

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

**Análise dialética para determinar a contribuição tecido-específica na
tolerância ao Cádmio em tomateiro**

Renata Mota Lupp

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2022**

**Renata Mota Lupp
Engenheira Agrônoma**

**Análise dialélica para determinar a contribuição tecido-específica na tolerância ao
Cádmio em tomateiro**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO ANGELO PIOTTO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

**Piracicaba
2022**

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

Lupp, Renata Mota

Análise dialéctica para determinar a contribuição tecido-específica na tolerância de Cádmio em tomateiro / Renata Mota Lupp. - - Piracicaba, 2022.

87 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Solanum lycopersicum* L. 2. Índice de tolerância 3. Capacidade de combinação. 4. Estresses abióticos I. Título

DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Luiz Gonzaga** e minha mãe **Maria Angélica da Mota**

Que sempre me incentivaram a estudar, ensinaram-me o valor do conhecimento e estarão comigo para sempre em cada realização dos nossos sonhos

Ao meu noivo **Guilherme Carrara**

Que me motiva a seguir em frente

A minha madrinha **Maria da Conceição Mota**

Por me lembrar da minha essência

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades de evolução e pelas pessoas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais Maria Angélica da Mota e Luiz Gonzaga, que sempre estiverão e permanecerão por meio de seus ensinamentos em minha jornada pela vida. Pelos ensinamentos que me motivam a seguir sempre o caminho da honestidade, humildade e amor à Deus e ao próximo, mesmo quando é o caminho mais difícil. Ao meu melhor amigo e noivo Guilherme Carrara pelo incentivo contínuo e companheirismo. A minha madrinha, Maria da Conceição Mota, pela motivação constante e amizade de sempre.

Ao Professor Fernando Angelo Piotto, pela orientação exemplar, presença constante e por estar sempre acessível de forma tão humana, ética e profissional. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado ao longo dos anos. Agradeço ao professor José Laércio Favarin, pela oportunidade e orientação inicial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 140280/2019-7) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de Doutorado. À FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização do projeto (Processo FAPESP 2018/22671-8)

A coordenação do Programa de Pós Graduação em Fitotecnia (Esalq/USP) pela oportunidade e ensino de excelente qualidade. À coordenadora do programa professora Dra. Simone Rodrigues Silva e à secretária da Seção de Apoio à Pós-Graduação Angela Márcia Derigi Silva pelo apoio e ética na condução de todos os assuntos do programa.

Ao professor Dr. Ricardo Antunes Azevedo por disponibilizar o laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas, estrutura e materiais durante a instalação do experimento e análises bioquímicas. A Dra. Salete Aparecida Gaziola, técnica de nível superior do Departamento de Genética da ESALQ/USP, por todo o apoio e ensinamentos ao longo do meu doutorado.

A equipe e colegas de trabalho do Laboratório de Melhoramento de Hortaliças: Gustavo Nandi, Hellen Cristina da Silva, Katherine Derlene Batagin Piotto, João Vitor Nomura, Roberta Luiza Vidal e Jéssica Nogueira. Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal e do Departamento de Genética, da ESALQ/USP, dos quais destaco Zé Antonio Carmezini e Amaral.

A psicóloga Maila Sanchez pela contribuição semanal para minha trajetória. Aos amigos que partilham a vida comigo e contribuem para minha trajetória.

A todos aqueles que, embora não citados nesse texto, participaram dessa etapa da minha vida: MUITO OBRIGADA!

“É esta a menor de todas as sementes, mas, quando cresce,
torna-se um arbusto maior que todas as hortaliças,
de sorte que os pássaros vêm aninhar-se em seus ramos”

Mateus 13:32 (O grão de mostarda)

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Fontes de Cd para o ambiente e Cd no solo	13
2.2. Riscos devido ao acúmulo de Cd em organismos	15
2.3. Estresse oxidativo e enzimas do sistema antioxidante das plantas	16
2.4. Utilização de tomateiro em estudos e genótipos contrastantes	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Experimento em casa de vegetação	21
3.2. Quantificação de Cádmio e nutrientes	28
3.3. Análises metabólicas	29
3.4. Parâmetros radiculares e índice de tolerância	31
3.5. Análises estatísticas	32
4. RESULTADOS	35
4.1. Análise dialélica para tolerância, translocação e acúmulo de Cd nos tecidos	35
4.2. Análise da morfologia externa das raízes	45
4.3. Concentração de nutrientes nas plantas de tomateiro	47
4.4. Análise de indicadores de estresse oxidativo	65
4.5. Análises de enzimas antioxidantes	70
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	83

RESUMO

Análise dialélica para determinar a contribuição tecido-específica na tolerância ao Cádmio em tomateiro

Considerando os problemas crescentes devido à contaminação da água e do solo com Cádmio (Cd), é necessário estudar os mecanismos genético-fisiológicos da tolerância a este metal, visando entender melhor os mecanismos de tolerância, os quais possam ser utilizados como estratégia de manejo para seu manejo. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da enxertia como estratégia de manejo para aumentar a tolerância e reduzir a absorção de Cd em plantas de tomateiro, por meio da determinação da contribuição do sistema radicular e da parte aérea das plantas, quanto aos mecanismos de tolerância a este metal. Para tanto, foram utilizadas abordagens que envolvem o uso da técnica de enxertias recíprocas e análise dialélica, para avaliar a combinação de genótipos previamente caracterizados como sendo contrastantes quanto à tolerância ao Cd em tomateiro. O experimento consistiu da avaliação das combinações de genótipos enxertados, em sistema de hidroponia, na concentração de 0 e 35 μM de CdCl_2 , para avaliação de diversas variáveis morfo-fisiológicas e bioquímicas. Como principais resultados e conclusões, temos que: Existem mecanismos de tolerância, absorção e acúmulo de Cd em tomateiro que são específicos do sistema radicular e da parte aérea de cada genótipo; A enxertia pode ser usada de forma eficiente para reduzir a absorção e acúmulo de Cd na parte aérea das plantas, utilizando genótipos selecionados para esta finalidade, para uso como porta-enxertos. De forma adicional, é possível capitalizar efeitos sinérgicos combinando determinados genótipos a serem usados como copa; A combinação do genótipo USP15 como copa sobre o genótipo USP163, usado como porta-enxerto, mostrou maior sinergismo para aumentar o IT, reduzir ITr, reduzir Cd nas folhas das plantas e anular ou reduzir o efeito de redução na quantidade de radículas, devido à exposição ao metal; De maneira geral, o genótipo USP163 é o genitor mais promissor para programas de melhoramento que tenham a enxertia como fim para reduzir a absorção de Cd na parte aérea das plantas; Tanto a tolerância quanto o acúmulo de Cd na parte aérea das plantas é genótipo-tecido-específica, formando um sistema complexo de complementação de mecanismos, que precisa ser estudado e melhor compreendido, a fim de se projetar novas estratégias para reduzir os problemas de contaminação com este metal nos frutos de tomateiro.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L., Índice de tolerância, Capacidade de combinação, Estresses abióticos

ABSTRACT

Diallel analysis to determine tissue-specific contribution to Cadmium tolerance in tomato

Considering the growing problems due to contamination of water and soil with Cadmium (Cd), it is necessary to study the genetic-physiological mechanisms of tolerance to this metal, aiming to better understand the mechanisms of tolerance, which can be used as a strategy for its management. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of grafting as a management strategy to increase tolerance and reduce Cd uptake in tomato plants, by determining the contribution of the root system and the aerial part of the plants, regarding the mechanisms tolerance to this metal. For this purpose, approaches involving the use of reciprocal grafting technique and diallel analysis were used to evaluate the combination of genotypes previously characterized as contrasting in terms of tolerance to Cd in tomato. The experiment consisted of evaluating the combinations of grafted genotypes, in a hydroponics system, at a concentration of 0 and 35 μM of CdCl_2 , to evaluate several morpho-physiological and biochemical variables. As main results and conclusions, we have that: There are mechanisms of tolerance, absorption and accumulation of Cd in tomato plants that are specific to the root system and shoot of each genotype; Grafting can be used efficiently to reduce the absorption and accumulation of Cd in the shoots of plants, using genotypes selected for this purpose, for use as rootstocks. Additionally, it is possible to capitalize on synergistic effects by combining certain genotypes to be used as a crown; The combination of the USP15 genotype as crown over the USP163 genotype, used as rootstock, showed greater synergism to increase IT, reduce ITr, reduce Cd in plant leaves and cancel or reduce the effect of reducing the number of radicells, due to the metal exposure; In general, the USP163 genotype is the most promising parent for breeding programs aimed at grafting to reduce Cd uptake in the shoots of plants; Both the tolerance and the accumulation of Cd in the aerial part of the plants are genotype-tissue-specific, forming a complex system of complementation of mechanisms, which needs to be studied and better understood, in order to design new strategies to reduce contamination problems. with this metal in tomato fruits.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., Tolerance index, Combining ability, Abiotic stress

1. INTRODUÇÃO

Considerando os problemas crescentes devido à contaminação da água e do solo com Cádmio (Cd), é necessário estudar os mecanismos genético-fisiológicos da tolerância das plantas à este metal, visando melhor entendê-los, de modo que os mesmos possam ser utilizados como estratégias de manejo para evitar a absorção e acúmulo, bem como o estresse causado por este metal. Embora tenham sido identificados genótipos contrastantes quanto a tolerância ao Cd em tomateiro (PIOTTO et al., 2018), as principais pesquisas da área ainda não conseguiram explicar completamente os mecanismos genéticos, fisiológicos e bioquímicos que levam alguns genótipos a serem mais tolerantes ou mais sensíveis ao estresse causado por esse metal. A dificuldade em elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância do tomateiro ao Cd, provavelmente reside no fato de que genótipos podem apresentar ampla diversidade de mecanismos de resposta para esse estresse. Assim, é possível que dentre os genótipos mais tolerantes ao Cd existam aqueles cuja tolerância seja devida a mecanismos específicos do sistema radicular, em que há a modulação da absorção, transporte e acúmulo deste metal para outros tecidos.

Com isso, é primordial entender o papel relativo do sistema radicular e da parte aérea das plantas na composição da tolerância de cada genótipo tolerante ao Cd. Neste contexto, uma das estratégias de manejo do Cd no solo seria o uso de porta-enxertos tolerantes, os quais ajudassem a reduzir a contaminação dos órgãos comestíveis da parte aérea das plantas. Neste ponto, o tomateiro possui uma vantagem adicional em relação às outras espécies, pois o uso de porta-enxertos com resistência a estresses bióticos é bastante corriqueiro nesta cultura (PEIL, 2003). O uso de porta-enxertos em tomateiro atualmente tem o objetivo de evitar a morte das plantas por patógenos tais como a *Ralstonia* spp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (raças 1, 2 e 3) e nematoides do gênero *Meloidogyne* (LOOS et al., 2009), havendo diversos híbridos comerciais utilizados para esse propósito. O uso da enxertia seria a ferramenta mais poderosa para esse propósito, pois a enxertia recíproca entre genótipos tolerantes e sensíveis à este metal, pode fornecer informações precisas sobre a fração da contribuição das raízes e parte aérea para a tolerância.

Essa proposta é inovadora no estudo em questão, não havendo precedentes de estudos utilizando enxertias recíprocas para desvendar a contribuição dos tecidos na tolerância a um metal pesado, bem com um possível efeito de incremento ou redução de tolerância na combinação entre genótipos. Embora todos os mecanismos de tolerância a metais pesados sejam relevantes, quando pensamos no propósito de reduzir a contaminação das partes comestíveis, aqueles ligados à capacidade das raízes evitarem ou reduzirem a entrada e

transporte do metal para a parte aérea assumem certa prioridade em relação aos demais. Assim, se as raízes de determinados genótipos se mostrarem mais eficientes no processo de absorção seletiva de íons, provavelmente as plantas destes genótipos serão mais tolerantes, se desenvolvendo melhor, e também sendo menos propensas à contaminação de frutos e folhas. De forma adicional, temos também que muitos mecanismos bioquímicos estão envolvidos na tolerância das plantas ao Cd.

Além da determinação da contribuição da parte aérea e radicular para a tolerância de um genótipo ao Cd, é essencial realizarmos estudos que evidenciem os mecanismos bioquímicos relacionados a essa contribuição órgão-tecido-específica e a caracterização da relação do Cd com os demais nutrientes das plantas, o qual pode ser fundamental para o entendimento do transporte e acúmulo do Cd nos diferentes tecidos. O estresse ambiental altera a homeostase celular vegetal, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), o que resulta em estresse oxidativo (BOARETTO et al., 2014). A geração excessiva de EROs é um processo negativo e por esse motivo, por isso o nível dessas moléculas deve ser mantido o mais baixo possível. Contudo, essas moléculas participam dos processos de sinalização que estimulam as respostas das plantas às alterações ambientais (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). No sistema antioxidante das plantas as enzimas desempenham importante papel na degradação eficiente desse H_2O_2 . A manutenção de quantidades adequadas de enzimas do sistema antioxidante das plantas, como glutatona redutase é importante para as raízes e a parte aérea de tomateiros, quando estas plantas são expostas a presença de metais pesados por longo período (NOGUEIROL et al., 2015). Nos peroxissomos, essa degradação depende de um sistema antioxidante de defesa constituído por compostos de baixo peso molecular, como ácido ascórbico e enzimas de proteção, como a catalase (CAT) (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). As moléculas de $O^{\cdot -}$ e H_2O_2 que não foram degradadas no tilacóide passam pela degradação no estroma por meio da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), que está presente em uma grande variedade de compartimentos metabólicos (VITÓRIA et al., 2001).

A abordagem inovadora do presente trabalho pode gerar novas perspectivas de pesquisas utilizando a enxertia como ferramenta e enaltece a importância de trabalhos envolvendo enxertias e tolerância a estresses abióticos, como sendo uma das estratégias para evitar ou ao menos reduzir os problemas de contaminação dos alimentos por metais pesados. Assim, deste trabalho foi determinar a contribuição órgão-tecido-específica para a tolerância ao Cd em tomateiro, utilizando a técnica de enxertia recíproca entre genitores com níveis de tolerância a este metal, e desdobrando os resultados por meio da análise dialética entre as

combinações. Para tanto, foram utilizadas abordagens que envolvem o uso da técnica de enxertias recíprocas e análise dialélica, para avaliar a combinação de genótipos previamente caracterizados como sendo contrastantes quanto à tolerância ao Cd em tomateiro. A composição de cada genótipo enxertado foi dada pela combinação entre os genótipos usados como copa e como porta-enxerto, cuja união dos efeitos da combinação dos alelos foi tecido-específica. Uma vez que foram utilizadas as combinações em enxertias recíprocas, foi possível desdobrar com detalhes a contribuição de cada genótipo utilizado como copa e como porta-enxerto, na tolerância geral de cada planta enxertada. Estudos como o atual, abordando tolerância ao Cd relativos aos resultados dos parâmetros avaliados nas combinações de enxertia entre genótipos, abrem portas para novas propostas, gerando resultados teórico-aplicados relevantes para as pesquisas nesta área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Fontes de Cd para o ambiente e Cd no solo

O Cd é um oligoelemento não essencial e um dos metais mais ecotóxicos que interferem em todos os processos biológicos, sendo que seus efeitos impactam o meio ambiente e a qualidade dos alimentos. Esse metal possui afinidade forte com o enxofre (S) e é mais móvel em ambientes ácidos. Durante os processos de intemperismo, o Cd forma compostos simples e móveis como CdO, Cd(OH)₂, CdCl₂ e CdF₂ (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015). Os usos industriais do Cd são variados, podendo ser adicionado às ligas não ferrosas. Os outros usos tradicionais do Cd, como revestimentos, pigmentos e estabilizantes para plásticos estão sendo reduzidos para evitar problemas ambientais e de saúde (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015).

A contaminação do solo por metais pesados, como o Cd, sempre foi uma questão ambiental global (LIANG et al., 2017). Em solos agrícolas, a deposição atmosférica e a água de irrigação são conhecidas como as principais fontes de entrada de Cd, o qual é altamente móvel e potencialmente biodisponível. As principais fontes antropogênicas são fertilizantes fosfáticos, lodo de esgoto, mineração, fundição e combustíveis fósseis (KHANAM et al., 2018). Embora muitos países façam esforços para diminuir as emissões de contaminantes atmosféricos, as concentrações de Cd, assim como de Hg, na atmosfera são sempre consideradas um risco devido às atividades industriais de longo prazo (BIAN et al., 2015). A deposição atmosférica seca e úmida são consideradas fontes importantes de Cd para os solos (ZHU et al., 2016).

As atividades industriais, como a mineração e combustão de carvão, fundição, processo de fabricação de produtos químicos também estão relacionadas com a dispersão desse metal na atmosfera (TANG et al., 2015). Outro fator relevante é a qualidade da água utilizada na irrigação das plantações, essa pode fornecer níveis elevados de Cd em regiões como os cinturões verdes de produção de hortaliças no Brasil, localizados nas proximidades de cidades altamente industrializadas. O estado de São Paulo é o maior consumidor do mercado de produtos hortifrutigranjeiros no Brasil, sua área de cultivo com mais de 50 espécies de vegetais é de cerca de 145.000 ha, produzindo cerca de 4 milhões de toneladas, de acordo com o brasileiro Instituto de Economia Agrícola (IEA). Essa produção ocorre próxima a capital, na área denominada cinturão verde do estado de São Paulo, e é responsável por abastecer a região metropolitana de São Paulo. Essa região de elevada produção agrícola é constituída por zonas urbanas e industriais, isso eleva a exposição a contaminantes no solo e vegetais produzidos nesses locais (SANTOS-ARAUJO e ALLEONI, 2016).

Metais pesados como níquel e Cd no lodo de esgoto são comuns pelos produtos domésticos e resíduos que o compõem. Seu acúmulo em solos agrícolas pode gerar problemas ambientais, de saúde humana, reduzir a qualidade dos solos, bem como o rendimento e qualidade dos vegetais colhidos (KHAN et al., 2016; REHMAN et al., 2016). A absorção de Cd pela planta é afetada por fatores relacionados às propriedades do solo (tamanho de partícula do solo, pH, temperatura, capacidade de troca catiônica) e fisiologia da planta (área de superfície da raiz, taxa de exsudação e transpiração da raiz) (ROSÉN et al. 2012). Além disso, a biodisponibilidade de metais pesados depende da concentração de ânions e ligantes quelantes presentes na solução do solo, bem como do pH e do estado redox. Todos esses parâmetros são influenciados pela umidade do solo, portanto, pela variação sazonal de precipitações e temperatura (ZOGHLAMI et al. 2018).

O conteúdo médio de Cd no solo mundial é estimado em $0,41 \text{ mg kg}^{-1}$. O material de origem dos solos é fator determinante para o conteúdo de Cd desses. Seus maiores teores encontram-se em solos calcários e orgânicos (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015). O acúmulo de elementos tóxicos em vegetais é influenciado por fatores como a interação de elementos químicos, disponibilidade do metal e pH do solo (YANG et al., 2017).

Assim, a disponibilidade de Cd é influenciada por fatores como as propriedades e microrganismos dos solos, espécies de plantas cultivadas e o clima das regiões (RABÊLO et al., 2020). Existem muitas diferenças entre os vegetais cultivados em regiões tropicais e temperadas que interferem na captação de Cd e que durante muitos anos não receberam a devida atenção em publicações científicas (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015). Diferenças entre espécies vegetais ou mesmo entre genótipos da mesma espécie adaptados a cada região podem afetar a captação de Cd. Além disso, as estações quentes e chuvosas das regiões tropicais úmidas resultam em condições ambientais distintas para o cultivo de vegetais como as hortaliças. Variações que interferem na taxa de evapotranspiração e, conseqüentemente, afetam a quantidade de contaminantes absorvidos pelas plantas (KABATA-PENDIAS e SZTEKE, 2015).

Os solos tropicais são mais intemperizados e, na maioria das vezes, apresentam menor capacidade de retenção de Cd do que os temperados, permitindo maior absorção de Cd pelos vegetais. Regiões tropicais apresentam maior disponibilidade de Cd nos solos e acúmulo em vegetais. Portanto, exibem uma maior exposição humana a contaminação por metais pesados (MELO et al., 2011). Essas informações estão sendo utilizadas em estudos para reduzir a biodisponibilidade nos solos de Cd, outros trabalhos buscam espécies de plantas para fitoextração de Cd. Além dos experimentos realizados em busca de genótipos de

plantas mais resistentes ao Cd e que demonstrem menor translocação para as partes comestíveis, como os frutos. Em estudos sob condições controladas, esses dados também são de suma importância para o controle de fatores da solução nutritiva que possam favorecer a disponibilidade de Cd aos vegetais.

2.2. Riscos devido ao acúmulo de Cd em organismos

O Cd é um dos metais pesados mais tóxicos devido ao acúmulo ao longo do tempo e interferência irreversível em todos os organismos expostos a sua contaminação. Por isso este metal foi adicionado, a mais de uma década, a lista de elementos químicos para monitoramento pelo Comitê de Gestão dos Estados Unidos (JARUP e AKESSON, 2009). Esse oligoelemento é ambientalmente importante por sua elevada toxicidade e bioacumulação (KEELER et al., 2006).

Extremamente tóxico para animais, mesmo que em pequenas concentrações o Cd pode ser assimilado por meio da respiração e armazenado no fígado e rins (LIANG et al., 2016). A exposição crônica ao Cd pode afetar o metabolismo de organismos vivos e um dos principais órgãos no qual o Cd é acumulado e pode causar toxicidade é o rim (YANG e SHU, 2015). Para desvendar as formas pelos quais ocorre a nefrotoxicidade por Cd trabalhos tem procurado desvendar as vias de entrada do Cd nas células epiteliais renais, além dos mecanismos de transporte desse metal no rim e o papel exato de suas proteínas transportadoras nesse órgão (YANG e SHU, 2015). Trabalhos sobre bioacessibilidade ao Cd e outros metais pesados demonstram o risco à saúde por esse tipo de contaminação, além de enfatizarem a importância de estudos que identifiquem esses contaminantes no solo e em vegetais para evitar sua bioacumulação.

Pandey e Pandey (2009) relataram que a deposição atmosférica de metais como mercúrio (Hg) e Cd, a longo prazo, causará um efeito devastador na fertilidade do solo. Por isso, a deposição atmosférica de metais será o principal contribuinte para aumentar o Cd na nutrição de plantas e, conseqüentemente, nas partes comestíveis dos vegetais (PANDEY e PANDEY 2009). Assim, o Cd não só pode alterar as propriedades físicas e químicas dos solos, mas também prejudicar as plantas, animais e humanos por modificações no metabolismo desses (NAGAJYOTI et al., 2010). O consumo de vegetais é uma das principais fontes de exposição dos humanos a elementos tóxicos. Vegetais cultivados sob alguma fonte potencial de poluição como em áreas industriais ou próximas a essas regiões e rodovias, plantios em solos alterados com lodo de esgoto e sob irrigação com águas residuais estão sujeitos a contaminação por Cd.

Este é um tipo de contaminação oculta e silenciosa, pois as espécies agrícolas são capazes de absorver e acumular Cd em seus tecidos, inclusive nas partes comestíveis (PIOTTO et al., 2018), sendo as plantas a principal forma de transporte de metais pesados do solo para o organismo dos seres humanos e outros animais. Neste cenário, as hortaliças configuram como sendo um dos grupos mais sujeitos aos problemas com a contaminação por Cd, uma vez que as principais regiões produtoras de hortaliças folhosas (alface, repolho, etc), de flores (brócolis, couve-flor, etc) e de frutos (tomate, pimentão, berinjela, etc), estão alocadas perto de áreas urbanas e provavelmente recebem água de irrigação contaminada com esse metal. Um agravante desta situação reside no fato de que muitas hortaliças são consumidas diretamente em sua forma *in natura*, podendo conter quantidades significativas de Cd nas folhas, flores e frutos.

Considerando que as raízes são a porta de entrada para água, nutrientes e diversos contaminantes no solo, tais como o Cd, é importante considerar o desenvolvimento de estratégias de manejo que envolvam as inter-relações entre solo e o sistema radicular das plantas, no sentido de evitar ou reduzir a absorção, transporte e acúmulo destes elementos tóxicos para as partes comestíveis das plantas. Embora todos os mecanismos de tolerância a metais pesados sejam relevantes, quando pensamos no propósito de reduzir a contaminação das partes comestíveis, aqueles ligados à capacidade das raízes evitarem ou reduzirem a entrada e transporte do metal para a parte aérea assumem certa prioridade em relação aos demais. Assim, se as raízes de determinados genótipos se mostrarem mais eficientes no processo de absorção seletiva de íons, provavelmente as plantas destes genótipos serão mais tolerantes, se desenvolvendo melhor, e também sendo menos propensas à contaminação de frutos e folhas.

2.3. Estresse oxidativo e enzimas do sistema antioxidante das plantas

Altas concentrações de metais pesados causam problemas de toxicidade nas plantas, mas também nos animais que os consomem e a deposição gradual desses elementos leva ao risco de bioacumulação (Khanam et al., 2018). A intoxicação de um organismo por Cd pode levar a distúrbios metabólicos com estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio sobrecarrega o sistema antioxidante de um organismo com a elevação da produção de compostos não-enzimáticos, como glutatona, e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase e glutatona redutase (Valko et al., 2016). A elevação das concentrações de compostos do sistema antioxidante das plantas não é um aspecto negativo, ao contrário muitos participam da eliminação de espécies reativas

de oxigênio, estabilização de membranas celulares e mecanismos que elevam a resistência das plantas ao estresse.

O estresse ambiental altera a homeostase celular vegetal, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), o que resulta em estresse oxidativo (BOARETTO et al., 2014). A geração excessiva de EROs é um processo negativo e por esse motivo, o nível dessas moléculas deve ser mantido o mais baixo possível. Um dos compostos utilizados como indicador de estresse oxidativo em plantas é o malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica e por isso, um dos principais produtos da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que compõem a estrutura nas membranas celulares. Para proteger suas células contra esse dano oxidativo, as plantas utilizam vias de defesa que possibilitam a eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GRATÃO et al., 2005).

Contudo, essas moléculas participam dos processos de sinalização que estimulam as respostas das plantas às alterações ambientais (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). Assim, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é conhecido também como uma molécula que atua na sinalização da ativação de respostas de defesa nas plantas (FOYER e NOCTOR, 2000). Portanto, sinais redox são muito importantes em respostas de defesa e fenômenos de tolerância. Deve-se atentar que a redução do oxigênio molecular para peróxido de hidrogênio gera produtos intermediários potencialmente tóxicos, devido à alta reatividade (SCHUTZENDUBEL et al., 2001).

As enzimas do sistema antioxidante das plantas desempenham importante papel na degradação eficiente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme o compartimento celular em que se encontram. Nos peroxissomos, essa degradação depende de um sistema antioxidante de defesa constituído por compostos de baixo peso molecular, como ácido ascórbico e enzimas de proteção, como a catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). Uma vez que a enzima catalase não se encontra nos cloroplastos das plantas o processo de degradação é realizado pela enzima APX, que está ligada ao tilacóide. As moléculas de O^{-2} e H_2O_2 que não foram degradadas no tilacóide passam pela degradação no estroma por meio da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) ou da APX. A ocorrência da atividade da SOD, em uma grande variedade de compartimentos metabólicos demonstra a importância das enzimas do ciclo da glutathiona/ascorbato, no exterior do cloroplasto (VITÓRIA et al., 2001).

O ciclo de ascorbato-glutathiona é ativado comumente por plantas sob estresse, tanto para a remoção de H_2O_2 ou para assegurar a disponibilidade de GSH para a síntese destas proteínas de ligação a metais (VITÓRIA et al., 2001). Isoenzimas de APX são encontradas no

citosol e cloroplasto (estroma e tilacóides), essas sequestram o peróxido de hidrogênio em detrimento do ascorbato, protegendo as células das plantas contra os efeitos destrutivos do H_2O_2 (KARYOTOU e DONALDSON, 2005). A manutenção de quantidades adequadas de glutathione redutase (GR) parece ser importante para as raízes e a parte aérea de tomateiros, quando estas plantas são expostas ao alumínio por longo período (NOGUEIROL et al., 2015).

2.4. Utilização de tomateiro em estudos e genótipos contrastantes

A prática da enxertia em nível comercial teve início do século XX no Japão (ODA, 2002; KUBOTA et al., 2008), sendo amplamente utilizado na tomaticultura, tanto em cultivos sob ambiente protegido como em campo aberto, visando principalmente evitar doenças causadas por patógenos de solo e também para aumentar o vigor das plantas enxertadas. A utilização de porta-enxertos de tomateiro resistentes a doenças de solo, tem contribuído para viabilizar o cultivo em solos contaminados no plantio de tomate de mesa (BAPTISTA et al., 2006; LOPES et al., 2015), ajudando a evitar o nomadismo desta cultura. Atualmente, o desenvolvimento de porta-enxertos resistentes a patógenos de solo tem sido prioridade para o setor privado e em algumas instituições de pesquisa no mundo todo (SCOTT et al., 2005; HUET, 2014). Contudo, praticamente não há linhas de pesquisa que estejam direcionadas para a avaliação e desenvolvimento de tecnologia, em genótipos de porta-enxerto em tomateiro, que visem aumentar a tolerância a estresses abióticos e reduzir a contaminação das partes comestíveis das plantas com elementos tóxicos.

Os problemas com a contaminação de solos agrícolas por metais pesado, tem aumentado rapidamente (GUIMARÃES et al., 2008), ao passo que as estratégias de manejo para lidar com estes contaminantes de solo têm avançado de forma mais lenta. Atualmente, vivenciamos um cenário no qual a maior parte dos estudos acadêmicos têm sido direcionados para entender os problemas de contaminação dos solos e plantas por metais, sendo limitados os trabalhos que têm contribuído com propostas e estudos de novas estratégias de manejo para o cultivo em áreas contaminadas. Dentre os metais cuja absorção pode causar toxicidade nas plantas, o metal pesado Cd merece certo destaque, uma vez que poucas espécies vegetais possuem algum grau de tolerância a este metal (SOUZA et al., 2013). Contudo, alguns trabalhos tem demonstrado que existe variabilidade genética e potencial para a seleção de genótipos com algum grau de tolerância ao Cd, em estudos utilizando o tomateiro como modelo (PIOTTO et al., 2014; PIOTTO et al., 2018). Ainda assim, são raros os estudos cujo foco seja a tolerância ao Cd em espécies cultivadas, e ainda mais raros os trabalhos nos quais sejam apresentadas estimativas de perdas agrícolas pelo estresse causado por este metal.

Diversos estudos têm sido realizados no sentido de desvendar as relações entre o estresse causado por Cd e as alterações no metabolismo oxidativo celular (GRATÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2011), para encontrar mutantes tolerantes (PIOTTO et al., 2014), avaliar o impacto na qualidade dos frutos (CARVALHO et al., 2018), entre outros. Contudo, quase todos os estudos disponíveis envolvendo Cd em tomateiro, são voltados para explicar os padrões de tolerância dos genótipos, principalmente desvendando alterações nos mecanismos bioquímicos de resposta ao estresse.

Infelizmente, raríssimos são os estudos cuja abordagem seja o desenvolvimento de estratégias de manejo, as quais possam contribuir para reduzir o estresse causado pelo Cd em plantas hortícolas e reduzir a contaminação das partes comestíveis. Quando este problema é comparado aos danos causados, por exemplo, pelo estresse hídrico e a salinidade do solo, fica difícil entender a necessidade de direcionar estudos para estratégias de manejo para os metais pesados. No entanto, este problema vai muito além do que conseguimos entender de forma mais imediata, pois um dos principais problemas do cultivo de hortícolas em solos contaminados com metais pesados não é necessariamente a perda de produção, mas sim a contaminação dos alimentos que serão consumidos pelo homem e animais. O grande problema nesse caso se deve ao fato de que o Cd é similar aos micronutrientes Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Manganês (Mn) (CARVALHO et al., 2018a).

Nogueirol et al. (2016) desenvolveram trabalho com dois genótipos de tomateiro (Calabash Rouge e CNPH 0082), em dois tipos de solos tratados com doses de Cd, com objetivo de avaliar a resposta do sistema antioxidante produtivo, nutricional e enzimático dessas plantas. Como resultados os autores observaram que o teor biodisponível e os teores totais de Cd no solo aumentaram como resultado das doses desse metal aplicadas, e como consequência, a biomassa da parte aérea e das raízes diminuiu em ambos os genótipos (com exceção do CNPH 0082 cultivado em solo argiloso). O tratamento com Cd resultou em desequilíbrios nutricionais, principalmente em algumas nutrientes como foi o caso do Mn. Plantas submetidas a um elevado teor disponível de metal no solo exibiram aumento dos indicadores de estresse e atividade aumentada de enzimas do sistema antioxidante, como catalase, nos tecidos vegetais.

No trabalho de Borges et al. (2018) foram destacadas as respostas ao estresse induzido por Cd ($35 \mu\text{M CdCl}_2$) em raízes de dois genótipos de tomateiro, que contrastam na tolerância ao Cd: o tolerante Pusa Ruby e o sensível Calabash Rouge. Os genótipos de tomate exibiram uma tendência semelhante de acúmulo de Cd nos tecidos, principalmente no sistema radicular e as plantas em geral exibiram redução no peso da matéria seca. Ambos os genótipos

apresentaram tendências semelhantes para o acúmulo de malondialdeído e peróxido de hidrogênio com aumentos quando expostos ao Cd, sendo esta resposta mais pronunciada no genótipo sensível. No que diz respeito à maquinaria antioxidante, na presença de Cd o teor reduzido de glutatona foi diminuído nas raízes, enquanto a atividade de enzimas do sistema antioxidante, como glutatona redutase (GR), foi aumentada na presença de Cd no genótipo tolerante. Os resultados desse trabalho de acordo com os autores sugerem que a GR é um dos principais agentes do metabolismo antioxidante contra o estresse oxidativo induzido por Cd.

Piotto et al. (2018) relataram a existência de genótipos de tomateiro bastante contrastantes quando a tolerância ao Cd, mas praticamente não há estudos que envolvam a capacidade de tomateiros mais tolerantes de reduzir a absorção deste metal, por meio do uso de enxertia. Tais estudos gerariam informações que poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de porta-enxertos de tomateiro com tolerância a metais pesados, trazendo uma alternativa de manejo pelo uso de porta-enxertos. Uma vez que a metodologia de enxertia em tomateiro é bem conhecida e extensivamente utilizada pelos produtores, os resultados deste tipo de pesquisa podem dar origem à novas tecnologias utilizando enxertia para esta finalidade.

Enfim, considerando a importância econômica da cultura, as características quando às áreas de cultivo com maior probabilidade de ocorrência de solos contaminados por Cd e a facilidade com que a enxertia entre genótipos pode ser realizada, podemos dizer que o tomateiro é um modelo adequado para o propósito de compreender melhor os mecanismos de tolerância, assimilação e translocação de metais pesados pelas raízes das plantas, e como estes mecanismos poderiam contribuir para reduzir o estresse causado por esse metal, bem como reduzir a contaminação das partes comestíveis, usando a técnica de enxertia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento em casa de vegetação

3.1.1. Material vegetal

Neste estudo foram utilizados seis acessos com níveis de tolerância ao Cd, que foram selecionados dentre os 35 genótipos avaliados e descritos em Piotto et al. (2018), quanto ao Índice de Tolerância ao Cd, e também em outros trabalhos conforme reportado na literatura (CARVALHO et al., 2018a, 2019). Os acessos de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) utilizados neste trabalho são oriundos do banco de germoplasma do Departamento de Genética da Esalq/USP, sendo os seguintes: Yoshimatsu (USP09), Tropic Two Orders (USP20), Calabash Rouge (USP17), Indigo Rose (USP15), Rotam-4 (USP158) e Hawaii 7996 (USP163). Os tomates USP17 e USP20 são classificados como sensíveis ao Cd, enquanto que os demais apresentam níveis de tolerância variáveis a este oligoelemento (CARVALHO et al., 2018a, 2019; PIOTTO et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2021). Todos os genótipos foram usados como porta-enxertos e copas, em todas as combinações possíveis, formando trinta combinações de copa e porta-enxerto e mais seis enxertias de cada genótipo sobre ele mesmo, totalizando 36 tratamentos.

3.1.2. Obtenção das mudas e procedimento de enxertia

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em Piracicaba-SP. Para obtenção das mudas enxertadas (genótipos usados como porta-enxertos), as sementes de tomateiro foram semeadas em substrato à base de fibra de coco (Golden Mix®, Amafibra), utilizando bandejas de poliestireno de alta densidade (cor preta) de 162 células, nas quais cada célula possuía capacidade para 31 mL de substrato (tamanho e volume comuns para produção de mudas de tomateiro). A fertirrigação das mudas foi iniciada no 10º dia após a semeadura, utilizando uma solução composta de 0,50 g.L⁻¹ de Nitrato de Cálcio, 0,20 g.L⁻¹ de Nitrato de Potássio, 0,20 g.L⁻¹ de Sulfato de Magnésio e 0,05 g.L⁻¹ de Rexolin® Yara Vita. As fertirrigações foram realizadas nas segundas, quarta e sextas-feiras, no final da tarde, utilizando um regador manual. Para o manejo preventivo de doenças fúngicas, serão realizadas aplicações dos fungicidas Galben M (3 g.L⁻¹) e Ridomil Gold (3 g.L⁻¹), em semanas alternadas, a partir da segunda semana após a semeadura.

As plantas com 25 dias de idade (hipocótilo com aproximadamente 2,0 mm de Ø) foram enxertadas umas sobre as outras, de acordo com o esquema apresentado na tabela 1. A técnica de enxertia empregada foi o corte em bisel, unindo copa e porta-enxerto com auxílio de pequenos cliques de enxertia, feitos de silicone (Figura 1A). Depois de enxertadas, as plântulas foram mantidas em câmara úmida (Figura 1B), com auxílio de umidificadores, e escura por cinco dias, sendo posteriormente levadas para telado coberto com manta aluminizada, para aclimação por mais cinco dias, no qual foi realizado o aumento gradativo da exposição à luz. Passado este período, as plântulas estavam aptas para uso no experimento. Durante o período de cinco dias em câmara úmida e escura, as plantas receberam somente água, sendo retomada a fertirrigação e aplicação de fungicidas somente após retirada das plantas desta condição. Foram necessários 15 dias adicionais para que as plantas retomassem o crescimento e a nutrição, para então instalar o experimento.

De forma complementar, os resultados foram analisados de acordo com a metodologia de análise dialélica proposta por Griffing (1956), método I, onde foram incluídos os genitores e cruzamentos recíprocos. Na verdade, fizemos uma adaptação desta metodologia, a qual foi inicialmente proposta para a combinação de genótipos formados por alelos de dois genitores, em combinações híbridas aos pares. Neste caso, a composição de cada genótipo enxertado foi dada pela combinação entre os genótipos usados como copa e como porta-enxerto, cuja união dos efeitos da combinação dos alelos foi tecido-específica. Uma vez que foram utilizadas as combinações em enxertias recíprocas, foi possível desdobrar com detalhes a contribuição de cada genótipo utilizado como copa e como porta-enxerto, na tolerância geral de cada planta enxertada, tendo como referência cada genótipo enxertado sobre ele mesmo. Com isso, os efeitos das capacidades gerais e específicas de combinação entre genótipos, pretendia-se demonstrar efeitos sinérgicos, neutros ou antagônicos nas combinações entre genótipos com variação no nível de tolerância ao Cd.

Tabela 1. Combinações entre genótipos (G), em sua utilização como copa e porta-enxerto, na qual a notação Gx / Gy, corresponde ao genótipo Gx como copa e Gy como porta-enxerto, sendo Gy / Gx sua combinação recíproca. Já notação Gy / Gy = Gx / Gx, que indica a enxertia de um genótipo sobre ele mesmo. Os sub índices que aparecem juntamente com cada genótipo são relativos à sua caracterização como sendo tolerantes (T) ou sensíveis (S) ao Cd.

Genótipos	G1 _T	G2 _T	G3 _T	G4 _T	G5 _S	G6 _S
G1 _T	G1 _T /G1 _T	G2 _T /G1 _T	G3 _T /G1 _T	G4 _T /G1 _T	G5 _S /G1 _T	G6 _S /G1 _T
G2 _T	G1 _T /G2 _T	G2 _T /G2 _T	G3 _T /G2 _T	G4 _T /G2 _T	G5 _S /G2 _T	G6 _S /G2 _T
G3 _T	G1 _T /G3 _T	G2 _T /G3 _T	G3 _T /G3 _T	G4 _T /G3 _T	G5 _S /G3 _T	G6 _S /G3 _T
G4 _T	G1 _T /G4 _T	G2 _T /G4 _T	G3 _T /G4 _T	G4 _T /G4 _T	G5 _S /G4 _T	G6 _S /G4 _T
G5 _S	G1 _T /G5 _S	G2 _T /G5 _S	G3 _T /G5 _S	G4 _T /G5 _S	G5 _S /G5 _S	G6 _S /G5 _S
G6 _S	G1 _T /G6 _S	G2 _T /G6 _S	G3 _T /G6 _S	G4 _T /G6 _S	G5 _S /G6 _S	G6 _S /G6 _S

Dessa forma, todos os genótipos foram usados como porta-enxertos e todos foram usados como copas, em todas as combinações possíveis, totalizando 30 combinações copa/porta-enxerto e mais seis enxertias de cada genótipo sobre ele mesmo, totalizando 36 tratamentos.

3.1.3. Instalação e condução do experimento

Após o período de aclimação das mudas, as plântulas foram transferidas para solução nutritiva, em hidroponia (pH inicial = 6,0 ± 0,1), com 50% de força iônica da solução de Hoagland e Arnon (1950), nos tratamentos de 0 e 35 µM de CdCl₂ (PIOTTO et al., 2018). Para tanto, foram construídos tanques para receber as soluções nutritivas, feitos com blocos de cimento de 30 cm x 20 cm x 20 cm (Figura 1C). Cada tanque com medidas internas de 4,0 x 0,5 m (Figura 1D). As estruturas de blocos foram revestidas com manta geotêxtil (Figura 1E), manta de poliéster com forte aderência aos blocos e baixa permeabilidade, sobre as quais foram acrescentadas camadas duplas de plástico preto (Figura 1F), para impermeabilizar a estrutura do tanque, preparando o tanque para que o mesmo recebesse a solução nutritiva.

A distribuição homogênea da solução nutritiva e o nível adequado de oxigenação foram mantidos por sistema de bomba de ar. Para isso, no fundo destes tanques foi colocada uma mangueira de borracha acoplada à uma pequena bomba de aquário, a qual foi a responsável por captar a solução de uma ponta do tanque e fazer a descarga da mesma na outra ponta do tanque, de modo a criar um fluxo contínuo na solução nestes tanques. A oxigenação da solução foi complementada utilizando pequenas bombinhas de ar de aquário, adaptadas a pedrinhas porosas, visando aumentar a superfície de contato do ar com a solução, otimizando a oxigenação da mesma.

Para a realização deste experimento foi necessário preparar quase 2000 L de solução nutritiva, utilizando duas caixas d'água de 1000 L (Figura 1G). Foram colocados 228 L de solução nutritiva por tanque, equivalente à 1L de solução disponível/planta, para que as mudas (Figura 1H) fossem imediatamente transplantadas para estes. Placas de isopor foram dispostas sobre a superfície da solução, contendo furos espaçados em 8 cm entre linhas da parcela e 10 cm entre linhas das parcelas (Figuras 1I e 1J). Cada parcela foi composta por seis plantas, sendo as 36 combinações sorteadas nas linhas (bloco). As plantas foram retiradas das bandejas, tendo suas raízes cuidadosamente lavadas e, posteriormente, foram acondicionadas nos furos feitos nas placas de isopor, com uma espuma (Figura 1J) entre o caule da plântula e o isopor.

3.1.4. Indução de estresse para avaliação de tolerância ao Cd

Em aproximadamente 25 a 35 dias após a germinação (considerando o tempo total entre o cultivo e enxertias), as plântulas foram transferidas para solução de Hoagland e Arnon (1950) em hidroponia ($\text{pH} = 6,0 \pm 0,1$), contendo 20% da força iônica total, afim de evitar estresses pela solução salina. Passados dois dias de adaptação, a solução foi trocada por outra contendo concentração de 50% do total de sais, acrescida de Cd na concentração de $35 \mu\text{M}$ de CdCl_2 , sendo esta uma concentração que reduz o crescimento das plantas em aproximadamente 50% (PIOTTO et al., 2018). No tratamento controle, o procedimento foi o mesmo, contudo não foi aplicado Cd à solução.

Durante um período de oito dias, o volume evapotranspirado foi repostado somente com água deionizada diariamente, a partir de calibração do volume conhecido. Logo após a instalação do experimento (Figura 2A), o volume da solução de cada tanque foi calibrado, para que fosse possível a reposição diária do volume evapotranspirado. Na figura 2A, é possível ter uma ideia geral da disposição das plantas após o transplante para os tanques com

solução nutritiva. Este experimento foi realizado em esquema fatorial 2 x 36 (2 concentrações de Cd: 0 e 35 μM de CdCl_2 e 36 combinações de genótipos) em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e seis plantas por parcela e foram instaladas bordaduras no início e final dos tanques. A aeração da solução foi feita utilizando-se bombinhas de aquário ligadas à mangueiras de plástico com pedras porosas nas pontas, para injeção de ar e oxigenação do sistema. A temperatura da solução (T, $^{\circ}\text{C}$), a condutividade elétrica (CE, $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) e o pH, foram monitorados diariamente ao longo do período do experimento, permanecendo em $\text{pH} = 6,9 \pm 0,18$, $\text{CE} = 1,21 \pm 0,39 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ e temperatura $T = 30,28 \pm 0,78$ $^{\circ}\text{C}$.



Figura 1. Estrutura para instalação do experimento com enxertias recíprocas. A) Plântulas de tomate recém enxertadas; B) Câmara úmida para acondicionar as plantas recém enxertadas; C) Visão geral da montagem dos tanques com blocos; D) Detalhe da montagem dos tanques com blocos; E) Manta geotêxtil colocada sobre os tanques; F) Plásticos colocados sobre os tanques; G) Preparo da solução nutritiva em caixas d'água; H) Mudas prontas para transplante; I) Tanques prontos para receber as mudas; J) Início do transplante das mudas.



Figura 2. Visão geral da evolução do experimento até a coleta das plantas. A) Experimento recém instalado; B) Sintomas das plantas aos cinco dias após a aplicação do metal pesado Cd; C) Genótipos do tratamento sem Cd; D) Genótipos do tratamento com Cd; E) Visão geral do experimento no dia coleta, com oito dias após a aplicação de Cd; e F) Coleta das plantas.

Aos quatro dias após a aplicação do metal pesado Cd (35 μM de CdCl_2), foi possível observar os primeiros sintomas de toxidez por Cd, com o aparecimento de clorose nas folhas mais jovens. Já no quinto dia, tais sintomas se mostraram-se bastante evidentes e algumas diferenças visuais no nível de clorose das folhas de cada tratamento começaram a ficar evidentes (Figuras 2B). Ao completar oitos dias de exposição ao Cd, a diferença no nível de clorose entre as plantas expostas ao Cd e das plantas que não foram expostas ao metal era marcante (Figuras 1C e 1D), podendo ter uma visão geral do experimento (Figura 1E). Conforme figura 2F, neste momento foi realizada a coleta das plantas para análise de tolerância, quantificação de Cd e nutrientes, análises morfológicas do sistema radicular e análises bioquímicas.

As plantas coletadas para mensurar produção e nutrição foram colocadas em sacos de papel e dispostas em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 65 °C por 72 horas. Em seguida, foram pesadas em balança de precisão analítica para obtenção da massa seca das folhas (g.planta^{-1}), massa seca dos caules (g.planta^{-1}), massa seca das raízes (g.planta^{-1}) e massa seca total (g.planta^{-1}). Enquanto, parte das plantas de cada parcela tiveram os sistemas radiculares intactos armazenados em recipientes plásticos em solução de etanol 25% para sua conservação e posterior, determinação dos parâmetros dos sistemas radiculares.

3.2. Quantificação de Cádmio e nutrientes

As amostras de raízes, caules e folhas desidratadas foram usadas para determinar a quantidade de Cd e nutrientes acumulados em cada um destes órgãos. Essa quantificação foi feita por meio de extração assistida por microondas, determinada por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), no Laboratório de Análises Ambientais, do Departamento de Solos, da Esalq/USP. Através da quantificação de Cd nos diferentes tecidos, foi também calculado o Índice de Translocação (ITr), somente para este metal, o qual é dado pela fórmula:

$$\text{ITr} = (\text{Acúmulo de Cd Parte Aérea})/(\text{Acúmulo de Cd Total}) \times 100$$

Para calcular o acúmulo de Cd, os valores de concentração Cd obtidos nos tecidos ($\mu\text{g.g}^{-1}$) foram usados para determinar a quantidade total de Cd nas raízes, caules e folhas, conforme os valores de massa seca dos referidos tecidos.

3.3. Análises metabólicas

As avaliações metabólicas compreenderam as determinações dos indicadores de estresse oxidativo de plantas peróxido de hidrogênio e malondialdeído e as atividades das enzimas do sistema antioxidante das plantas: catalase (CAT), glutatona redutase e superóxido dismutase (SOD). Inicialmente, foi realizada extração com 1g de amostra de tecido vegetal macerado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio (100 mmol.L^{-1}) e polivinilpolipirrolidona (PVPP), usando o almofariz em caixa de isopor com gelo. O extrato foi centrifugado a 10.000 rpm à temperatura de 4 °C por 30 minutos, o sobrenadante foi armazenado em freezer -80 °C.

3.3.1. Análise de indicadores bioquímicos de estresse oxidativo

As análises metabólicas realizadas contaram com as determinações dos indicadores de estresse oxidativo das plantas, peróxido de hidrogênio e malondialdeído, produto da peroxidação lipídica. As três enzimas, constituintes do sistema antioxidante das plantas, que foram determinadas são CAT, GR e SOD. Para isso, as raízes e folhas das plantas enxertadas e não enxertadas foram coletadas e congeladas utilizando nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em ultra freezer à -80 °C para que posteriormente fossem realizadas as seguintes análises metabólicas.

3.3.1.1.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um dos principais indicadores de estresse nas células. Essa determinação foi feita pelo teste do TBA (ácido 2-tiobarbitúrico). O teor de substâncias reativas ao ácido (TBARS) foi quantificada como produto final do processo de peroxidação de lipídios, com leituras a 535 e 600 nm. O teor de MDA (ácido malondialdeído) foi calculado conforme a equação específica para a reação (MIHARA et al., 1980).

3.3.1.1.2. Concentração de H₂O₂

A determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi realizada conforme Gay et al. (1999) e Hermes-Lima (1995), com algumas modificações. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm, assim como a curva padrão.

3.3.1.2. Enzimas do sistema antioxidante das plantas

Inicialmente, para que fosse possível a determinação enzimática (CAT, GR e SOD), foi realizada a extração de proteínas. Esta extração foi realizada utilizando 1 g de amostras de tecido vegetal macerado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio e PVPP (polivinilpirrolidona), com o auxílio de um almofariz disposto em caixa de isopor com gelo. O tampão fosfato de potássio utilizado (100 mM de pH 7,5) foi utilizado em mistura com ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) 1 mM e ditioneitol (DTT) 3 mM. O extrato foi posteriormente centrifugado a 10.000 rpm com temperatura a 4 °C por 30 minutos, sendo armazenado o sobrenadante em freezer -80°C.

3.3.1.2.1. Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977) e Cembrawska-Lech et al., (2015) em espectrofotômetro. A reação foi conduzida em uma câmara de reação (caixa) sob iluminação de lâmpada fluorescente a 25 °C. O meio de reação é composto por tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, NBT 63 µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 1,3 µM. A medida foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm.

3.3.1.2.2. Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada em solução para reação constituída por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,025 mL de peróxido de hidrogênio (0,03%). A reação foi iniciada em 25 µL de extrato protéico, sendo realizada a leitura à temperatura de 25 °C, sendo a atividade determinada por meio da decomposição de peróxido de hidrogênio por alterações na absorbância à 240 nm.

3.3.1.2.3. Glutathione Redutase (GR)

A atividade da GR foi determinada por espectrofotometria em mistura de reação constituída por 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), 0,5 mL de 5,5'-dithio-bis (2-ácido nitrobenzóico – DTNB) a 1 mM, 100 µL de glutathione oxidase (GSSG) 1 mM e 100 µL de NADPH 0,1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de extrato e a redução

da concentração de glutathiona oxidada foi monitorada por 1 min, isso foi feito por meio da relação da concentração de glutathiona oxidada e da absorvância no comprimento de onda de 412 nm.

3.4. Parâmetros radiculares e índice de tolerância

3.4.1. Análise de parâmetros do sistema radicular

Para as análises radiculares foi levado em consideração comprimento total de raízes (cm.planta⁻¹) relativo ao diâmetro médio de raízes (mm.raiz⁻¹) em cada classe de diâmetro. As estimativas de tais caracteres foram obtidas pela análise de imagens, utilizando o software WinRHIZO Arabdopsis (Reagent Instruments Inc., Quebec, Canadá) acoplado a um scanner profissional Epson Expression 11000XL, com definição 400 dpi segundo o protocolo modificado de Trachsel et al. (2009).

As amostras de raízes, caules e folhas desidratadas foram usadas para determinar a quantidade de Cd e nutrientes acumulados em cada um destes órgãos. Essa quantificação foi feita por meio de extração assistida por microondas, determinada por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), Por meio da quantificação de Cd nos tecidos, foi também calculado o Índice de Translocação (ITr), somente para este metal, o qual é dado pela fórmula:

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

Para calcular o acúmulo de Cd, os valores de concentração Cd obtidos nos tecidos (µg.g⁻¹) foram usados para determinar a quantidade total de Cd nas raízes, caules e folhas, conforme os valores de massa seca dos referidos tecidos.

3.4.2. Índice de tolerância

A estimativa do Índice de Tolerância foi obtida por fórmula que compara o acúmulo de biomassa das plantas na presença de Cd e as que cresceram na sua ausência, as quais são referência do potencial máximo para o acúmulo de biomassa de cada tratamento conforme proposto por Piotto et al. (2018). As plantas coletadas para sacos de papel foram colocadas

para desidratar em estufa com circulação de ar forçada, à temperatura de 65 °C por 72 horas ou até a obtenção de massa constante. Em seguida, as plantas foram pesadas em balança de precisão analítica para obtenção da massa seca das folhas (g.planta⁻¹), massa seca dos caules (g.planta⁻¹), massa seca das raízes (g.planta⁻¹) e massa seca total (g.planta⁻¹). A estimativa do Índice de Tolerância foi obtida pela fórmula proposta por Piotto et al. (2018), apresentada abaixo:

$$IT_i = \frac{MS_{S_i} - C}{\overline{MS}_{ns_i} - C}$$

Onde:

IT_i = Índice de Tolerância da planta i sob estresse causado por Cd;

MS_{S_i} = Massa seca total da planta i sob estresse causado por Cd;

$\overline{MS}_{ns_i} = \frac{\sum_{i=1}^n MS_{ns_i}}{n}$ = Massa seca média das i plantas na ausência do metal;

$C = \frac{\sum_{i=1}^n MS_i}{n}$ = Fator de correção, composto pela massa média das plantas antes da exposição ao metal.

3.5. Análises estatísticas

3.5.1. Delineamento experimental e análises estatísticas

Todas as variáveis coletadas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) e obtidos os valores de LSD ($p < 0,05$), quando as mesmas apresentaram diferenças estatísticas significativas. As análises de Cd nos tecidos foram realizadas com base no efeito de cada combinação de genótipos, calculado pela diferença das plantas expostas ao Cd e do controle: $\Delta_{\text{resposta}} = [\text{variável}]_{\text{em_Cd}} - [\text{variável}]_{\text{sem Cd}}$. Assim, foram apresentadas as diferenças (Δ_{resposta}), juntamente com os valores de LSD, como referência para validar as diferenças estatísticas. Os valores de LSD foram obtidos por meio das ANOVAs, de acordo com o modelo de análise em esquema fatorial. Todas as análises foram realizadas usando o software R versão 3.2.3.

3.5.2. Análises genético-estatísticas

As combinações oriundas das enxertias não compõem um dialelo clássico. Contudo, tal como observado nos trabalhos de análise dialélica envolvendo a hibridação entre genitores, no presente trabalho é apresentada uma abordagem bastante inovadora. Nesta abordagem, os fenótipos de cada genótipo avaliado foram compostos pela combinação de dois outros genótipos, como na análise dialélica. A única diferença é que, ao invés dos genótipos terem origem na união de alelos em combinações híbridas, a união dos alelos neste caso foi feita pela conjugação de partes das plantas, nas quais foi possível mensurar os efeitos das combinações recíprocas. Assim, para análise dialélica foi utilizada a metodologia proposta por Griffing (1956), método I, onde foram incluídas n^2 combinações ($n = 6$, $n^2 = 36$ genótipos), por meio do seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + g_i + g_j + s_{ij} + r_{ij} + \bar{\varepsilon}_{ij}$$

em que:

y_{ij} : valor médio da combinação híbrida ($i \neq j$) ou do genitor ($i = j$);

μ : média geral;

g_i e g_j : efeitos da capacidade geral de combinação do i -ésimo e do j -ésimo genitor, respectivamente;

s_{ij} : efeito da capacidade específica de combinação para os cruzamentos entre os genitores de ordem i e j ;

r_{ij} : efeito recíproco que mede as diferenças proporcionadas pelo genitor i ou j , quando utilizado como copa ou porta-enxerto nas ij combinações;

$\bar{\varepsilon}_{ij}$: erro experimental médio.

A análise de capacidade de combinação foi realizada somente para as variáveis: Cd no Caule, Cd nas Folhas, IT e ITr. O efeito de Cd nas raízes não foi significativo para tal análise. A significância dos valores de capacidade de combinação, foi avaliada de acordo com os limites calculados pelo Desvio Padrão da média dos valores (D.P.), tomado como referência para indicar a magnitude de significância de tais efeitos calculados.

4. RESULTADOS

4.1. Análise dialélica para tolerância, translocação e acúmulo de Cd nos tecidos

A concentração de Cd em tecidos de raízes, caules e folhas foi detectada apenas no tratamento em que este metal foi aplicado, sendo que os valores de Cd no tratamento controle estavam abaixo do nível de detecção do ICP-OES. Da mesma forma, o ITr só leva em consideração as plantas que absorveram Cd e o IT transforma os dados dos tratamentos com e sem o estresse pelo metal (completo), em valores relativos por genótipo. Assim, todas as cinco variáveis analisadas nesta primeira parte, possuem a mesma estrutura, com 36 tratamentos (seis auto enxertias e 30 combinações de enxertias entre genótipos), com três blocos, oriunda, portanto, de um mesmo modelo de análise.

Na tabela 2, são apresentadas as análises de variâncias para os genótipos, capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, além dos recíprocos (REC), para os caracteres de concentração de Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) nas raízes, caules e folhas, ITr e IT. Os valores apresentados são dos quadrados médios (variâncias), com as respectivas significâncias pelo teste F de Fisher.

Tabela 2. Análise de variância para a capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação, e efeito dos recíprocos (REC), para os caracteres concentração de Cd nas raízes, caules e folhas ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), Índice Translocação (ITr) e Índice de Tolerância (IT), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

F.V.	G.L.	Q.M.				
		[Cd] Raízes	[Cd] Caule	[Cd] Folhas	ITr	IT
Blocos	2	2699618**	62303**	75399**	0,0474**	0,0024 ^{ns}
Genótipos	35	298372 ^{ns}	13953**	20512**	0,0046*	0,0196*
CGC	5	177559 ^{ns}	20843,7**	24498,4**	0,0026*	0,0122*
CEC	15	67130 ^{ns}	849,7 ^{ns}	1100,3 ^{ns}	0,0008 ^{ns}	0,0015 ^{ns}
REC	15	129068 ^{ns}	3495,2**	7222,6**	0,0019*	0,0097*
Resíduo	70	66095	840,3	1362,6	0,0008	0,0034
C.V. (%)	-	9,03	12,69	10,84	6,78	12,11

(*) significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; (**) significativo a 1% de probabilidade de erro pelo teste F. (ns) não significativo. F.V. (Fonte de Variação), G.L. (Graus de Liberdade); Q.M. (Quadrado Médio) e C.V. (Coeficiente de Variação)

Na tabela 2 é demonstrado que não houve efeito significativo para as diferenças de concentração de Cd nas raízes, entre as combinações estudadas, não havendo também efeito significativo da CGC, CEC e REC. Isso ocorreu, provavelmente, pois as raízes ficam em contato direto com o metal em solução, absorvendo o metal em quantidades próximas ao limite de sua capacidade. Já no caso de caules e folhas, os efeitos dos genótipos, CGC e REC foram significativos, tendo em vista que estes órgãos dependem do transporte das raízes e também do próprio genótipo usado como copa para regular sua absorção e acúmulo.

Os padrões de concentração de Cd nos tecidos de raízes, caules e folhas foram coerentes e em magnitudes similares ao encontrado em outros trabalhos (PIOTTO et al., 2018; CARVALHO et al., 2017), no qual a maior parte do metal fica retido nas raízes, com menor concentração nos caules e folhas. Houve efeito das combinações recíprocas para a concentração de Cd nas folhas e caules, então neste ponto os termos de comportamento geral dos genótipos para essa característica serão abordados.

Com base nos dados da tabela 3, é possível notar que o genótipo que mais acumulou Cd nas folhas e no caule quando usado como copa, foi o genótipo USP17. Obviamente, os genótipos usados como porta enxerto para o USP17 levaram a efeitos de maior ou menor acúmulo nas folhas, indicando algumas relações de sinergismos ou antagonismos, como será apresentado adiante. Por outro lado, as menores concentrações de Cd nas folhas e caules, que seria o mais desejável, foi proporcionado na média, quando o genótipo USP15 foi usado como copa. De forma adicional, temos que o menor valor de acúmulo deste metal nas folhas, foi também obtido na combinação específica quando o genótipo USP15 foi usado como copa sobre porta-enxerto USP09, que já foi descrito como genótipo resistente (PIOTTO et al., 2018). Enquanto, o genótipo USP09 proporcionou menor concentração de Cd nas folhas dos demais genótipos, quando usado como porta-enxerto.

Um resultado interessante é que não foi identificado efeito da CEC em nenhum caso, não havendo combinações específicas de genótipos que chegassem a integralizar efeito significativo médio de ambas as combinações recíprocas de copa e porta enxerto em dois genótipos específicos. Esse resultado é coerente com a identificação de efeito significativo entre recíprocos, mostrando que as combinações mais específicas entre genótipos usados como copa ou porta-enxertos, possuem impacto na absorção e acúmulo de Cd na parte aérea, o que reflete evidentemente no ITr e no IT das combinações recíprocas. Identificados esses efeitos significativos na tabela 3 são apresentadas as médias de cada combinação de enxertia recíproca, com as médias do efeito médio de porta-enxertos nas linhas e as médias do efeito médio das copas nas colunas. A fim de se ter referências gerais para comparações estatísticas entre médias, foram apresentados os valores de LSD (diferença mínima significativa) para os efeitos de genótipos indicados como significativos. Efeito significativo também foi observado para o caráter ITr (Tabela 4).

Tabela 3. Médias das combinações individuais e conjuntas para os caracteres concentração de Cd nas raízes, caules e folhas [Cd, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$], avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	494,0	406,0	573,1	520,8	517,0	535,0	507,6
	C	357,7	308,5	388,5	367,4	345,0	281,2	341,4
	R	2950,5	2805,9	3011,9	2987,0	2570,5	2931,5	2876,2
USP15	F	652,6	539,5	653,6	668,1	614,3	528,4	609,4
	C	428,4	348,1	470,1	470,0	453,7	308,5	413,1
	R	2755,4	3021,3	3229,9	3255,2	2489,7	2538,8	2881,7
USP17	F	561,1	490,9	615,1	609,3	560,6	519,2	559,4
	C	371,5	355,5	408,3	459,4	361,1	314,1	378,3
	R	2968,7	2827,6	3091,0	2604,7	2326,5	2478,1	2716,1
USP20	F	613,9	588,5	719,4	633,4	662,6	631,3	641,5
	C	451,1	389,3	535,8	465,0	472,5	373,9	447,9
	R	3281,3	3059,7	3360,0	3272,6	2940,2	3054,3	3161,3
USP158	F	673,1	704,5	712,8	743,0	724,8	637,0	699,2
	C	489,7	444,0	482,2	501,4	448,1	360,8	454,4
	R	2817,4	2898,2	3366,7	2263,5	2160,6	2529,7	2672,7
USP163	F	522,9	509,4	656,1	541,0	525,0	430,9	530,9
	C	344,7	300,3	430,9	384,9	303,0	273,8	339,6
	R	2439,6	2493,7	2803,8	2455,7	3260,8	3049,2	2750,5
Média	F	586,3	539,8	655,0	619,3	600,7	547,0	591,3
	C	407,2	357,6	452,6	441,4	397,2	318,7	395,8
	R	2868,8	2851,1	3143,9	2806,4	2624,7	2763,6	2843,1

LSD.F = 104,41; LSD.C = 81,99

Tabela 4. Médias das combinações individuais e conjuntas, para o caráter Índice de Translocação (ITr), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

Genótipos	Copa						Média	
	USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163		
Porta Enxerto	USP09	0,3720	0,3590	0,4266	0,3890	0,3866	0,4105	0,3906
	USP15	0,4444	0,3507	0,4655	0,4482	0,4385	0,4451	0,4321
	USP17	0,4353	0,3869	0,4268	0,4716	0,5058	0,4456	0,4453
	USP20	0,4250	0,4021	0,4059	0,4227	0,4319	0,4112	0,4165
	USP158	0,4305	0,3946	0,4181	0,4814	0,4983	0,4541	0,4462
	USP163	0,4202	0,3922	0,4384	0,4119	0,3170	0,4176	0,3996
Média	0,4212	0,3809	0,4302	0,4375	0,4297	0,4307	0,4217	

LSD = 0,0470

Novamente, é possível notar que o genótipo USP09, quando usando como porta-enxerto, foi aquele que proporcionou menor ITr, juntamente com o genótipo USP163 (Tabela 4). Ao passo que de forma bastante evidente, o genótipo USP15 usado como copa foi aquele que mais contribuiu para reduzir o ITr. O valor mais elevado de ITr foi observado na combinação de USP17 como porta-enxerto e USP158 como copa (ITr = 0,5058).

Na sequência, serão apresentados (Tabela 5) os IT de cada combinação ‘copa x porta-enxerto’ e das ‘auto enxertias’, segundo metodologia de Piotto et al. (2018). Esta leva em consideração a taxa de crescimento somente no período de estresse, tendo também o controle das plantas sem estresse como referência de média robusta para se obter os desvios em função das plantas estressadas. O IT é uma das medidas mais importantes, pois é baseada na taxa de crescimento *per se* de cada genótipo e combinação, que é função dos mecanismos de tolerância que podem ser inerentes ao sistema radicular, à parte aérea ou a combinação de ambos, o que pode resultar em sinergismo, antagonismo ou neutralidade pela compensação de mecanismos que atuam em direção oposta para a tolerância.

Como análise geral da qualidade experimental, o IT médio do experimento foi IT = 0,4820, que é muito próximo de 0,5, indicando que em média o estresse por metal reduziu em 48,20% a taxa de crescimento das plantas, o que é razoável para se evitar valores extremos,

muito próximos de 1,0 ou de 0,0. Enfim, o espectro de variação do IT ficou muito próximo ao ótimo para se obter informações fidedignas quanto à tolerância.

Como era esperado, o menor valor de IT foi observado com a auto enxertia do genótipo USP17 (IT = 0,3440), sendo este o principal genótipo referência de sensibilidade ao estresse causado pelo metal neste estudo. Dentre as auto enxertias, ou seja, o valor de tolerância per se do genótipo, temos destaque para USP15 (IT = 0,5808), que apresentou IT consideravelmente maior em relação à maioria dos genótipos e suas combinações recíprocas. Este genótipo USP15 também proporcionou maiores valores quando usado como copa. Já em relação aos porta-enxertos, houve destaque o genótipo USP163.

Tabela 5. Médias das combinações individuais e conjuntas, para o caráter Índice de Tolerância (IT), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

Genótipos	Copa						Média	
	USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163		
Porta Enxerto	USP09	0,4568	0,552	0,4324	0,5581	0,3972	0,4917	0,4814
	USP15	0,4306	0,5808	0,4090	0,4358	0,4198	0,5237	0,4666
	USP17	0,5686	0,5922	0,3440	0,4420	0,3760	0,3974	0,4534
	USP20	0,4053	0,6276	0,4758	0,4730	0,4242	0,3799	0,4643
	USP158	0,5149	0,5919	0,3954	0,5542	0,4669	0,3829	0,4844
	USP163	0,4698	0,6295	0,4663	0,6140	0,5556	0,5179	0,5422
Média	0,4743	0,5957	0,4205	0,5129	0,4400	0,4489	0,4820	

LSD = 0,0953

Deste ponto para adiante, serão apresentadas as análises sobre o estudo de Capacidade de Combinação entre as diferentes copas e porta-enxertos. Uma vez que somente a Capacidade Geral de Combinação (CGC) e o efeito dos Recíprocos (REC) deram significativos, vamos apresentar as análises de acordo com estes parâmetros. Na tabela 6, são apresentados os valores de CGC para concentração de Cd em caules e folhas, ITr e IT. A CGC mede a concentração geral de alelos favoráveis para uma determinada característica, sendo função dos efeitos aditivos. Neste estudo, os resultados foram muito interessantes e evidenciaram o efeito geral de cada genótipo sobre os caracteres avaliados.

Com relação à concentração de Cd nos caules, a análise mostrou que todas as combinações que possuem USP20 como copa ou porta-enxerto possuem maior tendência de acumular Cd neste tecido (Tabela 6). De forma oposta, todas as combinações que envolvem o genótipo USP163 tendem a acumular menos Cd nos

caules e também nas folhas. Quanto ao ITr, a análise indicou que os genótipos USP09 e USP15, na média de suas combinações tanto como copa como porta-enxerto, contribuem para reduzir a translocação de Cd para a parte aérea das plantas, ao passo que USP17 e USP158 tendem a proporcionar maiores valores de ITr. Já para o IT, dois genótipos apresentaram comportamentos diametralmente opostos, sendo que na média, todas as combinações que tinham USP15 tendem a ter maiores valores de IT, o que se apresenta de forma oposta ao genótipo USP17, que levou à redução do IT na média de suas combinações.

Tabela 6. Estimativa da capacidade geral de combinação (\hat{g}_i), avaliada em dialelo completo com seis genitores, incluindo os recíprocos, para os caracteres Concentração de Cd nos caules e folhas [Cd, $\mu\text{g.g}^{-1}$], Índice Translocação (ITr) e Índice de Tolerância (IT).

Genitores	Caule [Cd]	Folhas [Cd]	ITr	IT
USP09	-21,50	-44,38	<u>-0,0158</u>	-0,0042
USP15	-10,40	-16,72	<u>-0,0152</u>	<u>0,0491</u>
USP17	19,67	15,85	<u>0,0160</u>	<u>-0,0451</u>
USP20	<u>48,86</u>	39,06	0,0053	0,0065
USP158	30,00	<u>58,60</u>	<u>0,0162</u>	-0,0199
USP163	<u>-66,63</u>	<u>-52,41</u>	-0,0007	0,0135
D.P.	41,68	45,18	0,0143	0,0319

D.P. = Desvio Padrão

Essa visão geral sobre a CGC é importante, porém, uma vez que foi identificado efeito das combinações recíprocas, é necessário desdobrar o estudo para que os efeitos específicos de cada combinação entre copa x porta-enxerto seja revelado. Nas próximas tabelas serão então apresentados os efeitos das combinações de enxertias recíprocas para concentração de Cd nos caules e folhas, ITr e IT, mostrando quais combinações são mais vantajosas, visando reduzir o acúmulo deste metal na parte aérea das plantas, reduzindo o ITr e aumentando o IT.

Na tabela 7 são apresentados os efeitos dos recíprocos para concentração de Cd nos caules das plantas. Valores positivos indicam que determinada combinação proporcionou aumento na concentração de Cd nos caules, sendo que valores negativos indicam o inverso. É importante notar que os valores possuem mesmo número com sinal inverso, mostrando que uma determinada combinação copa x porta-enxerto, possui efeito de magnitude inversa quando se avalia o recíproco.

Assim, na tabela 7 vemos que USP15 quando usado como copa sobre USP09, promove redução na concentração de Cd no caule, ao passo que quando temos USP09 como copa de USP15 ocorre o aumento da concentração desse metal no caule. Esse raciocínio vale para demais efeitos, como exemplo, vemos que USP15 usado como copa nas enxertias sobre USP09, USP20 e USP158 teve efeito positivo na redução de Cd nos caules. Já esse mesmo genótipo USP15 usado como porta enxerto de USP09, USP17 e USP20, levou ao aumento da concentração de metal nos caules destas combinações, mostrando sua maior eficiência como copa.

Um dos efeitos mais importantes a ser considerado é concentração de Cd nas folhas. Na tabela 8, vemos que houve um efeito específico altamente relevante de redução de Cd nestes tecidos, utilizando USP15 como copa e USP09 como porta-enxerto. Essa combinação já havia chamado a atenção na tabela 3, uma vez que foi esta aquela que apresentou menor valor geral na concentração de Cd nas folhas.

Tabela 7. Estimativa do efeito das enxertias recíprocas (r_{ij}), avaliada em dialelo completo com seis genitores, incluindo os recíprocos, para o caráter Concentração de Cd nos caules [Cd, $\mu\text{g.g}^{-1}$].

Genótipos	Copa					
	USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163
USP09	-	<u>-59,95</u>	8,49	<u>-41,82</u>	<u>-72,38</u>	-31,74
USP15	<u>59,95</u>	-	<u>57,25</u>	<u>40,35</u>	4,88	4,10
USP17	-8,49	<u>-57,25</u>	-	-38,19	<u>-60,54</u>	<u>-58,39</u>
USP20	<u>41,82</u>	<u>-40,35</u>	38,19	-	-14,48	-5,46
USP158	<u>72,38</u>	-4,88	<u>60,54</u>	14,48	-	28,87
USP163	<u>31,74</u>	-4,10	<u>58,39</u>	5,46	-28,87	-

D.P. = 38,85

Tabela 8. Estimativa do efeito das enxertias recíprocas (r_{ij}), avaliada em dialelo completo com seis genitores, incluindo os recíprocos, para o caráter Concentração de Cd nas folhas [Cd , $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$].

Genótipos	Copa					
	USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163
USP09	-	<u>-123,33</u>	5,98	-46,53	<u>-78,07</u>	6,07
USP15	<u>123,33</u>	-	<u>81,35</u>	39,80	-45,13	9,48
USP17	-5,98	<u>-81,35</u>	-	-55,05	<u>-76,09</u>	<u>-68,45</u>
USP20	46,53	-39,80	55,05	-	-40,23	45,15
USP158	<u>78,07</u>	45,13	<u>76,09</u>	40,23	-	56,00
USP163	-6,07	-9,48	<u>68,45</u>	-45,15	-56,00	-

D.P. = 58,92

De certa forma, a tabela 9 mostra certa coerência acerca dos resultados anteriores sobre o efeito de algumas combinações. Este novamente é o caso do genótipo USP15 usado como copa de USP09, cuja combinação específica de copa x porta-enxerto contribuiu para promover menor valor de ITr de Cd para a parte aérea. Neste caso, é possível observar também efeitos significativos na redução do ITr nas combinações em que foram usados os genótipos USP20 e USP158 como porta-enxerto de USP17. Neste caso, temos que o USP17 é o genótipo mais sensível e um dos que mais acumula Cd nas folhas, tendo efeito positivo de redução deste metal nos tecidos, pelo uso de porta-enxertos mais tolerantes e mais eficientes em evitar que o Cd seja absorvido pela parte aérea das plantas.

Tabela 9. Estimativa do efeito das enxertias recíprocas (r_{ij}), avaliada em dialelo completo com seis genitores, incluindo os recíprocos, para o caráter Índice de Translocação (ITr).

Genótipos	Copa						
	USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	-	<u>-0,0427</u>	-0,0044	-0,0180	-0,0220	-0,0048	
USP15	<u>0,0427</u>	-	<u>0,0393</u>	0,0230	0,0220	0,0264	
Porta Enxerto	USP17	0,0044	<u>-0,0393</u>	-	<u>0,0329</u>	<u>0,0438</u>	0,0036
	USP20	0,0180	-0,0230	<u>-0,0329</u>	-	-0,0248	-0,0002
	USP158	0,0220	-0,0220	<u>-0,0438</u>	0,0248	-	<u>0,0685</u>
	USP163	0,0048	-0,0264	-0,0036	0,0002	<u>-0,0685</u>	-

D.P. = 0,0303

A tabela 9 mostrou também o efeito mais pronunciado de redução de translocação de Cd para a parte aérea das plantas, proporcionado pelo genótipo USP163, quando usado como porta-enxerto que recebeu USP158 como copa. Essa combinação também é outra que chamou a atenção por apresentar o menor valor geral ITr, o que foi confirmado nesta análise dos recíprocos. Mais uma vez, os resultados vêm consolidando a hipótese de que existem mecanismos distintos de absorção e acúmulo de Cd em cada genótipo, relacionados à parte aérea e sistema radicular de cada um.

Por fim, temos o Índice de Tolerância que, como mencionado anteriormente, agrega a resposta geral do estresse causado pelo Cd, uma vez que a principal característica afetada por esse metal é desenvolvimento das plantas. Na tabela 10, vemos que a maior parte das combinações recíprocas apresentou efeito significativo para o IT. O que chama a atenção é que todas combinações que tiveram o genótipo USP15 como copa, apresentaram valores positivos e significativos de tolerância ao Cd, o que não aconteceu com nenhum outro genótipo. Em relação as combinações recíprocas no que refere aos porta-enxertos, USP163 teve destaque por contribuir para aumentar a tolerância dos genótipos USP15, USP20 e USP168, sem efeito significativo como porta-enxerto de USP09. De forma geral, temos que USP15 foi o mais importante como copa para aumentar a tolerância dos genótipos usado

como porta-enxerto, ao passo que USP163 foi mais efetivo como porta-enxerto para aumentar a tolerância de quase todos os genótipos deste estudo, usados como copa.

Tabela 10. Estimativa do efeito das enxertias recíprocas (r_{ij}), avaliada em dialelo completo com seis genitores, incluindo os recíprocos, para o caráter Índice de Tolerância (IT).

Genótipos	Copa					
	USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163
USP09	-	<u>0,0607</u>	<u>-0,0681</u>	<u>0,0764</u>	<u>-0,0588</u>	0,0110
USP15	<u>-0,0607</u>	-	<u>-0,0916</u>	<u>-0,0959</u>	<u>-0,0860</u>	<u>-0,0529</u>
USP17	<u>0,0681</u>	<u>0,0916</u>	-	-0,0169	-0,0097	-0,0344
USP20	<u>-0,0764</u>	<u>0,0959</u>	0,0169	-	<u>-0,0650</u>	<u>-0,1171</u>
USP158	<u>0,0588</u>	<u>0,0860</u>	0,0097	<u>0,0650</u>	-	<u>-0,0863</u>
USP163	-0,0110	<u>0,0529</u>	0,0344	<u>0,1171</u>	<u>0,0863</u>	-

D.P. = 0,0571

4.2. Análise da morfologia externa das raízes

As raízes são a porta de entrada para o Cd nas plantas, e por esse motivo é importante identificar os padrões de variações na morfologia externa do sistema radicular, as quais possam estar associadas às diferenças nos níveis de tolerância e absorção de deste metal e de outros nutrientes. Para tanto, as amostras intactas dos sistemas radiculares foram analisadas com o auxílio do software WinRHIZO Arabdopsis (Reagent Instruments Inc., Quebec, Canadá) acoplado a um scanner profissional Epson Expression 11000XL, com definição 400 dpi, conforme protocolo modificado de Trachel (2009). Os resultados apresentados neste trabalho são os considerados mais importantes, dentre os inúmeros resultados obtidos por essa análise, que seria o comprimento total do sistema radicular, além do comprimento total das raízes com diâmetro $D < 0,5$ mm e comprimento total das raízes com diâmetro $D > 0,5$ mm.

As raízes com $D < 0,5$ mm são consideradas radículas, ou seja, aquelas raízes de diâmetro muito reduzido, responsáveis pela maior parte da absorção de água, nutrientes e também, nesse caso, de Cd. Por conta disso, o comprimento (quantidade) total das radículas, pode dar indícios tanto do efeito do Cd sobre os genótipos e combinações, quanto indicar a

existência de algum padrão morfológico de alteração que pode estar mais ou menos associado à capacidade de absorção do metal e também da própria tolerância. Assim, é importante que haja destaque para essa característica. Novamente, foi considerada a diferença na presença e ausência do tratamento com Cd para cada variável. Nas tabelas, os valores negativos indicam efeito de redução e positivos de aumento no comprimento das raízes de cada classe diâmetro. Contudo, somente os valores sublinhados indicam que tais diferenças são significativas.

Na tabela 11, fica evidente que o Cd levou à uma redução, na grande maioria dos casos, tanto do comprimento total das raízes, como em cada classe de diâmetro. Isso mostra o efeito danoso e direto deste metal pesado no sistema radicular das plantas. Porém, é possível notar que existem alguns padrões aparentes, sendo que algumas combinações de alguns genótipos foram potencialmente piores, o que é indicado pela presença de maior quantidade de efeitos significativos de redução. Esse é o caso do genótipo USP09 quando este é usado como copa, tendo aparentemente proporcionado uma redução no comprimento total das radículas de pelo menos 4 combinações nas quais ele foi utilizado. Este fato é interessante, pois mostra que a parte aérea de determinados genótipos deve ter influência no comportamento da morfologia externa do sistema radicular, provavelmente por meio de mecanismos de sinalização celular, gerando respostas específicas ao Cd.

Contudo, embora a redução mais significativa das radículas tenha ocorrido nas combinações que usaram USP09 como copa, estas combinações apresentaram valores de Índice de Translocação e IT relativamente dentro das médias, o que pode indicar algum nível de dano nas radículas pelo Cd, que poderia ter contribuído para reduzir a absorção e transporte do mesmo para a parte aérea das plantas. Por outro lado, esse padrão não se repetiu no caso das combinações que usaram o genótipo USP163 como porta-enxerto, o qual apresentou somente um valor de combinação significativa de redução das radículas, quando o mesmo foi enxertado com USP15. Curiosamente, esta combinação copa USP15 e porta-enxerto USP163, foi aquela que mostrou o maior Índice de Tolerância deste estudo e também um dos menores Índices de Translocação de Cd para a parte aérea das plantas. Vale notar que o valor da redução das radículas nessa combinação foi numericamente próxima ao limite de significância, o que demonstra que isto ocorreu, embora de forma significativa, em baixa magnitude, o que poderia também ter contribuído para os maiores valores de IT e menores valores de ITr observados. De forma geral, o efeito de não redução significativo do comprimento do sistema radicular do genótipo USP163 em praticamente todas as combinações, reforça a hipótese de que este genótipo possui mecanismos de tolerância mais fortemente associados ao sistema radicular.

Por fim, as alterações na morfologia do sistema radicular relativas as combinações de genótipos usados como copa e porta-enxerto, mostram que há efeitos específicos de cada combinação, dentre os quais é possível notar algumas tendências importantes relacionadas ao conjunto específico de combinações que usam o genótipo USP163 como porta-enxerto.

4.3. Concentração de nutrientes nas plantas de tomateiro

Nas tabelas 12 a 14, temos uma demonstração geral das diferenças, de plantas sob estresse por Cd e das plantas controle, para as concentrações de macronutrientes catiônicos das folhas, caules e raízes. Enquanto na tabela 15, esses valores são apresentados para as concentrações de S em folhas, caules e raízes. Inicialmente, são apresentadas na tabela 12 as médias para as concentrações do macronutriente potássio (K) de cada combinação copa x porta-enxerto e das auto enxertias dos genótipos de tomateiro estudados para as partes das plantas. Na tabela 12 pode-se observar que a maioria das combinações de genótipos não apresentou alterações significativas, contudo a concentração de K reduziu nos caules de algumas combinações. Essa redução ficou evidente nos caules das plantas com o porta-enxerto USP09 quando foram combinados com os genótipos USP15 e USP20. Essa mesma tendência foi observada quando o genótipo USP17, como porta-enxerto. Além dessas combinações, é visível que nas plantas com o genótipo USP163, como copa, com a utilização de USP158, como porta-enxerto, também ocorreu redução de K nos caules na presença de Cd.

Tabela 11. Médias das combinações individuais e conjuntas, para comprimento por classe de diâmetro (cm) nas raízes, avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Diâmetro	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	T	<u>-2833,9</u>	-780,8	-900,2	-1522,1	-1533,5	-1288,4	-1476,5
	<0,5	<u>-2791,1</u>	-766,7	-825,6	-1111,8	<u>-1372,3</u>	-1064,9	-1322,1
	>0,5	-42,9	-14,1	-74,6	<u>-410,3</u>	-161,2	-223,5	-154,4
USP15	T	<u>-2315,9</u>	-1384,9	-641,9	-1287,2	-679,0	-1297,9	-1267,8
	<0,5	<u>-2359,0</u>	<u>-1315,0</u>	-700,2	-1202,3	-728,6	-1142,5	-1241,3
	>0,5	43,2	-69,8	58,3	-84,9	49,6	-155,3	-26,5
USP17	T	<u>-4930,0</u>	<u>-1587,3</u>	<u>-2140,3</u>	-734,0	-1432,3	-1521,8	-2057,7
	<0,5	<u>-4439,8</u>	<u>-1542,6</u>	<u>-1786,2</u>	-647,8	-1233,0	<u>-1331,8</u>	-1830,2
	>0,5	<u>-490,2</u>	-44,8	-354,1	-86,2	-199,4	-190,0	-227,5
USP20	T	<u>-4967,2</u>	280,0	-430,9	-1010,9	<u>-3261,4</u>	-608,4	-1666,5
	<0,5	<u>-4518,1</u>	-21,8	-303,4	-1084,7	<u>-3030,1</u>	-665,1	-1603,9
	>0,5	<u>-449,1</u>	301,7	-127,5	73,8	-231,4	56,7	-62,6
USP158	T	-757,5	<u>-1675,2</u>	-1280,1	<u>-2786,4</u>	-1186,6	-1548,9	-1539,1
	<0,5	-867,9	<u>-1646,0</u>	<u>-1306,1</u>	<u>-2344,5</u>	-1193,2	<u>-1417,7</u>	-1462,5
	>0,5	110,4	-29,3	25,9	<u>-442,0</u>	6,6	-131,1	-76,6
USP163	T	-1308,1	-1421,3	-1005,0	-954,4	-1445,5	-222,2	-1059,4
	<0,5	-1083,7	<u>-1324,5</u>	-860,5	-1015,1	-1137,8	-253,5	-945,8
	>0,5	-224,4	-96,7	-144,5	60,7	-307,8	31,3	-113,6
Média	T	<u>-2852,1</u>	-1094,9	-1066,4	-1382,5	<u>-1589,7</u>	-1081,3	-1511,2
	<0,5	<u>-2676,6</u>	-1102,8	-963,7	-1234,4	<u>-1449,2</u>	-979,3	-1401,0
	>0,5	-175,5	7,8	-102,8	-148,2	-140,6	-102,0	-110,2

(T): Comprimento total do sistema radicular (cm); (<0,5): Comprimento total das raízes (cm) com menos de 0,5 mm de diâmetro; (>0,5): Comprimento total das raízes (cm) com mais de 0,5 mm de diâmetro.

Tabela 12. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de K nas folhas, caules e raízes (mg.kg⁻¹), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	9116,6	-1362,8	5097,6	-6320,8	1786,3	-1444,4	1145,4
	C	-7219,5	<u>-14048,6</u>	5962,6	<u>-11197,7</u>	1488,4	-3956,2	-4828,5
	R	8056,5	1154,5	8493,1	2362,2	895,3	-458,0	3417,3
USP15	F	<u>11028,1</u>	-5484,6	2520,4	-230,4	-2636,5	1075,2	1045,4
	C	2772,3	909,1	-718,9	-824,2	-4994,8	-322,9	-529,9
	R	<u>14294,2</u>	2780,1	-643,2	3079,4	3663,2	8559,8	5288,9
USP17	F	2400,0	-1450,7	<u>-7274,9</u>	3771,2	610,3	4962,1	503,0
	C	<u>-10451,0</u>	-5555,8	4556,1	-294,1	-3543,1	2295,4	-2165,4
	R	-5274,5	2031,0	<u>-2360,4</u>	8825,6	-3072,1	2492,6	440,4
USP20	F	6327,4	1184,2	-2494,8	6268,3	<u>14086,9</u>	1744,8	4519,5
	C	-4040,8	-6527,0	7274,4	-5501,4	-7018,6	-5316,1	-3521,6
	R	8575,7	2689,9	1565,2	<u>-1297,2</u>	20037,8	6224,6	6299,3
USP158	F	6085,6	4062,0	7535,8	523,1	2822,6	3282,3	4051,9
	C	-1845,7	-2899,9	-9361,5	631,9	2295,8	<u>-11155,6</u>	-3722,5
	R	-1751,9	345,9	-546,8	-4542,5	-6464,6	6765,3	-1032,4
USP163	F	-7609,5	-8659,0	-1062,8	4251,0	-2903,5	-4863,3	-3474,5
	C	-1070,0	-8362,6	159,3	<u>-12281,7</u>	-4142,1	<u>-9698,3</u>	-5899,2
	R	1208,0	4693,5	9585,4	5882,7	12593,5	9741,7	7284,2
Média	F	4558,0	-1951,8	720,2	1377,1	2294,3	792,8	1298,4
	C	-3642,5	-6080,8	1312,0	-4911,2	-2652,4	-4692,3	-3444,5
	R	4184,7	2282,5	2682,2	2385,0	4608,9	5554,3	3616,3

LSD.F = 9151,58; LSD.C = 9051,76; LSD.R = 10665,69

Quando o genótipo USP163 foi utilizado como porta-enxerto para a copa USP20 e em auto enxertia a redução desse cátion nos caules também foi identificada, mas nas demais combinações que esse porta-enxerto foi usado não houveram reduções significativas. Isso pode indicar que o K desses caules foi priorizado para estratégias de defesa das plantas sob estresse, uma vez que os caules não são áreas de concentração do metal. É importante ressaltar que o genótipo USP163, quando utilizado como porta-enxerto, contribuiu para a redução da translocação de Cd e aumento do IT para algumas combinações. É fundamental considerar que não só o aumento da concentração de um nutriente, como o K, nas partes das plantas pode ser positivo, mas a não alteração da concentração desse sob condições de toxidez por Cd também é algo benéfico para as plantas.

Aumentos significativos da concentração de K ocorreram em folhas e raízes da combinação do porta-enxerto USP15 com USP09. Essa elevação do K nas folhas contribui com sistema de defesa das plantas, este mecanismo que condiz com os genótipos USP15 e USP09, genótipos que foram descritos como resistentes por Piotto et al. (2018). O K participa da ativação enzimática, síntese de proteínas, fotossíntese, movimento estomático e regulação osmótica e, dessa forma, é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (AHMAD et al., 2016). Lembrando que, no presente trabalho, os genótipos USP09 e USP15, como copa ou porta-enxerto, reduziram a translocação de Cd para a parte aérea das plantas, como esperado para genótipos resistentes. Essa elevação da concentração de K também pode ser vista nas folhas das plantas com USP20, como porta-enxerto, combinado com USP158, como copa.

É importante ressaltar que o Cd não apresenta nenhuma função biológica, por isso não existem transportadores ou canais específicos para esse metal. Assim, a entrada de Cd nas células vegetais ocorre por canais de cátions como cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) ou por transportadores de cátions divalentes como Zn^{2+} , cobre (Cu^{2+}) ou Fe^{2+} (NAZAR et al., 2012). Na tabela 13 pode-se observar que o Cd não aumentou significativamente as concentrações de Ca de nenhuma parte das plantas estudadas, e somente houve aumento de Mg nas folhas de uma combinação (Tabela 14). Em algumas combinações, o Ca foi reduzido significativamente em partes aéreas das plantas, sendo importante ressaltar que o Ca é um nutriente imóvel nas plantas (Tabela 13).

Na tabela 14, demonstra-se que nas plantas com o porta-enxerto USP158 não houveram alterações significativas na concentração de Mg. Enquanto, com utilização do porta-enxerto USP17 a única combinação de genótipos que apresentou alteração na concentração de Mg foi a combinação com o genótipo USP09, no qual houve uma redução

significativa nos caules. Quando os genótipos descritos como resistentes (PIOTTO et al., 2018) USP09 e USP15 foram combinados houve redução significativa para a concentração de Mg em caules e raízes, com o porta-enxerto USP15 e a copa USP09. Enquanto para a combinação inversa desses genótipos ocorreu redução significativa de Mg nas folhas das plantas. No trabalho de Carvalho et al. (2018a) com tomateiro, plantas expostas ao Cd apresentaram baixas concentrações de Mg nas folhas e melhoria na tolerância ao metal devido a relação com o K que contribuiu positivamente para o desenvolvimento da planta, provavelmente por meio da modulação da partição da biomassa. Isso pois o grau de tolerância do tomate à exposição ao Cd, por um curto período, depende da regulação ativa e fina da homeostase mineral que promove o desenvolvimento diferencial do órgão. (CARVALHO et al., 2018a).

Tabela 13. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Ca nas folhas, caules e raízes (mg.kg⁻¹), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	<u>-9837,2</u>	<u>-8957,5</u>	-3756,7	-3249,4	460,5	-1731,4	-4511,9
	C	<u>-7175,6</u>	298,3	-606,2	-2302,7	-2134,7	-2372,2	-2382,2
	R	<u>-130,7</u>	<u>-24,1</u>	<u>-376,8</u>	<u>-480,9</u>	<u>98,8</u>	<u>-322,5</u>	-206,0
USP15	F	<u>-9746,6</u>	-1450,7	-3697,7	-3244,0	-352,1	-7721,3	-4368,7
	C	<u>-9109,9</u>	-1253,0	-723,2	698,7	-3001,2	526,4	-2143,7
	R	<u>204,3</u>	<u>-17,4</u>	<u>-973,1</u>	<u>-1414,1</u>	<u>-673,4</u>	<u>-479,1</u>	-558,8
USP17	F	<u>-8351,8</u>	-4515,6	<u>-6974,4</u>	-3703,0	-1091,2	-4258,6	-4815,8
	C	<u>-7241,2</u>	-2300,4	-1742,2	-3040,5	-752,7	-2078,5	-2859,2
	R	<u>1684,4</u>	<u>-186,8</u>	<u>866,4</u>	<u>-1076,3</u>	<u>909,7</u>	<u>-133,9</u>	343,9
USP20	F	<u>-10398,4</u>	<u>-5243,2</u>	<u>-6732,0</u>	<u>-2959,0</u>	1106,2	<u>-8598,2</u>	-5470,8
	C	<u>-6592,2</u>	-1236,1	-2874,8	-945,2	180,9	-2000,0	-2244,6
	R	<u>694,9</u>	<u>56,5</u>	<u>-283,9</u>	<u>-120,4</u>	<u>-348,2</u>	<u>-949,6</u>	-158,4
USP158	F	1009,5	-1252,2	<u>-5988,3</u>	1227,9	<u>-1930,2</u>	-3087,3	-1670,1
	C	822,8	-885,9	-1675,5	-956,6	71,6	-1168,3	-632,0
	R	<u>-56,5</u>	<u>-1392,5</u>	<u>-92,1</u>	<u>-3127,8</u>	<u>32,6</u>	<u>539,0</u>	-682,9
USP163	F	-1069,7	-4475,1	<u>-7336,8</u>	-4230,7	-939,0	<u>-9525,7</u>	-4596,2
	C	<u>-3624,9</u>	-2035,2	-2716,0	-699,7	-965,1	-2588,7	-2104,9
	R	<u>-849,8</u>	<u>-54,9</u>	<u>-307,9</u>	<u>924,0</u>	<u>347,4</u>	<u>917,7</u>	162,8
Média	F	<u>-6399,0</u>	<u>-4315,7</u>	<u>-5747,7</u>	<u>-2693,0</u>	<u>-457,6</u>	<u>-5820,4</u>	-4238,9
	C	<u>-5486,8</u>	<u>-1235,4</u>	<u>-1723,0</u>	<u>-1207,7</u>	<u>-1100,2</u>	<u>-1613,5</u>	-2061,1
	R	<u>257,8</u>	<u>-269,9</u>	<u>-194,6</u>	<u>-882,6</u>	<u>61,2</u>	<u>-71,4</u>	-183,2

LSD.F = 4869,97; LSD.C = 3477,83; LSD.R = 1907,99

Tabela 14. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Mg nas folhas, caules e raízes (mg.kg^{-1}), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	712,0	<u>-1262,2</u>	13,3	-491,9	5,0	335,8	-114,7
	C	<u>-1865,6</u>	48,9	-406,4	481,7	-18,8	-678,6	-406,5
	R	<u>-1287,4</u>	<u>-934,8</u>	<u>-2988,5</u>	<u>-3862,5</u>	48,0	<u>-92,5</u>	-1519,6
USP15	F	6,0	<u>-707,1</u>	-371,5	-566,5	-203,0	<u>-1153,6</u>	-499,3
	C	<u>-1040,0</u>	172,3	-202,7	146,3	-268,9	254,9	-156,3
	R	<u>-4766,7</u>	<u>-1485,4</u>	502,0	-1422,8	-81,9	-1311,3	-1427,7
USP17	F	-150,8	-182,4	474,7	-128,5	-22,3	258,4	41,5
	C	<u>-861,2</u>	-361,0	-201,2	-42,5	457,7	-571,8	-263,3
	R	<u>-1236,6</u>	<u>-1100,2</u>	<u>-377,9</u>	0,2	<u>-1587,6</u>	<u>-1893,6</u>	-1032,6
USP20	F	220,8	236,6	<u>-1240,1</u>	766,1	<u>1356,6</u>	-437,2	150,5
	C	-748,0	-574,9	126,2	-787,2	356,2	-852,3	-413,3
	R	508,3	<u>-563,9</u>	<u>-688,2</u>	<u>-981,0</u>	<u>-614,0</u>	<u>-619,0</u>	-493,0
USP158	F	159,7	-154,9	-302,8	391,6	329,6	637,2	176,7
	C	853,0	691,5	-44,6	136,6	80,8	-252,0	244,2
	R	1035,3	1999,7	2257,0	250,7	<u>-1888,3</u>	-18,5	606,0
USP163	F	-205,5	<u>-1180,9</u>	-701,6	1159,0	501,8	<u>-1316,5</u>	-290,6
	C	<u>-957,2</u>	<u>-878,3</u>	-692,8	-523,6	<u>-939,4</u>	<u>-897,9</u>	-814,9
	R	<u>-2395,7</u>	<u>-2614,7</u>	684,2	-13,5	2500,0	<u>-23,9</u>	-310,6
Média	F	123,7	-541,8	-354,7	188,3	327,9	-279,3	-89,3
	C	-769,8	-150,2	-236,9	-98,1	-55,4	-499,6	-301,7
	R	-1357,1	-783,2	-101,9	-1004,8	-270,6	-659,8	-696,2

LSD.F = 946,72; LSD.C = 856,85; LSD.R = 2723,59

Uma visão geral do valor de delta de variação para as concentrações de S em folhas, caules e raízes é apresentada na tabela 15, para as combinações de genótipos estudadas. Quando a copa das plantas foi o genótipo USP09, pelo menos em alguma parte da planta, houve redução significativa na concentração de S para todas as combinações. Enquanto, com o porta-enxerto USP20 apenas uma combinação não apresentou redução significativa em folhas e/ou raízes, combinação com o genótipo USP158 como copa. Esta mesma combinação, foi a única que apresentou aumento significativo de Mg nas folhas, conforme tabela 14. Houve também redução significativa na concentração de S em folhas de plantas com o porta-enxerto USP163, com a utilização das copas USP09, USP15 e USP163 (auto enxertia), e redução em raízes quando a copa foi USP20. Quando o porta-enxerto USP158 foi utilizado houve redução significativa do S nas raízes em combinação com as copas USP09 e USP20, o que ocorreu também nas plantas com auto enxertia de USP158.

A redução significativa de S em folhas na presença de Cd, ocorreu no maior número de combinações quando foi usado o porta-enxerto USP20, e em três combinações com o uso do porta-enxerto USP163. Em comum, tem-se que ambos os genótipos quando combinados com as copas USP20 e USP158 não apresentaram redução significativa de S na parte aérea das plantas. Como também visto, no presente trabalho, houve redução significativa da translocação de Cd para a parte aérea de plantas com o porta-enxerto USP163 quando foi combinado com a copa USP158. A indução de vias metabólicas que demandam S pode ser um mecanismo de defesa desses genótipos na presença de Cd para a redução da concentração do metal nas folhas.

A presença de Cd não aumentou significativamente a concentração de S em nenhuma das partes das plantas das combinações de genótipos do presente estudo. Uma vez que a disponibilização de nutrientes foi realizada uma única vez para as plantas, devido ao curto período experimental, a elevação da absorção de S no momento avaliado neste estudo, como mecanismo de defesa das plantas pode não ter sido possível. A absorção de S e produção de compostos que contenham esse macronutriente é essencial para o desempenho de funções críticas em muitos processos biológicos, incluindo o papel de compostos contendo S para a homeostase de plantas sob estresse de elementos químicos (NA e SALT, 2011). As plantas receberam, no presente estudo, apenas quantidades de nutrientes suficientes para satisfazer os requisitos para o desenvolvimento vegetal adequado de plantas de tomateiro. Dessa forma, com o estresse oxidativo provocado pelo excesso de Cd, as plantas utilizaram os nutrientes disponibilizados para o crescimento e desenvolvimento normal, também na produção de compostos do sistema oxidativo para atuarem contra as EROs. A redução da concentração

desse nutriente provavelmente tem relação com o aumento da produção de compostos, que demandam S, do metabolismo antioxidante das plantas, ao longo de todo o experimento na presença de Cd.

Na tabela 15, também é demonstrado que quando a copa foi USP09 combinada com os genótipos resistentes USP09 (auto enxertia) e USP15, essa redução significativa do S ocorreu no sistema radicular e no caule das plantas. Contudo, quando a copa USP09 foi combinada com os genótipos sensíveis (PIOTTO et al.,2018) USP17 e USP20, como porta-enxerto, a redução significativa de S ocorreu nas folhas e raízes. Esse resultado evidencia, a diferença dos mecanismos de defesa das plantas com copas de genótipos resistentes combinados com porta-enxertos resistentes e sensíveis. Nas enxertias com os porta-enxertos resistentes as plantas priorizaram o S e compostos constituídos por esse nutriente nas folhas em relação as raízes e caules.

Tabela 15. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de S nas folhas, caules e raízes (mg.kg⁻¹), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	-142,5	-2012,8	1088,5	-643,7	617,2	270,4	-137,2
	C	<u>-1627,8</u>	-139,5	118,6	-1101,2	-319,4	-575,7	-607,5
	R	<u>-3896,4</u>	-1453,0	381,5	-1626,6	192,5	-1127,4	-1254,9
USP15	F	-334,4	-665,1	-446,3	330,9	420,9	-975,4	-278,2
	C	<u>-1459,9</u>	330,9	-23,5	237,1	-577,1	-82,7	-262,5
	R	<u>-3842,8</u>	-787,1	-1045,4	-1671,3	-1227,0	-227,5	-1466,9
USP17	F	<u>-2394,6</u>	-683,7	1422,6	-298,9	1311,9	-516,6	-193,2
	C	-738,4	-541,4	-167,4	-687,5	-501,5	<u>-1150,6</u>	-631,1
	R	<u>-5394,8</u>	-818,3	<u>-377,7</u>	134,4	-1757,1	-1353,3	-1594,5
USP20	F	<u>-2639,0</u>	<u>-1800,0</u>	<u>-1832,0</u>	-881,3	-837,3	<u>-2049,8</u>	-1673,2
	C	-1036,3	-323,5	-149,4	-380,4	-1020,2	<u>-1124,6</u>	-672,4
	R	<u>-4146,8</u>	-936,0	-1018,3	<u>-2089,0</u>	344,7	-1782,1	-1604,6
USP158	F	-381,2	80,5	-302,2	544,5	1366,5	-465,2	140,5
	C	464,2	-220,2	-202,6	-730,2	-203,2	-350,9	-207,1
	R	<u>-2569,1</u>	-819,5	-405,7	<u>-1964,4</u>	<u>-2850,4</u>	-1167,5	-1629,5
USP163	F	<u>-1723,8</u>	<u>-2339,7</u>	-1241,7	-1081,7	-74,6	<u>-3157,9</u>	-1603,2
	C	-778,1	-715,8	-574,0	-149,9	-1022,5	-1047,5	-714,6
	R	-1567,5	-1373,5	-293,3	<u>-2750,8</u>	403,7	-195,5	-962,8
Média	F	-1269,3	-1236,8	-218,5	-338,4	467,4	-1149,1	-624,1
	C	-862,7	-268,3	-166,4	-468,7	-607,3	-722,0	-515,9
	R	<u>-3569,6</u>	<u>-1031,3</u>	<u>-459,8</u>	<u>-1661,3</u>	<u>-815,6</u>	<u>-975,5</u>	<u>-1418,8</u>

LSD.F = 1684,19; LSD.C = 1121,34; LSD.R = 1902,34

O valor do delta de variação para as concentrações dos micronutrientes B, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn são apresentados a seguir, nas tabelas 16 a 21. Na tabela 16, podem ser vistos os valores das médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de B nas folhas, caules e raízes. Para as concentrações de B poucas alterações significativas foram detectadas nas combinações. Entre essas, a concentração de B nas folhas aumentou significativamente com o uso do porta-enxerto USP09, combinado com as copas USP09 (auto enxertia), USP15 e USP17 na presença do metal. Além disso, enquanto a combinação do porta-enxerto USP20 com USP158 promoveu aumento significativo de B nas folhas, quando combinado com a copa USP163 ocorreu a redução significativa de B na parte aérea das plantas na presença de Cd.

Na figura 17, são apresentados os valores de delta para a concentração de Cu nas folhas, caules e raízes. Foi possível identificar o aumento significativo de Cu nas folhas das plantas referentes a maioria das combinações com USP19 como copa, com exceção das combinações com os porta-enxertos USP158 e USP163. Houve também aumento significativo da concentração de Cu nas folhas das plantas com a copa USP158 combinada com os porta enxertos USP09 e USP163. Para a concentração de Fe houveram apenas duas alterações significativas com redução na combinação com o porta-enxerto USP163 utilizando a copa USP15 e com aumento nas plantas auto enxertadas com o genótipo USP158 (Tabela 18).

Fica evidente, a partir da visão geral da concentração de Mn, que houveram reduções significativas da concentração desse micronutriente nas raízes das plantas, para a maioria das combinações de genótipos (Tabela 19), com o Cd. Enquanto, o oposto pode ser identificado para a parte aérea, especialmente para as folhas, de algumas combinações de genótipos na presença do Cd. A copa USP09 destacou-se por apenas uma combinação, com o porta-enxerto USP163, não apresentar com o Cd aumento significativo de Mn nas folhas das plantas. O segundo genótipo, que quando utilizado como copa, apresentou maior número de combinações com elevação significativa, na concentração de Mn nas folhas, foi o genótipo USP158. Além disso, o Cd reduziu significativamente a concentração de Mn no sistema radicular das plantas, da maioria das combinações estudadas. Padrão semelhante ao que ocorreu com o Mn foi identificado para a concentração de Mo (Tabela 20), no qual o Cd elevou a concentração de Mo nas folhas das plantas da maioria das combinações cujo genótipo USP09 foi usado como copa. O aumento significativo, devido ao Cd, na concentração de Mo nas folhas também ocorreu quando a copa USP158 foi combinada com USP09, USP20 e USP163.

Na tabela 21, pode-se observar que poucas alterações foram significativas para a concentração de Zn nas plantas. Ocorreram reduções significativas na concentração de Zn das raízes, na presença de Cd, para apenas três combinações de genótipos. Quando o porta-enxerto USP09 foi combinado com USP15 e USP20 o Cd reduziu a concentração de Zn nas folhas das plantas, com a utilização da copa USP17 houve aumento da concentração de Zn nos caules e com a copa USP163 ocorreu a elevação desse valor para as folhas das plantas. A copa USP163 também apresentou aumento significativo da concentração de Zn nas folhas das plantas na combinação com o genótipo USP17. Tem-se então que existem mecanismos de absorção e translocação de nutrientes relacionados ao acúmulo do Cd que são genótipo-tecido-específico em tecidos de folhas, caules e raízes.

Tabela 16. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de B nas folhas, caules e raízes (mg.kg^{-1}), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	<u>21,61</u>	3,03	-10,83	3,38	12,63	-2,36	4,58
	C	2,93	1,58	0,96	-5,42	-7,18	<u>-8,65</u>	-2,63
	R	<u>-18,78</u>	1,95	<u>-4,75</u>	<u>-2,46</u>	<u>-16,88</u>	<u>-22,06</u>	-10,50
USP15	F	<u>20,11</u>	1,29	2,05	8,31	2,59	-3,04	5,22
	C	2,52	0,82	-2,38	-0,89	-1,44	-5,17	-1,09
	R	<u>-10,87</u>	<u>3,11</u>	<u>0,97</u>	<u>-22,38</u>	<u>-15,68</u>	<u>-18,80</u>	-10,61
USP17	F	<u>16,24</u>	-2,58	<u>24,74</u>	2,42	12,80	-8,55	7,51
	C	-3,86	-0,08	-6,88	-2,52	1,28	-4,94	-2,83
	R	<u>-23,30</u>	<u>-4,35</u>	<u>-20,64</u>	<u>-10,86</u>	<u>-22,95</u>	<u>-26,52</u>	-18,10
USP20	F	14,40	-13,57	-2,59	-0,54	<u>21,29</u>	<u>-16,96</u>	0,34
	C	-2,10	-4,73	-5,95	-5,33	-1,88	<u>-7,63</u>	-4,61
	R	<u>4,56</u>	<u>-11,23</u>	<u>-11,32</u>	<u>-2,37</u>	<u>2,72</u>	<u>3,90</u>	-2,29
USP158	F	10,21	-6,15	-1,03	-1,86	2,11	3,54	1,14
	C	-1,50	-2,17	-1,47	-2,13	-3,83	-5,39	-2,75
	R	<u>-8,30</u>	<u>-13,56</u>	<u>8,28</u>	<u>2,78</u>	<u>0,18</u>	<u>9,13</u>	-0,25
USP163	F	-0,91	5,40	0,04	20,00	12,39	-5,15	5,30
	C	<u>-7,89</u>	-1,51	-2,41	-0,58	<u>-8,72</u>	<u>-7,11</u>	-4,70
	R	<u>-6,27</u>	<u>0,58</u>	<u>10,00</u>	<u>-11,19</u>	<u>-9,50</u>	<u>-23,19</u>	-6,60
Média	F	13,61	-2,10	2,06	5,29	10,64	-5,42	4,01
	C	-1,65	-1,02	-3,02	-2,81	-3,63	-6,48	-3,10
	R	-10,49	-3,92	-2,91	-7,75	-10,35	-12,92	-8,06

LSD.F = 15,93; LSD.C = 7,21; LSD.R = 19,10

Tabela 17. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Cu nas folhas, caules e raízes (mg.kg⁻¹), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	<u>76,76</u>	41,48	-8,90	29,17	<u>105,44</u>	64,12	51,34
	C	4,26	<u>9,96</u>	<u>10,82</u>	-2,78	3,36	-1,53	4,01
	R	-9,66	-19,72	-12,48	-9,20	-1,84	-0,85	-8,96
USP15	F	<u>114,52</u>	7,31	27,04	-15,20	-17,85	-38,22	12,93
	C	5,44	8,36	5,42	2,52	1,22	4,26	4,54
	R	-18,90	-1,88	29,24	36,74	-8,29	-6,42	5,08
USP17	F	<u>67,78</u>	-3,56	30,19	-8,23	33,92	-15,87	17,37
	C	-1,67	1,49	4,00	0,29	5,20	-9,07	0,04
	R	27,99	-10,94	-15,39	5,99	1,21	7,54	2,73
USP20	F	<u>93,16</u>	-15,88	4,98	31,28	58,34	-30,07	23,64
	C	<u>12,15</u>	1,52	5,64	2,93	3,51	5,67	5,24
	R	8,62	-10,25	-28,19	-25,56	9,29	6,99	-6,52
USP158	F	18,11	25,27	-4,37	-34,95	58,56	26,61	14,87
	C	7,07	1,67	0,22	-2,88	-0,60	5,88	1,89
	R	5,77	3,89	22,49	10,73	-8,70	0,19	5,73
USP163	F	5,41	38,37	2,60	75,96	<u>147,72</u>	-11,67	43,06
	C	3,90	-1,06	4,68	5,39	7,36	-3,21	2,85
	R	-7,74	-18,82	6,86	-1,69	35,98	15,45	5,01
Média	F	62,62	15,50	8,59	13,00	64,35	-0,85	27,20
	C	5,19	3,66	5,13	0,91	3,34	0,34	3,09
	R	1,01	-9,62	0,42	2,83	4,61	3,82	0,51

LSD.F = 65,92; LSD.C = 9,57; LSD.R = 52,38

Tabela 18. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Fe nas folhas, caules e raízes (mg.kg^{-1}), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	-228,45	-125,39	3,93	-243,33	42,32	-143,64	-115,76
	C	-87,40	-50,63	-19,47	-66,26	41,87	107,86	-12,34
	R	375,58	-197,95	604,83	437,85	43,62	-676,15	97,96
USP15	F	-244,66	-71,88	-115,93	-40,40	175,11	-199,93	-82,95
	C	-107,72	-99,97	-37,18	133,69	118,42	-38,09	-5,14
	R	296,91	378,27	32,20	94,88	-417,47	-674,43	-48,27
USP17	F	-177,19	-217,62	-198,17	-90,27	97,05	80,39	-84,30
	C	-89,72	-10,64	-144,85	-158,81	129,82	-48,17	-53,73
	R	165,76	-647,57	287,22	10,09	-130,74	-56,54	-61,96
USP20	F	-218,32	-352,05	-156,11	-229,08	69,62	55,87	-138,34
	C	-83,43	-32,58	-71,59	-40,79	160,07	-82,31	-25,10
	R	164,45	260,39	-138,09	238,40	-337,25	-399,00	-35,19
USP158	F	-72,29	-93,39	9,54	-343,42	412,98	106,97	3,40
	C	-131,22	126,52	-120,72	22,73	175,33	73,10	24,29
	R	-409,29	-188,82	205,87	170,84	-57,34	-143,85	-70,43
USP163	F	-88,98	-400,06	-88,08	-300,82	6,79	-196,70	-177,97
	C	20,31	-112,52	-69,06	146,09	-37,80	75,22	3,71
	R	109,09	-318,58	-198,45	-338,31	301,25	-334,00	-129,83
Média	F	-171,65	-210,07	-90,80	-207,88	133,98	-49,51	-99,32
	C	-79,86	-29,97	-77,15	6,11	97,95	14,60	-11,39
	R	117,08	-119,04	132,26	102,29	-99,65	-380,66	-41,29

LSD.F = 358,00; LSD.C = 199,53; LSD.R = 870,25

Tabela 19. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Mn nas folhas, caules e raízes (mg.kg⁻¹), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	<u>107,52</u>	7,99	13,20	28,47	<u>83,59</u>	<u>58,72</u>	<u>49,91</u>
	C	8,42	<u>15,71</u>	13,40	2,79	5,98	0,56	7,81
	R	<u>-931,89</u>	<u>-415,82</u>	-160,20	<u>-276,43</u>	<u>-277,22</u>	-200,04	<u>-376,93</u>
USP15	F	<u>127,58</u>	39,89	16,48	30,41	5,57	-2,86	36,18
	C	11,78	6,02	6,68	13,82	10,28	9,72	9,72
	R	<u>-809,02</u>	<u>-247,59</u>	<u>-397,56</u>	<u>-338,60</u>	<u>-390,70</u>	-181,07	<u>-394,09</u>
USP17	F	<u>113,09</u>	14,95	23,70	39,11	33,99	35,68	43,42
	C	-1,42	-2,53	8,61	-1,93	12,11	-1,48	2,23
	R	<u>-1301,27</u>	<u>-364,60</u>	<u>-224,02</u>	<u>-342,39</u>	<u>-276,21</u>	-178,86	<u>-447,89</u>
USP20	F	<u>139,70</u>	4,17	27,92	34,93	<u>70,79</u>	1,03	<u>46,42</u>
	C	<u>17,63</u>	3,79	7,16	-3,99	<u>15,38</u>	0,01	6,66
	R	<u>-871,09</u>	<u>-240,67</u>	<u>-282,07</u>	<u>-264,86</u>	<u>-219,61</u>	<u>-267,70</u>	<u>-357,67</u>
USP158	F	<u>51,41</u>	<u>46,12</u>	21,63	-12,36	<u>82,10</u>	<u>67,73</u>	42,77
	C	3,89	10,71	3,34	-1,53	2,43	5,66	4,09
	R	-143,44	<u>-253,06</u>	<u>-321,14</u>	78,67	-179,99	-198,83	-169,63
USP163	F	11,60	3,31	-0,41	<u>64,72</u>	<u>63,56</u>	-27,25	19,25
	C	-13,34	-8,53	-5,77	8,59	-5,08	-3,32	-4,58
	R	<u>-308,95</u>	<u>-339,93</u>	<u>-269,12</u>	<u>-528,68</u>	<u>-226,40</u>	-161,15	<u>-305,71</u>
Média	F	<u>91,82</u>	19,41	17,09	30,88	<u>56,60</u>	22,18	39,66
	C	4,49	4,20	5,57	2,96	6,85	1,86	4,32
	R	<u>-727,61</u>	<u>-310,28</u>	<u>-275,69</u>	<u>-278,71</u>	<u>-261,69</u>	-197,94	<u>-341,99</u>

LSD.F = 45,15; LSD.C = 14,51; LSD.R = 218,59

Tabela 20. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Mo nas folhas, caules e raízes (mg.kg^{-1}), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	<u>3,5811</u>	-1,0428	1,9567	1,1261	<u>2,5778</u>	-1,2056	1,1655
	C	-0,0273	0,7794	<u>1,1082</u>	<u>-1,5364</u>	0,1186	<u>-1,1347</u>	-0,1154
	R	<u>-2,1517</u>	<u>-2,6192</u>	0,4933	-1,8663	-0,8686	<u>-2,5615</u>	-1,5957
USP15	F	<u>2,8928</u>	1,0738	-0,4025	<u>2,9907</u>	0,1656	-1,2602	0,9100
	C	<u>-1,0956</u>	0,6493	-0,2359	0,7953	-0,3393	0,5330	0,0511
	R	-0,3584	<u>0,5239</u>	-0,5942	-0,7023	-1,2078	-0,1072	-0,4077
USP17	F	<u>3,4598</u>	-0,7375	<u>3,4245</u>	0,8147	0,7669	0,4807	1,3682
	C	-0,7500	-0,1958	0,1834	-0,1440	-0,0069	-0,4594	-0,2288
	R	<u>-4,3256</u>	-0,1323	<u>1,4868</u>	0,5334	-1,4321	-1,1036	-0,8289
USP20	F	<u>3,0358</u>	-0,4128	1,2848	-0,3223	<u>2,6859</u>	-1,4410	0,8051
	C	-0,7651	-0,0281	-0,3671	-0,5753	-0,5577	-0,6174	-0,4851
	R	<u>-3,3732</u>	-1,4071	-0,2644	<u>-2,6045</u>	-0,6393	-1,7584	-1,6745
USP158	F	1,0459	0,2970	-1,0464	-0,3267	1,7874	0,6131	0,3951
	C	0,1206	0,5733	0,1507	0,0790	-0,3033	-0,0708	0,0916
	R	-1,5137	-1,6503	-0,3235	<u>-4,0516</u>	<u>-2,7731</u>	-0,2479	-1,7600
USP163	F	0,0100	-1,3355	-0,2462	1,5429	<u>4,3152</u>	-1,4423	0,4740
	C	-0,3661	-0,6165	-0,5342	-0,7663	-0,4687	-0,1567	-0,4847
	R	-1,4717	-1,4885	-0,6469	<u>-2,1850</u>	1,0883	-0,5139	-0,8696
Média	F	2,3376	-0,3596	0,8285	0,9709	2,0498	-0,7092	0,8530
	C	-0,4806	0,1936	0,0509	-0,3579	-0,2595	-0,3177	-0,1952
	R	<u>-2,1990</u>	<u>-1,1289</u>	<u>0,0252</u>	<u>-1,8127</u>	<u>-0,9721</u>	<u>-1,0488</u>	<u>-1,1894</u>

LSD.F = 2,57; LSD.C = 1,03; LSD.R = 2,16

Tabela 21. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de Zn nas folhas, caules e raízes (mg.kg^{-1}), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	-2,03	<u>-8,85</u>	-0,31	<u>-11,00</u>	5,40	<u>12,92</u>	-0,65
	C	-4,79	-8,90	<u>21,85</u>	<u>-28,80</u>	-0,87	-10,92	-5,40
	R	<u>-47,98</u>	-16,98	<u>32,77</u>	8,62	<u>-25,87</u>	<u>-23,91</u>	-12,23
USP15	F	5,77	-6,87	3,30	3,83	1,69	0,40	1,35
	C	2,95	-0,05	-3,21	3,66	-0,59	13,06	2,64
	R	-0,98	<u>-9,87</u>	<u>-33,34</u>	<u>-38,76</u>	<u>-15,66</u>	<u>-19,99</u>	-19,77
USP17	F	-3,42	-1,89	4,92	0,47	4,92	<u>10,27</u>	2,55
	C	<u>-20,66</u>	-6,23	3,19	12,41	2,31	0,18	-1,47
	R	<u>-63,31</u>	<u>-23,26</u>	<u>0,62</u>	5,36	1,10	<u>-14,56</u>	-15,67
USP20	F	4,09	-2,39	1,75	<u>10,76</u>	-0,57	-5,15	1,41
	C	5,18	2,82	<u>22,29</u>	17,30	12,45	5,07	10,85
	R	-15,16	-6,70	-23,21	2,86	8,62	<u>-3,92</u>	-6,25
USP158	F	<u>9,33</u>	6,84	-1,81	3,09	7,26	-1,10	3,93
	C	5,97	6,11	10,65	13,45	18,55	-5,83	8,15
	R	-19,72	-29,20	-23,48	11,33	<u>-11,14</u>	2,58	-11,60
USP163	F	-2,80	-0,92	-1,50	<u>10,08</u>	5,43	-6,26	0,67
	C	-3,47	-18,62	7,49	-4,59	-5,84	-8,14	-5,53
	R	<u>-10,75</u>	17,68	-12,13	-41,85	<u>-40,10</u>	0,18	-14,49
Média	F	1,82	-2,35	1,06	2,87	4,02	1,85	1,55
	C	-2,47	-4,14	10,38	2,24	4,34	-1,10	1,54
	R	-26,32	-11,39	-9,79	-8,74	-13,84	-9,94	-13,34

LSD.F = 8,75; LSD.C = 18,99; LSD.R = 34,83

4.4. Análise de indicadores de estresse oxidativo

O Cd é um metal pesado que causa estresse oxidativo nas plantas, como consequência de uma série de eventos que ocorrem em nível celular (GILL e TUTEJA, 2010), em que as EROs podem causar danos a lipídios, proteínas e até mesmo ao próprio DNA (AHMAD et al., 2008). O estresse em si não é mensurável, mas de forma indireta é possível quantificar substâncias indicadoras da ocorrência do estresse oxidativo. Neste sentido, temos que a principal substância indicadora de estresse é o malondialdeído (MDA), formado pela peroxidação lipídica (MONTEIRO et al., 2011). O MDA é formado a partir da peroxidação de lipídeos de membrana, quando há excesso de EROs nas células, as quais reagem com ácidos graxos formando esse composto (GRATÃO et al., 2005).

Além do MDA, é possível quantificar mais facilmente uma das EROs, o H_2O_2 , que é um dos principais responsáveis pela peroxidação lipídica. Porém, este não é o único capaz de causar danos às membranas das células e por esse motivo, não podemos dizer que todo o estresse é decorrente do acúmulo H_2O_2 nas células. Todavia, grande parte da peroxidação lipídica e produção de MDA é devida à ação do H_2O_2 sobre os lipídeos de membrana, sendo conveniente avaliar sua concentração nos tecidos, de forma a traçar algumas relações com o estresse e a peroxidação lipídica de forma geral. No caso deste experimento, as análises bioquímicas foram feitas somente nos tecidos de raízes e folhas, pois os tecidos de caule (herbáceo) não resultam em volume suficiente de amostra e também, de forma geral, são mais difíceis de apresentar alguma alteração significativa neste tipo de análise. Já em folhas e raízes, se tornam possíveis tais aferições, uma vez que as raízes são o órgão que, neste caso, fica em contato direto com o Cd que é fator estressante em excesso na solução nutritiva, e as folhas representam os tecidos que respondem aos estímulos e efeitos do agente estressante.

Nas tabelas 21 e 22, podemos ter uma visão geral sobre as diferenças nas concentrações de H_2O_2 e MDA, respectivamente, para os tecidos de folhas e raízes. Vale lembrar que aqui temos o valor do delta de variação, obtido a partir da diferença entre H_2O_2 e MDA das plantas sob estresse por Cd e das plantas controle. Assim, valores positivos e significativos (sublinhados) indicam que o Cd aumentou significativamente o valor destes indicadores em dada combinação. Valores negativos e sublinhados indicam o inverso. Já os valores negativos ou positivos que não estão sublinhados, indicam que não houve diferença estatística para tais variáveis, entre plantas de uma dada combinação, na presença e ausência de Cd.

Na tabela 21, é possível observar que foram poucas as diferenças significativas para a concentração de H_2O_2 nos tecidos de raízes e folhas, das combinações. Contudo, alguns padrões são interessantes, pois observamos uma tendência geral de maior concentração de peróxido de hidrogênio nas folhas, quando o acesso USP17 é utilizado como porta-enxerto, tendo o mesmo proporcionado as maiores diferenças médias, sendo duas significativas, com uma delas representando o valor mais alto observado nas folhas (USP09/USP17). Na combinação utilizando o acesso USP09 como copa e porta-enxerto também houve aumento significativo de H_2O_2 nas folhas. O acesso USP09, como citado anteriormente, foi descrito como um acesso resistente (PIOTTO et al., 2018). Por outro lado, isso não significa necessariamente maior nível de estresse, pois o sistema enzimático antioxidante está agindo no sentido de evitar que ocorram níveis acentuados de peroxidação lipídica. É essencial ressaltar a importância da sinalização do estresse oxidativo para as plantas, a partir da qual as enzimas do sistema antioxidante irão agir. O H_2O_2 desempenha dupla função nas células durante o estresse oxidativo, como espécie reativa de oxigênio e/ou como molécula sinalizadora na homeostase celular, na manutenção do status redox e na defesa contra estresses abióticos e bióticos (NIU e LIAO, 2016). O H_2O_2 está envolvido na mediação de importantes processos biológicos como o fechamento estomático (PEI et al., 2000).

Outro ponto interessante é que, em todas as combinações em que o genótipo susceptível USP17 foi usado como copa, não apareceram diferenças significativas na concentração de H_2O_2 nos tecidos de folhas deste. Isto poderia ser explicado pelo efeito benéfico dos porta-enxertos que são mais tolerantes ao Cd, os quais, como já demonstrado, aumentam o IT médio nas combinações com esse genótipo. Por fim, as combinações de copa e porta-enxerto evidenciaram que há comportamento genótipo-tecido-específico no que se refere à concentração de H_2O_2 nos tecidos de folhas e raízes. Já na tabela 22, temos a quantificação de MDA, que é um dos indicadores mais diretos do efeito do excesso de espécies reativas de oxigênio (incluindo H_2O_2), induzindo estresse oxidativo nos tecidos de raízes e folhas. De certa forma, o padrão de maiores valores de H_2O_2 nas folhas dos genótipos enxertados sobre o genótipo susceptível USP17, se repetiu com a constatação de maiores valores de MDA nestes tecidos, mostrando alguma associação, que não é regra, mas era esperada. Da mesma forma, em todos os casos em que USP17, sensível ao Cd, foi usado como copa para os demais porta-enxertos, não houve aumento significativo dos valores de MDA. Com os genótipos USP15, USP20, USP158 e USP163, como copas, não houveram alterações significativas para as concentrações de MDA nas folhas e raízes das plantas.

De maneira geral, as diferentes combinações, as quais, como já mencionado, devem possuir diferentes mecanismos e formas de lidar com o Cd, também devem proporcionar algum efeito de compensação entre genótipos, que não levou a evidenciar muitos efeitos significativos das diferenças. Cabe ressaltar, que as plantas aqui avaliadas, por serem enxertadas, possuem mais dias de vida, ou seja, são mais velhas, por conta do próprio processo de enxertia que leva ao cessamento temporário do crescimento das mesmas, até que os vasos de xilema e floema sejam reconectados e as plantas retomem seu crescimento. Isso talvez tenha levado à uma menor intensidade de estresse pelo metal no período considerado, o qual somado ao efeito das possíveis combinações entre genótipos que em sua maioria possuem alguma tolerância ao Cd, resultando em menor possibilidade de captarmos diferenças para estes parâmetros.

Enfim, de forma geral, não foi possível identificar padrões evidentes nos níveis de estresse, mensurados por meio destes indicadores de estresses. Mais uma vez, é importante afirmar que isso não quer dizer que o mesmo não tenha ocorrido, mas no período considerado de exposição ao metal, e sem o conhecimento da resposta dos mecanismos associados à evitação do estresse oxidativo por meio do sistema antioxidante celular, e também de outros mecanismos, não é possível tirar conclusões acerca da expressão dessas variáveis, a não a sustentação da hipótese de que tal resposta vem da combinação complexa entre genótipos, em sua expressão individual e conjunto das parte aérea e do sistema radicular.

Tabela 21. Médias das combinações individuais e conjuntas, para os concentração de H₂O₂ nas folhas e raízes (H₂O₂, µM.g⁻¹ de tecido), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	<u>57,19</u>	20,20	11,14	-4,37	27,80	35,52	24,58
	R	8,63	8,02	6,42	0,37	14,24	-2,21	5,91
USP15	F	18,97	19,80	35,36	8,53	18,05	4,23	17,49
	R	5,65	3,80	4,98	1,17	-5,93	10,12	3,30
USP17	F	<u>102,22</u>	27,70	20,30	7,91	<u>47,19</u>	22,98	38,05
	R	9,57	-1,43	1,28	5,33	4,04	-1,52	2,88
USP20	F	-30,11	11,04	4,03	32,10	-13,18	<u>57,24</u>	10,19
	R	5,79	3,14	-1,79	<u>17,14</u>	-2,82	7,76	4,87
USP158	F	27,17	33,45	12,81	-6,38	13,29	24,03	17,39
	R	-3,02	1,14	<u>22,92</u>	0,75	6,06	6,62	5,74
USP163	F	23,17	32,69	24,10	<u>64,38</u>	1,98	<u>40,87</u>	31,20
	R	<u>21,98</u>	-2,01	<u>-13,14</u>	-2,83	7,75	-0,90	1,81
Média	F	33,10	24,15	17,96	17,03	15,85	30,81	23,15
	R	8,10	2,11	3,44	3,65	3,89	3,31	4,08

LSD.F = 38,74; LSD.R = 10,18

Tabela 22. Médias das combinações individuais e conjuntas, para concentração de MDA nas folhas e raízes (MDA, $\eta\text{M.g}^{-1}$ de tecido), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	0,0083	0,0180	-0,0170	0,0147	-0,0030	0,0113	0,0054
	R	-0,0060	-0,0027	<u>-0,0110</u>	-0,0027	0,0080	0,0013	-0,0022
USP15	F	0,0323	-0,0090	0,0213	0,0077	0,0087	0,0123	0,0122
	R	<u>-0,0100</u>	0,0037	-0,0023	-0,0007	0,0027	-0,0060	-0,0021
USP17	F	<u>0,0453</u>	0,0200	0,0277	-0,0207	0,0117	-0,0120	0,0120
	R	<u>-0,0120</u>	-0,0020	0,0047	-0,0057	-0,0020	-0,0013	-0,0031
USP20	F	-0,0188	-0,0267	0,0120	0,0137	0,0030	0,0223	0,0009
	R	<u>-0,0105</u>	0,0007	0,0007	-0,0087	0,0060	-0,0063	-0,0030
USP158	F	0,0140	0,0140	0,0007	0,0043	0,0050	0,0277	0,0109
	R	0,0043	0,0070	0,0007	0,0030	0,0067	-0,0003	0,0036
USP163	F	0,0037	0,0333	0,0067	0,0230	-0,0140	0,0173	0,0117
	R	0,0003	-0,0023	-0,0063	0,0040	0,0010	-0,0040	-0,0012
Média	F	0,0141	0,0083	0,0086	0,0071	0,0019	0,0132	0,0089
	R	-0,0056	0,0007	-0,0023	-0,0018	0,0037	-0,0028	-0,0013

LSD.F = 0,0342; LSD.R = 0,0091

4.5. Análises de enzimas antioxidantes

Em geral, pode-se identificar que houve aumento da atividade de SOD na parte aérea das plantas e redução no sistema radicular (Tabela 23). Apenas duas combinações apresentaram elevação da atividade da SOD no sistema radicular, uma dessas no qual se utilizou o genótipo USP17, como porta-enxerto, combinado com a copa USP15. Lembrando-se, que no atual trabalho, USP15 foi o mais importante genótipo como copa para aumentar o IT e nas combinações com essa copa foram identificadas as menores concentrações de Cd nas folhas. Além disso, todas as combinações de USP15, como copa, obtiveram resultados positivos e significativos para a tolerância ao Cd, o que não ocorreu com nenhum outro genótipo. O genótipo USP15, quando utilizado como copa, foi o único que o Cd aumentou significativamente a concentração de SOD nas folhas de todas as combinações. A outra combinação que apresentou elevação significativa da atividade de SOD nas folhas e nas raízes, na presença de Cd, foi a combinação na qual utilizou-se como copa USP158 combinado com USP20. A auto enxertia do genótipo USP17 apresentou os únicos resultados sem nenhuma alteração significativa para a atividade de SOD nas folhas e raízes. Ressalta-se que o menor valor de IT foi observado com a auto enxertia do genótipo USP17 ($IT = 0,3440$), sendo este o principal genótipo referência de sensibilidade ao estresse causado pelo metal neste estudo. Dessa forma, o genótipo USP17 é um dos mais sensíveis e que acumula mais Cd nas folhas. Esse resultado indica uma relação da atividade de SOD com a tolerância ao Cd dos genótipos de tomateiro.

O porta-enxerto presente no maior número de combinações nas quais houveram aumento da atividade de CAT (Tabela 24) para as folhas foi o USP09. Sendo importante ressaltar que o genótipo USP09 proporcionou menor concentração de Cd nas folhas dos demais genótipos, quando usado como porta-enxerto, redução do ITr. Quando se utilizou o porta-enxerto USP09 houve aumento significativo na atividade da CAT nas folhas para sua auto enxertia e combinado com os genótipos USP15 e USP20. Outra informação relevante, que condiz com esses resultados da CAT, é que foi obtido o menor valor de acúmulo de Cd nas folhas na combinação específica quando o genótipo USP15 foi usado como copa sobre porta-enxerto USP09. Para as plantas com o porta-enxerto USP15 não ocorreram reduções significativas da atividade da CAT nas folhas, independente da copa utilizada, e quando combinado com a copa USP09 esse valor foi elevado significativamente. Esse aumento nas folhas também ocorreu na combinação do porta-enxerto USP17 com a copa USP20.

A copa USP163 apresentou o maior número de combinações no qual ocorreu a redução da atividade da CAT. Nesse contexto, destacou-se a combinação do genótipo USP163, como copa, associado ao genótipo USP158 pois houve elevação da atividade de CAT nas folhas. Anteriormente, essa combinação foi mencionada, pois apresentou o menor valor geral para ITr e nas análises de recíprocos (Tabela 9) o efeito mais pronunciado de redução de translocação de Cd para a parte aérea das plantas. As plantas com a auto enxertia do genótipo USP17 não apresentaram alteração significativa para a atividade de CAT nas folhas, com a presença de Cd, e apresentaram redução significativa na atividade dessa enzima para as raízes na exposição ao Cd.

Conforme pode ser visto na tabela 25, o Cd aumentou a atividade da GR significativamente na maioria das combinações de genótipos nas raízes e folhas, isso caracteriza o oposto do que foi visto nas concentrações de S no qual houve redução significativa. É importante ressaltar que só houve redução significativa da atividade da GR nas raízes das plantas com o porta-enxerto USP20 e a copa USP17, ambos genótipos descritos como sensíveis por Piotto et al. (2018). Nos tratamentos que a atividade da GR não foi alterada significativamente pela presença de Cd não foi identificado padrão. Destaca-se que a auto enxertia de USP17 também apresentou elevação significativa, com a presença de Cd, para a atividade de GR, assim como a maioria das combinações de genótipos. Dessa forma, a GR foi a única enzima entre as avaliadas que sua atividade aumentou significativamente nas folhas e/ou raízes das plantas com auto enxertia do genótipo sensível USP17. Em uma visão geral, esses resultados demonstram que a GR foi elevada na maioria das combinações de genótipos. Isso demonstra que em condições de contaminação por Cd, a ativação da enzima GR é uma via metabólica predominante aos genótipos, independente da tolerância do genótipo ao Cd, o que pode ocorrer é uma diferença no período de elevação dessa atividade.

Tabela 23. Médias das combinações individuais e conjuntas, para atividade de SOD nas folhas e raízes (SOD, $\eta\text{M.g}^{-1}$ de tecido), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	2,56	1,39	1,87	4,44	0,54	3,00	2,30
	R	-8,05	-6,54	-9,33	-15,98	-10,57	-13,75	-10,70
USP15	F	1,66	2,02	1,39	2,18	0,95	3,25	1,91
	R	-16,00	0,03	-9,00	-2,87	-6,51	-15,67	-8,34
USP17	F	0,35	3,41	3,69	3,04	4,10	3,06	2,94
	R	-12,08	8,94	-0,92	-8,49	-12,64	0,12	-4,18
USP20	F	2,46	1,43	4,15	3,86	1,68	2,35	2,66
	R	-7,99	-6,56	-7,19	2,66	6,31	-11,78	-4,09
USP158	F	0,81	1,42	3,33	3,27	3,64	1,71	2,36
	R	-14,23	-17,08	-4,94	0,92	-16,37	-10,83	-10,42
USP163	F	0,96	1,06	4,28	0,07	2,48	4,51	2,23
	R	-12,85	-5,16	-11,16	-22,15	-2,80	-2,83	-9,49
Média	F	1,47	1,79	3,12	2,81	2,23	2,98	2,40
	R	-11,87	-4,40	-7,09	-7,65	-7,10	-9,12	-7,87

LSD.F = 1,09; LSD.R = 1,70

Tabela 24. Médias das combinações individuais e conjuntas, para atividade de CAT nas folhas e raízes (CAT, $\eta\text{M.g}^{-1}$ de tecido), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	7,61	5,84	-8,13	19,08	-2,23	-14,65	1,25
	R	-6,65	-13,89	-18,86	-31,01	-22,22	-53,45	-24,35
USP15	F	3,89	0,64	-0,88	0,33	2,05	-1,98	0,68
	R	-21,78	-10,47	-9,84	-11,65	-10,18	-22,41	-14,39
USP17	F	1,88	1,12	-1,62	7,01	-14,75	-5,29	-1,94
	R	-17,56	-9,00	-13,40	-23,79	-23,02	-8,51	-15,88
USP20	F	-8,29	1,34	-9,62	-2,46	-11,33	-14,59	-7,49
	R	-20,50	0,51	-11,06	-10,23	-11,34	-30,06	-13,78
USP158	F	-26,83	-16,05	-7,20	1,03	0,58	-16,43	-10,82
	R	-16,62	-17,19	-25,04	-18,46	-33,68	-30,26	-23,54
USP163	F	-16,37	-9,50	-3,24	0,29	3,47	-4,42	-4,96
	R	-43,34	-12,45	-23,63	-59,16	-15,62	-15,47	-28,28
Média	F	-6,35	-2,77	-5,12	4,21	-3,70	-9,56	-3,88
	R	-21,08	-10,42	-16,97	-25,72	-19,34	-26,69	-20,04

LSD.F = 2,66; LSD.R = 6,22

Tabela 25. Médias das combinações individuais e conjuntas, para atividade de GR nas folhas e raízes (GR, $\eta\text{M.g}^{-1}$ de tecido), avaliadas em seis genitores e 30 combinações entre copa (Copa) e porta-enxerto (PE) de tomateiro, combinados em esquema de dialelo completo, com os recíprocos.

PORTA ENXERTO	Tecidos	COPA						Média
		USP09	USP15	USP17	USP20	USP158	USP163	
USP09	F	0,07	0,08	0,14	0,13	0,04	0,14	0,10
	R	0,76	1,13	0,30	0,48	0,95	1,00	0,77
USP15	F	0,09	0,11	0,07	0,05	0,09	0,11	0,09
	R	0,93	0,91	1,10	1,18	1,34	0,66	1,02
USP17	F	0,04	0,16	0,12	0,04	0,05	0,12	0,09
	R	0,60	1,85	1,07	0,42	0,37	0,87	0,86
USP20	F	0,06	0,07	0,05	0,06	0,14	0,11	0,08
	R	1,14	0,48	-0,86	1,39	1,27	0,74	0,69
USP158	F	0,17	0,21	0,02	0,04	0,06	0,17	0,11
	R	0,24	1,05	1,25	1,38	0,72	1,00	0,94
USP163	F	0,05	0,02	0,10	0,04	0,14	0,15	0,08
	R	0,61	0,70	0,57	0,53	0,78	0,79	0,66
Média	F	0,08	0,11	0,08	0,06	0,09	0,13	0,09
	R	0,71	1,02	0,57	0,90	0,91	0,84	0,83

LSD.F = 0,03; LSD.R = 0,27

5. DISCUSSÃO

O Cd é um metal altamente tóxico que tem causado crescentes preocupações por conta da contaminação do solo e da água, de modo que os pesquisadores têm voltado a atenção para o tema devido ao risco a saúde humana e sanidade vegetal (BARI et al., 2019; HUANG et al., 2017; KUMAR et al. 2015). O consumo de frutos de tomate são uma via potencial para entrada desse metal na cadeia alimentar (CARVALHO et al., 2017, 2018b; GRATÃO et al., 2012). Por isso, trabalhos tem buscado desenvolver estratégias para a redução desse metal nas plantas em geral, bem como em tomateiros (BARI et al., 2019; GREGER et al., 2016; PIOTTO et al. 2018). Assim, genótipos de tomateiros têm sido estudados para elucidar os mecanismos que caracterizam a tolerância ao Cd para o desenvolvimento de programas de melhoramento de plantas (NOGUEIRA et al., 2021). Para isso, é necessário identificar genótipos de tomateiros tolerantes ao Cd e investigar as vias que reduzem a translocação do Cd da raiz para a parte aérea das plantas, resultando na diminuição dos teores do Cd nos frutos. Nesse contexto, a enxertia é uma ferramenta que pode ser utilizada para aumentar a tolerância ao estresse abiótico em hortaliças que produzem frutos (SCHWARZ et al., 2013).

Contudo, muitos trabalhos desenvolvidos para o estudo da tolerância de tomateiros ao Cd, ainda não possuem uma seleção sistemática e caracterização dos genótipos quanto ao nível de tolerância ao metal. Novas abordagens para os estudos de genótipos de tomateiro, contrastantes para a tolerância ao Cd, são necessárias para a evolução metodológica dos futuros trabalhos. O presente estudo apresentou uma abordagem desse tema por meio da análise dialélica, a qual difere do modelo clássico de um dialelo, uma vez que os fenótipos de cada genótipo avaliado foram compostos pela combinação de dois outros genótipos. Os genótipos foram originados então da união do sistema radicular e da parte aérea de diferentes plantas, a fim de avaliar os efeitos das combinações recíprocas.

No presente trabalho, não houve efeito significativo para as diferenças de concentração de Cd nas raízes (Tabela 2), entre as combinações estudadas, não havendo também efeito significativo da CGC, CEC e REC. No trabalho de Borges et al. (2018), que estudaram um genótipo tolerante e um sensível ao Cd, os autores relataram que os genótipos de tomate exibiram uma tendência semelhante de acúmulo de Cd nos tecidos, principalmente no sistema radicular. Bari et al. (2019) desenvolveram um estudo com duas linhagens de arroz, *Sonarbangla* (tolerante ao Cd) e BRR1 72 (sensível ao Cd), classificadas com base em marcadores morfológicos em um estudo de triagem preliminar. Os autores observaram um grande incremento de Cd na raiz e parte aérea de BRR1 72, enquanto as plantas de *Sonarbangla* exibiram um aumento significativo de Cd somente nas raízes. A partir disso,

concluiu-se que o excesso de Cd em *Sonarbangla* possivelmente foi retido nas raízes por meio do sequestro vacuolar, sem alterar as demais atividades celulares. Os autores também testaram a enxertia recíproca combinando *Sonarbangla*, como porta-enxerto, com BRRI 72 ou *Sonarbangla*, o que mostrou tolerância do tipo *Sonarbangla*, sem alterações de peróxido de hidrogênio em raízes sob alta concentração de Cd. Isso indica que o sinal que induz as respostas a ajustar o estresse do Cd é originado no sistema radicular, mas não necessariamente uma alteração na absorção de Cd pelas raízes das plantas.

Muitos trabalhos, já mostraram que a enxertia é capaz de reduzir a absorção e o transporte de metais pesados para a parte aérea, conforme o genótipo do porta-enxerto (NAWAZ et al., 2016; XIE et al., 2020). Portanto, a concentração de Cd em frutos varia de acordo com o genótipo do tomateiro (CARVALHO et al., 2017), o que demonstra que são essenciais estudos com o uso de genótipos contrastantes. No trabalho de Xie et al. (2020) foram comparadas plantas não enxertadas e enxertadas cultivadas em solo contaminado com uma solução de 10 mg.kg^{-1} de $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$. Para isso, foram utilizados dois porta-enxertos de variedades de berinjela silvestre (*S. torvum* e Totosga) e três de variedades de tomate (Banzhen 18, Dalishengen e Guozhen 1) combinados com dois enxertos, sendo uma variedade de tomate comum (Zhongyanhong 6) e outra de tomate cereja (Hongyu F1). As concentrações de Cd nas partes aéreas e frutos de tomate comum enxertado em Banzhen 18 e Dalishengen não foram reduzidos em comparação com as plantas não enxertadas. Dessa forma, os autores concluíram que a enxertia não foi responsável pela redução do acúmulo de Cd na parte aérea e nos frutos de tomateiro e sim, a combinação adequada de porta enxerto e enxerto (YUAN et al. 2019; XIE et al., 2020).

Estudos sobre as diferenças entre cultivares de hortaliças que acumulam quantidades contrastantes de Cd podem fornecer conhecimentos sobre a localização de Cd e alterações nas estruturas radiculares, que são fundamentais para o entendimento dos padrões de acúmulo do metal em cultivares (XIN et al., 2013). Para isso, podemos utilizar nos estudos a enxertia recíproca e análises das estruturas radiculares que auxiliam na elucidação dos mecanismos responsáveis (XIN et al., 2013). O genótipo que mais acumulou Cd nas folhas e no caule quando usado como copa, foi o genótipo USP17, sendo este o genótipo considerado uma das principais referências de susceptibilidade ao Cd em trabalhos anteriores (BORGES et al., 2018; CARVALHO et al., 2018a, 2019; PIOTTO et al., 2018; NOGUEIRA et al., 2021). Como foi observado, no presente estudo, o menor valor de IT (Tabela 5) foi observado com a auto enxertia do genótipo USP17 (IT = 0,3440), sendo este o principal genótipo referência de sensibilidade ao estresse causado pelo metal neste estudo. O elevado acúmulo de Cd nas

folhas das plantas, com auto enxertia para esse genótipo, pode ser resultado da limitação dos mecanismos de defesa dessas plantas. Para esse genótipo não houveram alterações significativas para as concentrações de K, Mg, S, Cu e Zn (Tabelas 12, 14, 15, 17 e 21). Apenas houveram alterações significativas para alguns micronutrientes como B, Mn e Mo (Tabelas 16, 19 e 20). Isso pode ter ocorrido devido a redução significativa do comprimento total de raiz e das radículas.

Curiosamente, o genótipo USP09 foi o que proporcionou menor concentração de Cd nas folhas dos demais genótipos, quando usado como porta-enxerto. Esse tipo de resultado é importante, pois a menor concentração em folhas pode refletir em menor concentração de Cd nos frutos, os quais são usados no consumo humano. Isso mostra também que, embora não se tenha identificado efeito significativo para diferenças de Cd em raízes, o sistema radicular dos genótipos parece ter um efeito importante na regulação da absorção e transporte para a parte aérea das plantas.

O índice ITr é estimado com base no acúmulo total de metal em toda a planta, a partir do qual é estabelecida uma relação entre o total acumulado e a fração deste total que foi transportado para a parte aérea (caule e folhas). Este índice é relativo e não mostra as concentrações absolutas, mas sim as variações no potencial que cada combinação tem para acumular mais ou menos metal na parte aérea, em função do total nos tecidos. Assim, um ITr perto de 0,5 indica que metade do total de Cd ficou retido das raízes e a outra metade foi translocado para a parte aérea da planta. Neste caso, é desejável se obter valores de ITr mais baixos, tanto quanto for possível, pois isto deve refletir em menor possibilidade de contaminação nos frutos, no caso cultivado em solo contaminado. De forma geral, parece que as combinações que usam os genótipos USP09 ou USP163 como porta-enxertos, e USP15 como copa, são as mais eficientes para se reduzir o ITr de Cd para a parte aérea das plantas (Tabela 6).

Anteriormente, foi proposto o modelo de estudo usando o IT, fórmula matemática que provou ser eficiente para a estimativa da tolerância do tomateiro à exposição ao Cd, por um curto período e em condições padronizadas de cultivo (PIOTTO et al., 2014). Conforme, Piotto et al. (2018) 35 μM CdCl₂ forneceu a segregação mais aprimorada de cultivares de acordo com os valores de IT, por isso esse foi o valor utilizado na metodologia para a solução dos blocos com Cd. No atual trabalho, temos que a combinação da melhor copa (USP15) com o melhor porta-enxerto (USP163), foi aquela que apresentou o maior valor de IT deste estudo (IT = 0,6295, Tabela 5), cujo valor foi quase duas vezes maior que a referência de sensibilidade ao Cd, USP17 (IT = 0,3440, Tabela 5).

Um dos resultados mais relevantes a ser considerado é a concentração de Cd nas folhas. Um efeito específico altamente relevante de redução de Cd foi identificado nestes tecidos, utilizando USP15 como copa e USP09 como porta-enxerto. Essa combinação já havia chamado a atenção uma vez que apresentou menor valor geral na concentração de Cd nas folhas. Esse resultado foi muito importante, pois coloca em evidência que a absorção e acúmulo de Cd nas plantas devem possuir mecanismos específicos relacionados ao sistema radicular e à parte aérea das plantas, que podem ser complementados de forma benéfica para compor um fenótipo desejado. Enquanto, o efeito mais pronunciado de redução da translocação de Cd para a parte aérea das plantas, e o menor valor geral para ITr, proporcionado pelo genótipo USP163, quando usado como porta-enxerto, que recebeu USP158 como copa (Tabela 6). Um dos mecanismos de tolerância que essa combinação apresentou, no presente trabalho, foi a elevação da atividade de CAT nas folhas, na presença do metal (Tabela 24). O acúmulo de H_2O_2 é impedido nas células vegetais por CAT e várias peroxidases ou pelo ciclo ascorbato-glutationa (Gratão et al. 2005).

Todas combinações que tiveram o genótipo USP15 como copa, apresentaram valores positivos e significativos de tolerância ao Cd, o que não aconteceu com nenhum outro genótipo. De forma geral, temos que USP15 foi o mais importante como copa para aumentar a tolerância dos genótipos usado como porta-enxerto, ao passo que USP163 foi mais efetivo como porta-enxerto para aumentar a tolerância de quase todos os genótipos deste estudo, usados como copa. Um mecanismo ao Cd observado, no presente trabalho, foi o aumento de SOD nas folhas de todas as combinações com essa copa (Tabela 23). As moléculas de O_2^- e H_2O_2 que não foram degradadas no tilacóide passam pela degradação no estroma por meio da atividade da enzima SOD. A elevação da atividade da SOD em uma grande variedade de compartimentos metabólicos demonstra a importância das enzimas do ciclo da glutatona/ascorbato no exterior do cloroplasto. Esse ciclo é ativado comumente por plantas sob estresse (VITÓRIA et al., 2001), dessa forma, a elevação da atividade da SOD demonstra que as plantas ativaram um mecanismo de defesa contra a toxidez pelo metal e, portanto, indicam a existência do estresse oxidativo.

No atual estudo, a combinação do genótipo USP15 como copa sobre o genótipo USP163, usado como porta-enxerto, mostrou maior sinergismo para reduzir o acúmulo de Cd nas folhas das plantas e anular ou amenizar o efeito de redução na quantidade de radicelas (Tabela 11), devido à exposição ao metal. Isso pode indicar um efeito sinérgico benéfico na combinação entre genótipos, combinando mecanismos de evitação à absorção do metal, tanto do sistema radicular quanto da copa. A única enzima que apresentou aumento na presença do

Cd nessas plantas foi a GR, isso também ocorreu para a maioria das combinações dos genótipos. O Cd aumentou a atividade da GR (Tabela 25) significativamente na maioria das combinações de genótipos nas raízes e folhas, o que não foi visto nas concentrações de S (Tabela 15), no qual houve redução significativa. Isso ocorreu provavelmente pois o S constitui compostos, como a glutathiona, que integram o sistema antioxidante das plantas, elevam a tolerância das plantas e promovem a redução dos danos oxidativos (RABÊLO, 2014). A absorção de S e a produção de compostos que contenham esse macronutriente é essencial para o desempenho de funções críticas em muitos processos biológicos, incluindo o papel de compostos contendo S para a homeostase de plantas sob estresse de elementos químicos (NA e SALT, 2011). Segundo Borges et al. (2018), a enzima GR é um dos principais agentes no metabolismo antioxidante contra o estresse oxidativo por Cd em tomateiros.

Retomando o objetivo deste trabalho, o qual foi avaliar o potencial da enxertia como estratégia de manejo para aumentar a tolerância e reduzir a absorção de Cd em plantas de tomateiro, vimos que esta técnica pode ser usada de forma efetiva para reduzir a absorção e transporte deste metal para a parte aérea das plantas. Contudo, ainda não havia sido relatada a contribuição tecido-específica para esta característica, tanto no que se refere ao acúmulo de Cd na parte aérea das plantas de tomateiro, quanto em sua contribuição no ITr e IT, que são variáveis explicativas deste processo.

Com base nestes resultados, podemos afirmar que os mecanismos que regulam a absorção de Cd e a tolerância em tomateiro, frente ao estresse causado por esse metal, são diferentes entre os genótipos e envolvem contribuições distintas do sistema radicular e da parte aérea de cada um. Assim, foi demonstrado, por exemplo, que o principal mecanismo de tolerância ao Cd do genótipo USP15 está relacionado às folhas e caule do mesmo. Por outro lado, para o genótipo USP163, o mecanismo de tolerância mais importante advém do sistema radicular, havendo efeito sinérgico na tolerância na combinação copa USP15 e porta-enxerto USP163, com efeito antagônico quando a combinação foi inversa, o que reforça a hipótese da existência de tais mecanismos tecido-específicos de tolerância para cada genótipo.

Já no caso de acúmulo de metal das folhas e translocação para a parte aérea das plantas, provavelmente é regido por mecanismos similares ou talvez complementares à tolerância, uma vez que nesta mesma combinação foi constatada menor concentração de Cd nas folhas, como provável resultado da união de mecanismos de redução de absorção e transporte deste metal entre os genótipos da copa e porta-enxerto. Enfim, a contribuição genótipo-tecido-específica para a composição da tolerância e acúmulo de Cd em tomateiro,

foi demonstrada pela primeira vez nesta pesquisa, o que confirma o caráter inovador da mesma.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, são apresentadas as seguintes conclusões:

- Existem mecanismos de tolerância, absorção e acúmulo de Cd em tomateiro que são específicos do sistema radicular e da parte aérea de cada genótipo;
- A enxertia pode ser usada de forma eficiente para reduzir a absorção e acúmulo de Cd na parte aérea das plantas, utilizando genótipos selecionados para esta finalidade, para uso como porta-enxertos. De forma adicional, é possível capitalizar efeitos sinérgicos combinando determinados genótipos a serem usados como copa;
- A combinação do genótipo USP15 como copa sobre o genótipo USP163, usado como porta-enxerto, mostrou maior sinergismo para aumentar o IT, reduzir ITr, reduzir Cd nas folhas das plantas e anular ou reduzir o efeito de redução na quantidade de radículas, devido à exposição ao metal;
- De maneira geral, o genótipo USP163 é o genitor mais promissor para programas de melhoramento que tenham a enxertia como fim para reduzir a absorção de Cd na parte aérea das plantas;
- Existem mecanismos genótipo-tecido-específicos relacionados a absorção, transporte e translocação de nutrientes. Alguns desses mecanismos estão relacionados a síntese e ativação das enzimas do sistema antioxidante. No momento avaliado, a atividade enzimática foi o principal indicador do estresse oxidativo nas plantas. As atividades de SOD e CAT mostraram relação com a tolerância e sensibilidade dos genótipos ao Cd, enquanto a atividade da GR foi elevada na maioria das combinações de genótipos;
- Tanto a tolerância quanto o acúmulo de Cd na parte aérea das plantas é genótipo-tecido-específica, formando um sistema complexo de complementação de mecanismos, que precisa ser estudado e melhor compreendido, a fim de se projetar novas estratégias para reduzir os problemas de contaminação com este metal nos frutos de tomateiro.

REFERÊNCIAS

- Ahmad P, AbdAllah EF, Hashem A, Sarwat M, Gucel S (2016) Exogenous application of selenium mitigates cadmium toxicity in *Brassica juncea* L. (Czern & Cross) by up-regulating antioxidative system and secondary metabolites. **Journal of Plant Growth Regulation** 35:936-950
- Baptista MJ, Souza RB, Pereira W, Lopes CA, Carrijo OA (2006) Efeito da solarização e biofumigação na incidência da murcha bacteriana em tomateiro no campo. **Horticultura Brasileira** 24:161–165
- Bari MA, Akther MS, Reza MA, Kabir AH (2019) Cadmium tolerance is associated with the root-driven coordination of cadmium sequestration, iron regulation, and ROS scavenging in rice. **Plant Physiology and Biochemistry** 136:22–33
- Bian B, Zhou LJ, Li L, Lv L, Fan YM (2015) Risk assessment of heavy metals in air, water, vegetables, grains, and related soils irrigated with biogas slurry in Taihu Basin, China. **Environmental Science and Pollution Research** 22:7794-7807
- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MGA, Mazzafera P, Azevedo RA (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant physiology biochemistry* 74: 165-175.
- Borges KLR, Salvato F, Alcântara BK, Nalin RS, Piotto FA, Azevedo RA (2018) Temporal dynamic responses of roots in contrasting tomato genotypes to cadmium tolerance. **Ecotoxicology** 27:245–258
- Carvalho FP (2017) Mining industry and sustainable development: time for change. **Food Energy Security** 6:61–77
- Carvalho MEA, Piotto FA, Nogueira ML, Gomes-Junior FG, Chamma HMCP, Pizzaia D, Azevedo RA (2018a) Cadmium exposure triggers genotype-dependent changes in seed vigor and germination of tomato offspring. **Protoplasma** 255:989–999
- Carvalho MEA, Piotto FA, Gaziola SA, Jacomino AP, Jozefczak M, Cuypers A, Azevedo, RA (2018b) New insights about cadmium impacts on tomato: plant acclimation, nutritional changes, fruit quality and yield. **Food Energy Security** 7:e00131
- Cembrawska-Lech D, Koprowski M, Kepczynski J (2015) Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR(1) and GA(3) involving the control of reactive oxygen species (H₂O₂ and O₂(·-)) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. **Journal of Plant Physiology** 176:169-179
- Gay C, Collins J, Gebicki JM (1999) Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry** 273: 149-55
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology** 59:309-314
- Gill SS; Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry** 48:909-930
- Gratão PL, Monteiro CC, Tezotto T, Carvalho RF, Alves LR, Peters LP (2015) Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **Biomaterials** 28: 803-816
- Gratão PL, Monteiro CC, Carvalho RF, Tezotto T, Piotto, FA, Peres LEP, Azevedo RA (2012) Biochemical dissection of diageotropic and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant physiology and biochemistry** 56: 79–96

- Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology** 32:481–494
- Greger, M., Kabir, A.H., Maity, P.J., Landberg, T., Lindberg, S., 2016. Silicate reduces cadmium uptake into cells of wheat. *Environmental Pollution*. 211, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.027>
- Griffing B (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences** 9: 463–493
- Guimarães MDA, de Santana TA, Silva EV, Zenzen IL, Loureiro ME (2008) Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica** 1: 58–68.
- Hermes-Lima M (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine** 19: 271-280
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. 2nd ed.
- Huang Y, He C, Shen C, Guo J, Mubeen S, Yuan J, Yang Z (2017) Toxicity of cadmium and its health risks from leafy vegetable consumption. **Food Function** 8:1373-1401
- Huet G (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in Plant Science** 5:715
- Jarup L, Akesson A (2009) Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem. **Toxicology and Applied Pharmacology** 238:201-208
- Kabata-Pendias A, Szteke B (2015) **Trace elements in abiotic and biotic environments**. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 1:468p.
- Karyotou K, Donaldson RP (2005) Ascobate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes. **Archives of biochemistry and biophysics** 434:248-257
- Keeler GJ, Landis MS, Norris GA, Christianson EM, Dvonch JT (2006) Sources of mercury wet deposition in Eastern Ohio, USA. **Environmental Science and Technology** 40:5874-5881
- Khan MU, Shahbaz N, Waheed S, Mahmood A, Shinwari ZK, Malik RN (2016) Comparative health risk surveillance of heavy metals via dietary foodstuff consumption in different land-use types of Pakistan. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal** 22:168–186
- Khanam R, Kumar A, Nayak AK, Shahid M, Tripathi R, Vijayakuma S, Braduri D, Kumar U, Mohanty S, Panneerselvam P, Chatterjee D, Satapathy BS, Pathak H (2018) Metal(loid)s (As, Hg, Se, Pb and Cd) in paddy soil: Bioavailability and potential risk to human health. **Science of the Total Environment** 699:134330-134349
- Kubota C, McClure MA, Kokalis-Burelle N, Bausher MG, Roskopf EN (2008) Vegetable grafting: History, use, and current technology status in North America. **Hortscience** 43:1664–1669
- Kumar P, Edelstein M, Cardarelli M, Ferri E, Colla G (2015) Grafting affects growth, yield, nutrient uptake, and partitioning under cadmium stress in tomato. **HortScience** 50:1654-1661
- Liang J, Feng CT, Zeng GM, Zhong MZ, Gao X, Li XD, He XY, Li X, Fang YL, Mo D (2017) Atmospheric deposition of mercury and cadmium impacts on topsoil in a typical coal mine city, Lianyuan, China. **Chemosphere** 189:198-205
- Liang J, Liu J, Yuan X, Zeng G, Yuan Y, Wu H, Li F (2016) A method for heavy metal exposure risk assessment to migratory herbivorous birds and identification of priority pollutants/areas in wetlands. **Environmental Science and Technology** 23:11806-11813.

- Loos RA, Caliman FRB, Da Silva DJH (2009) Enxertia, produção e qualidade de tomateiros cultivados em ambiente protegido. **Ciência Rural** 39:232–235
- Lopes CA, Boiteux LS, Eschemback V (2015) Eficácia relativa de porta-enxertos comerciais de tomateiro no controle da murcha-bacteriana. **Horticultura Brasileira** 33:125–130
- Melo LCA, Alleoni LRF, Swartjes FA (2011) Derivation of critical soil cadmium concentrations for the state of São Paulo, Brazil, based on human health risks. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal** 17:1124-1141
- Monteiro CC, Carvalho RF, Gratão PL, Carvalho G, Tezotto T, Medici LO, Peres LEP, Azevedo RA (2011) Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. **Environmental and Experimental Botany** 71:306–320
- Na G, Salt DE (2011) The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. **Environmental and Experimental Botany** 72:18–25
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters** 8:199- 216
- Nawaz MA, Imtiaz M, Kong Q, Cheng F, Ahmed W, Huang Y, Bie Z (2016) Grafting: a technique to modify ion accumulation in horticultural crops. **Frontiers in Plant Science** 7:1457
- Nazar R, Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Syeed S, Khan NA (2012) Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *American Journal of Plant Sciences* 03:1476-1489
- Nogueira ML, Carvalho MEA, Ferreira JMM, Bressanin LA, Piotto KDB, Piotto FA, Marques DN, Barbosa S, Azevedo RA (2021) Cadmium-induced transgenerational effects on tomato plants: A gift from parents to progenies. **Science of the Total Environment** 789:147885
- Nogueirol RC, Monteiro FA, Gratão PL, Borgo L, Azevedo RA (2015) Tropical soils with high aluminium concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment** 187:73-88
- Nogueirol RC, Monteiro FA, Gratao PL, Da Silva BKD, Azevedo RA (2016) Cadmium application in tomato: nutritional imbalance and oxidative stress. **Water Air Soil Pollution** 227:210
- Oda M (2002) Grafting of Vegetable Crops. **Scientific report of the graduate school of agriculture and biological sciences** 54:49–72
- Pandey J, Pandey U (2009) Accumulation of heavy metals in dietary vegetables and cultivated soil horizon in organic farming system in relation to atmospheric deposition in a seasonally dry tropical region of India. **Environmental Monitoring Assessment** 148:61-74
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells **Nature: Letters to Nature** 408:731-734
- Peil RM (2003) A enxertia na produção de mudas de hortaliças. **Ciência Rural** 33:1169–1177
- Piotto FA, Carvalho MEA, Souza LA, Rabêlo FHS, Franco MR, Batagin-Piotto KD, Azevedo RA (2018) Estimating tomato tolerance to heavy metal toxicity: cadmium as study case. **Environmental Science and Pollution Research** 25:27535–27544
- Piotto FA, Tulmann-Neto A, Franco MR., Boaretto LF, Azevedo RA (2014) Rapid screening for selection of heavy metal-tolerant plants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 14:1–7

- Rabêlo FHS, Borgo L, Merloti FM, Pylro VS, Navarrete AN, Mano RH, Thijs S, Vangronsveld J, Alleoni RF (2020) Effects of winter and summer conditions on Cd fractionation and bioavailability, bacterial communities and Cd phytoextraction potential of *Brachiaria decumbens* and *Panicum maximum* grown in a tropical soil. **Science of The Total Environment** 728:138885p
- Rehman MZ, Rizwan M, Ali S, Fatima N, Yousaf B, Naeem A, Sabir M, Ahmad HR (2016) Contrasting effects of biochar, compost and farm manure on alleviation of nickel toxicity in maize (*Zea mays* L.) in relation to plant growth, photosynthesis and metal uptake. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 133:218–225
- Rosén K, Eriksson J, Vinichuk M (2012) Uptake and translocation of ^{109}Cd and stable Cd within tobacco plants (*Nicotiana sylvestris*). **Journal of Environmental Radioactivity** 113:16-20
- Santos-Araujo SN, Alleoni LRF (2016) Concentrations of potentially toxic elements in soils and vegetables from the microregion of São Paulo, Brazil: availability for plant uptake. **Environmental Monitoring and Assessment** 188:92p
- Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. **Plant physiology** 127:887-898
- Schwarz D, Öztekin GB, Tüzel Y, Brückner B, Krumbein A (2013) Rootstocks can enhance tomato growth and quality characteristics at low potassium supply. **Scientia Horticulturae** 149:70–79
- Scott JW, Wang JF, Hanson PM (2005) Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. **Acta Horticulturae** 161–172
- Souza LA, Piotto FA, Nogueiro RC, Azevedo RA (2013) Use of non-hyperaccumulator plant species for the phytoextraction of heavy metals using chelating agents. **Scientia Agricola** 70:290–295
- Tang W, Kovalsky P, He D, Waite TD (2015) Fluoride and nitrate removal from brackish groundwaters by batch-mode capacitive deionization **Water Research** 84:342-349
- Trachsel S, Messmer R, Stamp P, Hund A (2009) Mapping of QTLs for lateral and axile root growth of tropical maize. **Theoretical and Applied Genetics** 119:1413–1424
- Vitória AP, Lea PJ, Azevedo RA (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry** 57: 701-710
- Xie Y, Tan H, Sun G, Li H, Liang D, Xia H, Wang H, Liao M, Deng H, Wang J, Yi Tang (2020) Grafting alleviates cadmium toxicity and reduces its absorption by tomato. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 20:2222–2229
- Xin J, Huang B, Yang J, Yang Z, Yuan J, Mu Y (2013) Role of roots in cadmium accumulation of two water spinach cultivars: reciprocal grafting and histochemical experiments. **Plant and Soil** 366:425-432
- Yang H, Shu Y (2015) Cadmium Transporters in the Kidney and Cadmium-Induced Nephrotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences** 16:1484-1494
- Yang Y, Chen W, Wang M, Li Y, Peng C (2017) Evaluating the potential health risk of toxic trace elements in vegetables: Accounting for variations in soil factors. **Science of the Total Environment** 585: 942-949.
- Yuan HH, Sun LZ, Tai PD, Liu W, Li XJ, Hao L (2019) Effects of grafting on root-to-shoot cadmium translocation in plants of eggplant (*Solanum melongena*) and tomato (*Solanum lycopersicum*). **Science of The Total Environment** 652:989–995

Zoghlami RI, Hamdi H, Boudabbous K, Hechmi S, Khelil MN, Jedidi N (2018) Seasonal toxicity variation in light-textured soil amended with urban sewage sludge: interaction effect on cadmium, nickel, and phytotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research** 25:3608-3615

Zhu J, Wang Q, Yu H, Li M, He N (2016) Heavy metal deposition through rainfall in Chinese natural terrestrial ecosystems: evidences from national-scale network monitoring. **Chemosphere** 164:128-133