station bulletin, 1951. 347p.
- HOWDEN, R.; ANDERSEN, C.R.; GOLDSBROUGH, P.B.; COBBETT, C.S. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis-thaliana*. **Plant Physiology**, v.107, n.4, p.1067-1073, 1995.

JORHEM, L.; SLANINA, P. Does organic farming reduce the content Cd and certain trace metals in plant ? A pilot study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.1, p.43-48, 2000.

KESSELER, A.; BRAND, M.D. The mechanism of the stimulation of state 4 respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. **Plant Physiology and Biochemistry**, n.33, v.4, p.519-528, 1995.

KLIEBENSTEIN ,D.J.; MONDE, R.A.; LAST, R. L. Superoxide dismutase in *Arobidopsis*: An eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization **Plant Physiology**, v.118, n.2, p.637-650, 1998.

KRAUS ,T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol induces tolerance on wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity **Journal.Plant Physiology**, v.145, p.570-576, 1995.

KRUPA, Z. Cadmium-induced changes in the composition and structure of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex II in radish cotyledons. **Physiologia Plantarum**, v.73, n.4, p.518-524, 1988.

KRUSH, G.S. Origi, dispersal, cultivation and variation of rice cotyledons. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.25-34, 1997.

KUBOI, T.; NOGUCHI, A.; YAZAKI,J. Relationship between tolerance and accumulation chacteristics of cadmium in higher plants. **Plant and Soil** v.104, p.275-280, 1987.

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

- LAGRIFFOUL, A.; MOCQUOT, B.; VANGRONSVELD, J.; MENCH, M. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v.200, p.241-250, 1998.
- LALL, N.; NIKOLOVA, R.V.; BOSA, A. Changes in isozyme patterns of superóxide dismutase, peróxide and catalase in leaves of *Impatiens flanaganiae* in response to Fe, Mn, Zn, and Cu deficiencies. **Phyton-International Journal of Experimental Botany**, v.63, n.1/2, p.147-153, 1998.
- LEA, P.J.; WELLBURN, F.A.M.; WELLBURN, A.R.; CREISSEN, G.P.; MULLINEAUX, P.M. Use of transgenic plants in the assessment of responses to atmospheric pollutants. *In*: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (Ed.) **Responses of plant metabolism to air pollution and global change**. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, 1998. p.241-250.
- LEE, S.M.; LEUSTEK, T. The effect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. **Plant Science**, v.141, p.201-207, 1999.
- LEITA, L.; CONTIN, M.; MAGGIONI, A. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Science**, v.77, p.139-147, 1991.
- LEOPOLD, I.; GÜNTHER, D.; SCHMIDT, J.; NEUMANN, D. Phytochelatins and heavy metal tolerance. **Phytochemistry**, v.50, p.1323-1328, 1999.
- LI, L.; VAN STADEN, J.; JAKER, A.K. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. **Plant Growth Regulation**, v. 25, n.2, p.81-87, 1998.

- LOZANO-RODRIGUEZ, E.; HERNÁNDEZ, L.E.; BONAY, P.; CARPENA-RUIZ, R.O. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. **Journal of Experimental Botany**, v.48, n.306, p.123-128, 1997.
- MALAN, H.L.; FARRANT, J.M. Effects of the metal pollutants cadmium and nickel on soybean seed development. **Seed Science Research**, v.8, p.445-453, 1998.
- MATTIAZZO-PREZOTTO, M.E. Comportamento de cobre, Cd, crômio, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH. Piracicaba, 1994. 197p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , Universidade de São Paulo.
- MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E. Uso de resíduos sólidos urbanos na agricultura e impactos ambientais. /Apresentado ao XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Rio de Janeiro, 20-26 de Julho de 1997. 28p.
- MENCH, M.; MARTIN, E.; SOLTA, P. After effects of metals derived from a highly metal-polluted sludge on maize (*Zea mays* L.). **Water Air Soil Pollut**, v.75, p.277-291, 1994
- MEUWLY, P.; THIBAUT, P.; RAUSER, W.E. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. **Plant Journal**, v.7, n.3, p.391-400, 1995.
- MOHAN, B.S.; HOSETTI, B.B. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. **Environmental Pollution**, v.98, n.2, p.233-238, 1997.

- MORAN, J. F.; BECANA, M.; ITURBEORMAETXE, I.; FRECHILLA S.; KLUCAS, R.V.; APPARICIOTEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea-plants. **Plant** v.194, n.3, p.346-352, 1994
- MORENO-CASSELES, J.; MORAL, R.; PEREZ-ESPINOSA, A.; PEREZ-MURCIA, M.D. cadmium accumulation and distribution in cucumber plant **Journal of Plant Nutrition** v.23, n.2, p.243-250, 2000
- OUARITI, O.; BOUSSAMA, M.; ZARROUK, A.; GHORBAL, M, H. Cadmium and copper-induced changes in tomato membrane lipids. **Phytochemistry**, v.45, n.7, p.1343-1350, 1997.
- PAGE, A.L.; BINGHAN, F.T.; NELSON, C. Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. **Journal of Environmental Quality**, v.1, p.288-292, 1972.
- PAN, S.; YAU, Y. The isozymes of superoxide dismutase in rice. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.32, p.253-258, 1991.
- PATRA, J.; PANDA, B.B. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L. **Environmental Pollution**, v.101, p.99-105, 1998.
- PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.35, n.4, p.525-545, 1995.
- RAUSER, W.E. Phitochelatins and related pepitides. Structure. Biosynthesis and funcion. **Plant Physiology**, v.109, p.1141-1149, 1995.

REED, R.L.; SANDERSON, M.A.; ALLEN,V.G.; MATCHES,A,G Growth and cadmium accumulation in select switchgrass cultivars. **Communication in soil science and plant analysis**, v.30, n.19/20, p.2655-2667, 1999.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I.; SANDALIO, L.M.; CORPAS,F.J.; GOMEZ,M.; DEL RIO,L.A Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. **Free radical Research**, v.31, S.25-S31, Suppl.S 1999

RUBIO, M.I.; ESCRIG, I.; MARTÍNEZ-CORTINA,C.; LOPEZ-BENET F.J.; SANZ.A Cadmium and nickel accumulation in rice plants. effects on mineral nutrition And possible interactions of abscisic and gibberellic acids. **Plant Growth Regulation**, v.14, p.51-157, 1994.

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

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plant catalases. In Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants (C. H. Foyer and P.M. Muliuneaux, eds.), pp. 275-315. CRC Press, Boca Raton, FL. ISBN 0-8493-5443-9, 1994.

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Adv. Genetics**, v.28, p.1-41, 1990.

- SCEBBLA, F.; SEBASTIANI, L.; VITAGLIANO, C. Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.747-752, 1998.
- SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, v.105, n.1, p.39-44, 1999.
- SEHMER, L.; DIZENGREMEL, P. Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.53, n.5/6, p.545-551, 1998.
- SHAH, K.; DUBEY, R. S. Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedling **Plant Physiology Biochemistry**, v.33, n.5, p.577-584, 1995.
- SHALATA, A.; TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. **Physiologia Plantarum**, v.104, p.169-174, 1998.
- SHAW, B.P.; ROUT, N.P. Age-dependent responses of *Phaseolus aureus* to inorganic salts of mercury and cadmium Cu/Zn superoxide-dismutase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v 20, n.1, p 85-90, 1998.
- SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Cd/Fe interactions in higher plants – Its consequences for the photosynthetic apparatus. **Photosynthetica**, v.36, n.3, p.321-331, 1999.
- SILVA, F.A.; Análise Econômica do Sistema de Produção de arroz irrigado mecanizado nas regiões Centro-oeste, Norte e Nordeste do Brasil, em

1994; Uma análise ex-ante impacto econômico. **Conjuntura**, n.33, p.1-10, 1996.

SINGHAL, R.K.; ANDERSON, M.E.; MEISTER, A. Glutathione, a first line of defence against cadmium toxicity. **FASEB Journal**, v.1, p.220-223, 1987.

SUNG, J.M. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging in soybean seeds during aging. *Physiologia Plantarum*, v.97, p.85-89, 1996.

STROINSKI, A.; KOZLOWSKA, M. Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.66, n.2, p.189-195, 1997.

TUTIC, M.; SCHIRMER, R.H.; WERNER, D. Cloning and sequencing of mammalian glutathione reductase cDNA. **European Journal Biochemistry**, v.188, p.523-528 523, 1990.

TUKENDORF, A.; SKÓRZYNSKA-POLIT, E.; BASZYNSKI, T. Homophytochelatins accumulation in Cd-treated runner bean plants is related to their growth stage. **Plant Science**, v.129, p.21-28, 1997.

USHA-KESHAN.; MUKHERJI, S. Phytotoxic effect of cadmium as foliar spray on mungbean plant,. **Indian Journal of toxicology**, v. 4, p.15-22, 1997.

VALLEJOS, C.E. Enzyme activity staining. *In*: TANKSLEY, S.D.; ORTON, T.J. (Ed.) **Isozymes in plant genetics and breeding, part A**. Amsterdam; Oxford; New York: Elsevier, 1983. p.469-516.

- VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell and Environment**, v.13, p.195-206, 1990.
- VAN CAMP, W.; HEROUART, D.; WILLEKENS, H.; TAKAHASHI, H.; SAITO, K.; VANMONTAGU, M.; INZE, D. Tissue-Specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, v.112, n.2, p.525-535, 1996.
- VAN HUYLENBROECK, J.M.; VAN LAERE, I, M, B.; PIQUERAS, A.; DEBERGH, P.C.; BUENO, P. Time course of catalase and superoxide dismutase during acclimatization and growth of micropagated *Catathea* and *Spathiphyllum* plants. **Plant Growth regulation**, v.26, p7-14, 1998.
- VITORIA, A.P.; SMITH, R.J.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, 2000 (submetido).
- VÖGELI-LANGE, R.; WAGNER, G. J. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. **Plant Science**, v.114, p.11-18, 1996.
- VÖGELI-LANGE, R.; WAGNER, G.J. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in Tobacco leaves. **Plant Physiology**, v.92, p.1086-1093, 1990.
- WAGNER, G.L. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, v.51, p.173-212, 1993.
- WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, v.1, p.207-228, 1995.

WOJCIK, M.; TUKENDORF, A. Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. **Acta Physiologia Plantarum**, v.21, p.99-107, 1999.

WOODBURY, W.; SPENCER, A.K.; STAHMANN, M.A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. **Analytical Biochemistry**, v.44, n.1, p.301-305, 1971.

YAN, B.; DAI, Q.; LIU, X.; HUANG, S.; WANG, Z. Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, v.179, p.261-268, 1996.

ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, E.A.H.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Overexpression of glutathione synthetase in *Indian Mustard* enhances cadmium accumulation and tolerance oxygen. **Plant Physiology**, v.119, p.73-79, 1999