

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES EM  
RESPOSTA AO CÁDMIO EM TOMATEIRO

Sara Hartke  
Bióloga/UNIVALI

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia  
Ênfase Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Maio de 2012



## DEDICO

*Aos meus pais Antônio A. Hartke e Schirlei B. Hartke, que sempre fizeram o possível e o impossível para me ajudar sempre que precisei. O amor que sinto por vocês me incentiva nos momentos difíceis e me torna uma pessoa melhor.*

*Ao meu amor Pietro F. Biasuz, que tornou meus dias mais felizes e intensos. Obrigada por fazer parte da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida.

À minha família pelo apoio em todos os momentos.

Ao professor e orientador Marcelo Gravina de Moraes pela oportunidade, paciência e pelos ensinamentos.

Aos professores André Lima e Marcos Pessatti pela ajuda e incentivo.

Aos antigos e atuais colegas do LFM Johannes, Leonardo, Adriano, Guilherme, Gustavo, Aline, Lourenço, Jonathas e Ricardo. Em especial à Ana e à Julie. Ana obrigada pelas muitas contribuições indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Agradeço também por ser como uma mãe para mim, espero sempre poder retribuir toda ajuda e carinho. Julie muito obrigada pela ajuda, conversas, conselhos e por essa amizade especial.

Aos membros do Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS por serem tão prestativos e pela excelente ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores do Departamento de Fitossanidade pela ajuda e pelas respostas a muitas perguntas.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Marisa Carvalho Bello.

À família dos meus tios Raul e Heloisa, pela grande ajuda desde o início desta jornada. Sempre me confortou saber que tenho pessoas tão boas por perto.

Às famílias Facchini e Biasuz pela ajuda, incentivo e compreensão.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

# CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES EM RESPOSTA AO CÁDMIO EM TOMATEIRO<sup>1</sup>

Autor: Sara Hartke

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

## RESUMO

O cádmio (Cd) é considerado um metal extremamente tóxico à maioria dos organismos. As plantas constituem a principal forma de entrada deste metal na cadeia alimentar. O tomate, uma espécie amplamente utilizada para consumo humano, foi recentemente identificado como hiperacumulador de Cd. Diante disso, o presente trabalho objetivou quantificar o teor de Cd nas folhas e frutos de seis cultivares de tomate, bem como caracterizar os genes possivelmente envolvidos na tolerância e na hiperacumulação de Cd nesta espécie. Para tanto, as cultivares de tomate foram cultivadas na presença da dose de Cd de 90 mg Kg<sup>-1</sup> ou na ausência deste metal. Simultaneamente, foi procedida uma busca de genes ortólogos aos *HMA*s (*HMA1* – *HMA4*) de *Arabidopsis thaliana*, os quais formam um grupo de transportadores de metais, incluindo o Cd. Através desta busca, foi identificado em tomate um ortólogo ao *HMA1* de *A. thaliana*. A expressão do *HMA1* e também do *LeNRAMP3*, *LeFER*, *LeIRT1* e *LeNRAMP1*, os quais são genes envolvidos no transporte de metais em tomate, foi comparada entre as plantas cultivadas com e sem Cd. Na maioria das cultivares de tomate, todos os genes avaliados foram responsivos ao Cd, sendo verificado um aumento nas expressões em resposta a presença do metal no substrato. Todas as cultivares de tomate utilizadas foram caracterizadas como hiperacumuladoras de Cd e foram capazes de acumular o metal nos frutos. No intuito de caracterizar o papel do *HMA1* durante o processo de hiperacumulação de Cd em tomate, este gene foi empregado nas etapas que compõem o silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS). O silenciamento do *HMA1* não teve efeito na acumulação de Cd na parte aérea de tomate. Por outro lado, o silenciamento deste gene resultou na redução do peso seco das raízes e no aumento da intensidade dos sintomas de clorose nas plantas cultivadas com Cd a 0,7 mM. Em conjunto, os resultados indicam que o tomate representa um organismo modelo atrativo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na tolerância e na hiperacumulação de Cd.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (80p.) Maio, 2012.

# CHARACTERIZATION OF FUNCTION AND EXPRESSION OF GENES IN RESPONSE TO CADMIUM IN TOMATO<sup>1</sup>

Author: Sara Hartke

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

## ABSTRACT

Cadmium (Cd) is considered an extremely toxic metal to most organisms. Plants are the main pathways for Cd entry into the food chain. Tomato, a species widely used for human consumption, was recently identified as a Cd hyperaccumulator. Therefore, this study aimed to quantify Cd content in leaves and fruits of six tomato cultivars, as well as characterize the genes possibly involved in Cd tolerance and hyperaccumulation in this species. To this end, the tomato cultivars were grown in the presence of Cd at 90 mg kg<sup>-1</sup> or in the absence of the metal. Simultaneously, a search for orthologous genes to *HMA*s (*HMA1* - *HMA4*) from *Arabidopsis thaliana* was performed, these genes are a group of metal transporters, including Cd. By this search, was identified an ortholog of *HMA1* from *A. thaliana* in tomato. The expression of *HMA1* and also of the genes *LeNRAMP3*, *LeFER*, *LeIRT1* *LeNRAMP1*, which are involved in transport of metals in tomato, was compared between plants grown with and without Cd. In most tomato cultivars, all genes were responsive to Cd, and it was verified an increase in expression in response to the metal presence. All the tomato cultivars used were characterized as Cd hyperaccumulators and were able to accumulate the metal in the fruits. In order to characterize the role of the *HMA1* during the process of Cd hyperaccumulation in tomato, this gene was used in the steps that comprise the virus induced gene silencing (VIGS). The silencing of *HMA1* had no effect on Cd accumulation in tomato shoot. On the other hand, this gene silencing resulted in a reduction of the roots dry weight and in an increased severity of the symptoms of chlorosis in plants grown with 0.7 mM of Cd. Taken together, these results indicate that tomato represents an attractive model organism for elucidation of the mechanisms involved in Cd tolerance and hyperaccumulation.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (80p.) May, 2012.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Toxicidade do Cd às plantas.....	3
2.2 Tolerância das plantas ao Cd.....	7
2.3 Plantas acumuladoras de metais.....	9
2.4 Genes relacionados à absorção, translocação e acúmulo de Cd nas plantas.....	12
2.5 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS).....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Quantificação do teor Cd em cultivares de tomate.....	22
3.2 Caracterização da expressão de genes de tomate cultivado na presença de Cd.....	24
3.2.1 Material vegetal.....	24
3.2.2 Extração de RNA total.....	25
3.2.3 Síntese de cDNA.....	25
3.2.4 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.....	26
3.3 Busca de ortólogos aos genes <i>HMA</i> s ( <i>HMA1</i> – <i>HMA4</i> ) de <i>A. thaliana</i> em tomate.....	27
3.3.1 Identificação dos ortólogos.....	27
3.4 Silenciamento dos genes <i>PDS</i> e <i>HMA1</i> .....	29
3.4.1 Clonagem dos genes <i>PDS</i> e <i>HMA1</i> no vetor pGEM-T.....	29
3.4.2 Extração de plasmídeos recombinantes.....	31
3.4.3 Sub-clonagem dos genes <i>PDS</i> e <i>HMA1</i> no vetor de silenciamento.....	32
3.4.4 Infiltração com <i>A. tumefaciens</i> contendo os vetores virais.....	36
3.4.5 Confirmação do silenciamento do <i>PDS</i> e do <i>HMA1</i> .....	37
3.4.6 Avaliação fenotípica das plantas silenciadas para o <i>HMA1</i> .....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Comparação dos teores de Cd entre seis cultivares de tomate.....	40
4.2 Análise de expressão de genes relacionados com o transporte de metais.....	45
4.3 Identificação de genes ortólogos aos <i>HMA</i> s de <i>A. thaliana</i> .....	51
4.4 Silenciamento do gene <i>PDS</i> em tomate.....	54

4.5 Silenciamento do gene <i>HMA1</i> em tomate.....	58
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
7. APÊNDICES.....	80

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR. ....	27
2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e qRT-PCR..	28
3. Fator de bioacumulação de Cd das cultivares de tomate (média ± DP). ....	44

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Teor de Cd nas folhas (A) e frutos (B) de seis cultivares de tomate cultivadas na presença da dose de Cd de 90 mg kg <sup>-1</sup> substrato.....	42
2. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados por qRT-PCR a partir de cDNA de tomate.....	47
3. Expressão relativa dos genes <i>LeFER</i> , <i>LeIRT1</i> e <i>LeNRAMP1</i> nas raízes e do gene <i>LeNRAMP3</i> nas raízes e na parte aérea das cultivares de tomate.....	49
4. Eletroforese em gel de agarose do fragmento <i>HMA1</i> amplificado a partir de cDNA da parte aérea (1) e das raízes (2) da cv. Micro-Tom...	52
5. Expressão relativa do <i>HMA1</i> .....	54
6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos plasmídeos TRV2-GFP (1) e TRV2b-PDS (2), bem como das colônias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas com os plasmídeos pTRV2b-GFP (3-7) e pTRV2b-PDS (8-12)	55
7. Fotobranqueamento em cultivares de tomate agroinfiltradas com o inóculo de silenciamento para o <i>PDS</i> .....	56
8. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA do <i>PDS</i> nas folhas jovens da cv. Micro-Tom aos 14 dpi.....	57
9. Fotobranqueamento até o estágio reprodutivo da cv. Micro-Tom.....	58
10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas com os plasmídeos pTRV2b-HMA1 (1-5) e pTRV2b-GFP (6).....	59
11. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA do <i>HMA1</i> nas folhas jovens e nas raízes da cv. Micro-Tom aos 9 dpi.....	60
12. Plantas de tomate cv. Micro-Tom, não silenciadas ou silenciadas para o <i>HMA1</i> , submetidas aos tratamentos sem Cd ou com Cd.....	61

13. Quantificações de comprimento da raiz principal (A), PS das raízes (B), PS da parte aérea (C) e teor de Cd na parte aérea (D) em plantas da cv. Micro-Tom não silenciadas ou silenciadas para o *HMA1*..... 64

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b-PDS com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R.....	80
2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b-HMA1 com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R.....	80

## 1 INTRODUÇÃO

Solos contaminados com cádmio (Cd) representam sério risco para a saúde humana e para os organismos vivos em geral, podendo ser facilmente incorporado na cadeia alimentar. Os fertilizantes fosfatados representam fontes significativas deste metal, os quais são intensamente utilizados na agricultura. (Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Mendes *et al.*, 2006). Por esta razão, o manejo mais intensivo de áreas agrícolas, observado nas últimas décadas, pode causar o aumento da disponibilidade de Cd (Bizarro *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2006).

Algumas espécies de plantas tolerantes possuem alta capacidade de acumular Cd em seus tecidos, sendo denominadas hiperacumuladoras. Recentemente, a espécie *Solanum lycopersicum* (tomate) foi identificada como hiperacumuladora de Cd (Silva, 2010). Este fato gera muitas preocupações, uma vez que se trata de uma espécie amplamente utilizada para consumo humano (López-Millán *et al.*, 2009). Uma estratégia para contornar este tipo de problema consiste no desenvolvimento de plantas que apresentem menor capacidade de transportar o Cd para o órgão consumido (Guimarães *et al.*, 2008). Para tanto, é necessário que sejam elucidados os mecanismos envolvidos no transporte e na acumulação de Cd em plantas (Chen *et al.*, 2007). As espécies hiperacumuladoras são modelos atrativos para os estudos destes mecanismos.

Diversos estudos foram desenvolvidos no intuito de identificar os genes relacionados com a absorção, translocação e acúmulo de Cd em plantas. Dentre os genes identificados, destacam-se os genes *HMA*s (*HMA1* – *HMA4*) de *A. thaliana*, os quais formam um grupo de transportadores de Cd, Zn, Co e Pb (Silva, 2010; Cobbett & Wong, 2009; Verret *et al.*, 2004, 2005; Courbot *et al.*, 2007; Hanikenne *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2008). O estudo de genes candidatos para o transporte e acúmulo de Cd em tomate pode contribuir consideravelmente para o entendimento dos mecanismos envolvidos no fenótipo hiperacumulador. Um método bem estabelecido para tal finalidade consiste no silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS), o qual é descrito como uma importante ferramenta de análise genética em *S. lycopersicum* (Orzaez *et al.*, 2009).

O uso do termo hiperacumulação, no caso de plantas, é comumente associado aos trabalhos que visam a fitorremediação de áreas contaminadas. Por esta razão, torna-se importante esclarecer que o presente trabalho não tem como foco a fitorremediação, mas sim os mecanismos envolvidos na acumulação de Cd em plantas utilizadas na alimentação.

### **Objetivos**

Quantificar o teor de Cd nas folhas e frutos de seis cultivares de tomate.

Avaliar o efeito do Cd na expressão de genes relacionados com o transporte de metais em tomate.

Otimizar o método VIGS em tomate cv. Micro-Tom para o estudo do efeito do silenciamento nas raízes e na parte aérea.

Analisar a função do ortólogo ao *HMA1* de *A. thaliana* em tomate cv. Micro-Tom através do método VIGS.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Toxicidade do Cd às plantas

O Cd é considerado um elemento traço de elevada toxicidade que apresenta relativa mobilidade no sistema solo-planta, podendo ser transferido aos animais, inclusive aos humanos, através da cadeia alimentar (Pinto *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2009; Hsu & Kao, 2004). Este metal está presente no ambiente como um elemento raro, pois sua ocorrência natural nos solos atinge concentrações próximas a  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  (Peterson & Alloway, 1979). Entretanto, o aumento da industrialização e o manejo mais intensivo de áreas agrícolas têm agravado as contaminações com Cd. Atividades como a mineração, eliminação de resíduos industriais e municipais, fabricação e descarte de baterias, aplicações de fertilizantes fosfatados e a utilização de resíduos de tratamento de esgoto como adubação são alguns exemplos de fontes dessa contaminação (Hassan *et al.*, 2005). O CONAMA (2009) estabeleceu valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. O Valor de Prevenção definido para o Cd no cenário agrícola foi de  $3 \text{ mg kg}^{-1}$ . Contudo, o aumento gradativo das concentrações de Cd nos solos agrícolas é um problema encontrado em muitos países. Como exemplo, na China e na França, foram identificados solos com concentrações de Cd superiores a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Liu *et al.*, 2008).

Diferentes espécies e cultivares de plantas diferem quanto à capacidade de tolerar e acumular Cd. De modo geral, concentrações foliares de 5-10 mg de Cd kg<sup>-1</sup> de peso seco (PS) são tóxicas à maiorias das plantas (White & Brown, 2010). Uma vez absorvido em excesso, o Cd pode interferir em diversos processos fisiológicos e metabólicos (Lux *et al.*, 2011; López-Millán *et al.*, 2009). O processo de absorção do Cd é bastante rápido e os primeiros sintomas de toxicidade se tornam perceptíveis após 48 h de contato com o metal (Tiryakioglu *et al.*, 2006). Os principais sintomas visuais da fitotoxicidade do Cd consistem no enrolamento, necrose e amarelecimento das folhas, clorose de hastes e folhas, redução do crescimento e da produtividade (Wahid *et al.*, 2009). Estes dois últimos sintomas têm sido atribuídos à redução da taxa fotossintética (Verma & Dubey, 2002). O Cd pode afetar a fotossíntese através da indução do fechamento dos estômatos, que é justificada pela redução da condutância estomática; perturbação da estrutura lamelar dos cloroplastos; alteração da atividade de enzimas do Ciclo de Calvin e diminuição do conteúdo de clorofila (Vassilev *et al.*, 2005; Vassilev & Lidon, 2011). Esta perda de clorofila pode ocorrer devido à inibição de sua biossíntese, ativação da sua degradação ou por meio da redução da densidade de cloroplastos por célula (Barylá *et al.*, 2001; Vassilev & Lindon, 2011). Todas as enzimas que possuam ligações dissulfeto, bem como as enzimas que contenham metais são alvos potenciais da ação do Cd. O metal é capaz de inativar as enzimas por interferir na atividade do sítio catalítico ou ainda por provocar sua desnaturação (Das *et al.*, 1997).

As raízes de plantas submetidas à presença do Cd, que constituem o alvo inicial da ação do metal, sofrem inibição do alongamento e alterações

anatômicas, como a aceleração do desenvolvimento da endoderme e da exoderme (Lux *et al.*, 2011). Estes efeitos nas raízes limitam a absorção de água e influenciam no estado nutricional da planta (Wahid *et al.*, 2009). Além disso, em algumas espécies, o Cd parece ter efeito antagônico sobre a absorção de metais essenciais, ocasionando a deficiência destes nutrientes na planta (Hassan *et al.*, 2005; Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Guimarães *et al.*, 2008).

Diversos estudos apontam que o Cd também é responsável pela geração de estresse oxidativo, que resulta da interação do metal com o sistema antioxidante enzimático e não enzimático (Benavides *et al.*, 2005; Yadav, 2010). Estes sistemas são responsáveis pelo processo de limpeza de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são continuamente produzidas por diversas rotas metabólicas das plantas (Gonçalves *et al.*, 2007). Sendo assim, para controlar os níveis de ROS e proteger as células, as plantas utilizam moléculas antioxidantes como a glutathiona (GSH), ascorbato e carotenoides, além de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Gratão *et al.*, 2005).

A GSH é um importante componente para o balanço redox das células, estando envolvida em muitos outros processos celulares além da defesa contra ROS, incluindo o sequestro de metais pesados e a desintoxicação de xenobióticos (Yadav *et al.*, 2010). O Cd pode causar a depleção nos níveis de GSH devido à ocorrência da interação direta entre a GSH e o metal, ou como consequência da produção massiva de fitoquelatinas (PCs) (Guimarães *et al.*, 2008). A GSH é utilizada como precursora na síntese de PCs, as quais são compostas por peptídeos que apresentam capacidade de ligação aos metais

pesados (Yadav *et al.*, 2010). Através do ciclo ascorbato-glutationa, estes dois antioxidantes são empregados na redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) à água, contribuindo para a proteção contra ROS em diferentes compartimentos celulares (Jiménez *et al.*, 1997). O papel dos carotenoides nas plantas inclui a fotoproteção do sistema fotossintético, realizada através da supressão dos estados triplete da clorofila, evitando assim a formação do oxigênio singlete. Caso o oxigênio singlete seja formado por outros processos, o mesmo será também suprimido pelo carotenoide (Cardoso, 1997). Em folhas de plantas de tomate, sob condições de estresse por excesso de Cd, foram detectadas reduções nos conteúdos de ascorbato e carotenoides, o que poderia afetar a capacidade de desintoxicação de ROS por estas plantas (Hédiji *et al.*, 2010).

A enzima SOD é responsável pela dismutação do ânion superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . São conhecidos três tipos de SODs, as quais diferem pelo cofator metálico, sendo denominadas CuZnSOD, MnSOD e FeSOD. O  $H_2O_2$ , resultante da atividade destas enzimas, é eliminado pela sua conversão à  $H_2O$  pela CAT e peroxidases como a APX, que atua no ciclo ascorbato-glutationa (Jiménez *et al.*, 1997). Alguns trabalhos relatam que a presença de Cd ocasiona a redução da atividade e dos níveis proteicos das enzimas CuZnSOD, MnSOD (Sandalio *et al.*, 2001; Romero-Puertas *et al.*, 2002) e CAT (Romero-Puertas *et al.*, 2002).

Em face desses efeitos do Cd sobre o sistema de defesa antioxidante, a presença do metal pode favorecer o acúmulo de ROS nas plantas, resultando na degradação de proteínas e de ácidos nucleicos e na danificação de membranas (Gonçalves *et al.*, 2007; Gratão *et al.*, 2005; Hédiji *et al.*, 2010). Em resumo, a alteração da atividade de enzimas antioxidantes, bem como os

aumentos da formação de produtos da peroxidação de lipídeos, da permeabilidade das membranas, e da degradação da clorofila representam importantes evidências da indução do estresse oxidativo pelo Cd (Belkhadi *et al.*, 2010; Somashekaraiah *et al.*, 1992). Em função destas mudanças metabólicas, o Cd é considerado um indutor de senescência prematura (Balestrasse *et al.*, 2004; Vassilev *et al.*, 1997).

## **2.2 Tolerância das plantas ao Cd**

O nível de tolerância das plantas ao Cd é dependente de mecanismos fisiológicos e moleculares inter-relacionados. Estes mecanismos incluem a complexação do Cd com ligantes orgânicos, imobilização do metal na parede celular, compartimentalização, indução do sistema antioxidante enzimático e não enzimático e a modificação do metabolismo da planta a fim de permitir o rápido reparo de estruturas celulares danificadas e o correto funcionamento de rotas metabólicas (Benavides *et al.*, 2005; Hédiji *et al.*, 2010).

Na rizosfera, o nível de íons e moléculas solúveis pode ser alterado através da liberação de exsudatos pelas raízes. Os ácidos orgânicos estão entre os compostos liberados e podem formar complexos com o Cd presente no solo (Clemens *et al.*, 2002; Nigam *et al.*, 2001). A absorção do Cd na forma de complexo com ácidos orgânicos reduz a toxicidade deste metal às plantas (Nigam *et al.*, 2001). Após a absorção do Cd, a primeira barreira ao estresse causado por este metal pode consistir na imobilização do Cd na raiz, prevenindo a translocação do metal para a parte aérea. Isto pode ocorrer através da secreção de carboidratos (mucilagem e calose) ou pela ligação do íon metálico com pectinas e grupos histidil presentes na parede celular (Sanitá

di Toppi & Gabrielli, 1999). Esta ligação do Cd à parede celular é verificada tanto na raiz quanto na parte aérea, limitando a entrada do metal no citoplasma de muitas células (Leita *et al.*, 1996; Lux *et al.*, 2011).

Um dos mais importantes mecanismos de tolerância consiste na complexação intracelular (quelação) do Cd. Os quelantes mais estudados incluem a GSH, as PCs e as metalotioneínas (MTs) (Cobbett, 2000; Gill & Tujeta, 2011). Conforme mencionado no item anterior, o Cd pode interagir diretamente com a GSH e ao mesmo tempo induzir a produção PCs, podendo ocasionar uma drástica redução nos níveis de GSH. Entretanto, nas espécies tolerantes, a produção massiva de PCs é acompanhada por um processo coordenado de indução da transcrição de muitos genes relacionados à absorção e a assimilação de sulfato, bem como da biossíntese de GSH (Guimarães *et al.*, 2008; Gill & Tujeta, 2011). O Cd também pode ser quelado com metalotioneínas, as quais são compostas por peptídeos ricos em cisteínas, apresentando alta afinidade por metais pesados (Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999). Subsequentemente à associação do Cd com quelantes, os complexos formados podem ser compartimentalizados no vacúolo, o que previne a movimentação do metal no citoplasma (Benavides *et al.*, 2005). O transporte para o interior do vacúolo também pode ocorrer para o íon metálico livre (Clemens, 2006).

O efeito do Cd sobre a atividade das enzimas antioxidantes varia mesmo entre as espécies tolerantes e pode depender da dose do metal, do estágio de desenvolvimento, do tempo de exposição ao metal e do tecido avaliado (Gratão, 2008). Diversos estudos relatam o aumento da atividade de determinadas enzimas antioxidantes como resposta ao estresse induzido por

Cd. Como exemplos podem ser citados os aumentos nas atividades da SOD, CAT e glutathione redutase (GR) em plantas de tomate (Dong, *et al.*, 2006; Gratão, 2008), CAT em *Thlaspi caerulescens* (Boominathan & Doran, 2003) e SOD em *Alyssum argenteum* (Schickler & Caspi, 1999). Entretanto, o efeito do Cd sobre estas enzimas pode ser diferente em outras espécies tolerantes. Gzyl *et al.* (2009) avaliaram a relação entre a atividade de algumas enzimas antioxidantes e a tolerância ao Cd. Neste estudo, duas linhagens celulares de pepino, uma tolerante e uma sensível ao metal, foram expostas ao Cd para a posterior quantificação da atividade da SOD, CAT, APX e guaiacol peroxidase (POX). Na linhagem sensível foi verificado uma diminuição na atividade da POX e da SOD e um aumento na atividade da CAT e APX. Já na linhagem tolerante as atividades da SOD e da CAT diminuíram e da POX e APX se mantiveram praticamente inalteradas. Comparações semelhantes foram realizadas em plântulas de arroz de uma cultivar tolerante e de uma cultivar sensível ao Cd (Hsu & Kao, 2004). Após o contato das plantas com o Cd, os autores analisaram a atividade das enzimas SOD, APX, glutathione redutase, CAT e peroxidase e verificaram um aumento na atividade destas enzimas apenas na cultivar sensível. Isto sugere que o estresse oxidativo induzido pelo metal é expresso de maneira diferente entre a cultivar sensível e a cultivar tolerante.

### **2.3 Plantas acumuladoras de metais**

Algumas espécies de plantas, consideradas hiperacumuladoras de metais pesados, apresentam um elevado nível de tolerância e de acumulação foliar destes metais (Verbruggen *et al.*, 2009). Especificamente com relação ao

Cd, uma concentração foliar superior a  $100 \text{ mg de Cd kg}^{-1} \text{ PS}$  (0,01%) é utilizada como valor limitante para que uma espécie seja considerada hiperacumuladora (Baker *et al.*, 2000). Os teores de Cd na parte aérea das plantas são, em grande parte, determinados pela entrada do metal nas raízes, pelo sequestro nos vacúolos das células das raízes, pela translocação no xilema e no floema, e pela diluição na parte aérea através do crescimento (Lux *et al.*, 2011). Espécies hiperacumuladoras de metais não são comuns entre as plantas superiores terrestres, sendo que menos de 0,2% das angiospermas apresentam esta característica (Baker *et al.*, 2000; Verbruggen *et al.*, 2009).

O Cd é considerado um dos poluentes metálicos mais perigosos ao meio ambiente e a saúde humana, tendo em vista que as plantas cultivadas em solos contaminados são capazes de absorver e acumular o metal nos tecidos comestíveis, constituindo a principal forma de entrada do Cd na cadeia alimentar (Ingwersen & Streck 2005). As espécies identificadas como hiperacumuladoras de Cd incluem *Thlaspi caerulescens*, *Thlaspi praecox*, *Arabidopsis halleri*, *Rorippa globosa*, *Viola baoshanensi*, *Sedum alfredii*, *Picris divaricata*, *Phytolacca americana*, *Solanum nigrum*, *Solanum americanum* e *Aeluropus littoralis* (Lux *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2006; Silva, 2010; Rezvani & Zaefarian, 2011). Além destas espécies, as cultivares de tomate Gaúcho e Micro-Tom foram, recentemente, identificadas como hiperacumuladoras de Cd. As concentrações de Cd acumuladas nas raízes, na parte aérea e nos frutos de tomate cv. Micro-Tom e na parte aérea da cv. Gaúcho apresentaram comportamento similar, aumentando de forma quadrática com incremento da dose de Cd no substrato. O teor de Cd nos frutos da cv. Micro-Tom foi superior a  $30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PS}$  na presença da dose de  $125 \text{ mg de Cd kg}^{-1}$  de substrato

(Silva, 2010). Este nível de transporte de Cd para os frutos gera muitas preocupações, tendo em vista que representa uma possível via de entrada do metal na cadeia alimentar.

Em diferentes partes do mundo existem relatos de vegetais amplamente utilizados para consumo que são expostos a elevados níveis de contaminações com Cd (Tüzen, 2003; Yusuf *et al.*, 2003; Demirezen & Aksoy, 2006; Li *et al.*, 2006). Yang *et al.* (2010) demonstraram a existência de diferenças significativas na capacidade de acumulação de Cd na parte aérea de 28 espécies de hortaliças, incluindo o tomate. A ordem de acumulação de Cd determinada por estes autores está descrita a seguir: leguminosas (Leguminosae) < cucurbitáceas (Cucurbitaceae) < cebolas e alhos (Amaryllidaceae e Liliaceae) < vegetais de raiz (Umbelliferae and Cruciferae) < couve e couve-flor (Cruciferae) < solanáceas (Solanaceae) < hortaliças folhosas (Cruciferae, Compositae e Chenopodiaceae).

Diversos estudos foram conduzidos para investigar os teores de Cd em partes comestíveis de vegetais e revelaram níveis de acúmulo que extrapolam o máximo tolerável (Miller *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009; Marković *et al.*, 2010). Dessa forma, tornam-se promissoras as estratégias que visam a seleção de plantas que apresentem menor capacidade de transportar o Cd para o órgão consumido. As plantas hiperacumuladoras de metais são organismos modelo atraentes para o estudo dos mecanismos envolvidos neste processo. A capacidade que tais plantas apresentam de sobreviver e predominar em ambientes ricos em metais pesados, onde a grande maioria das plantas não sobreviveria, oferece um excelente sistema para a identificação do maior

número possível de mecanismos que contribuam para a tolerância e para o acúmulo destes metais (Silva, 2010; Guimarães *et al.*, 2008).

#### **2.4 Genes relacionados à absorção, translocação e acúmulo de Cd nas plantas**

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados para a identificação de transportadores de metais pesados em plantas. Através destes trabalhos, foi verificado que em muitas espécies a absorção do Cd é feita por transportadores de cátions com ampla especificidade de substrato (Guimarães *et al.*, 2008). Por esta razão, é possível que o transporte de Cd nas plantas ocorra como uma consequência acidental da sua similaridade com íons metálicos essenciais. Dessa forma, o transporte do Cd pode ocorrer através das proteínas transportadoras pertencentes às famílias ABC (*ATP-Binding Cassette*), CDF (*Cation Diffusion Facilitators*), ZIP (*Zinc-regulated transporter/Iron-regulated transporter-like Protein*), ATPase, NRAMP (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein*) e OPT (*Oligopeptide Transporters*) (Lux *et al.*, 2011; Grotz & Guerinot, 2006; Curie *et al.*, 2009).

A entrada do Cd nas células da raiz envolve transportadores da família ZIP, incluindo ortólogos do *AtIRT1* (*Iron-Regulated Transporter1*) de *A. thaliana* e do *TcZNT1* (*Zinc Transporter1*) de *T. caerulescens* (Lux *et al.*, 2011). Além de transportar Cd, o *AtIRT1* atua no transporte de outros íons metálicos divalentes, como o Fe, Co, Mn e Zn (Eide *et al.*, 1996; Korshunova *et al.*, 1999; Vert *et al.*, 2002). Em resposta à deficiência de Fe, é verificado um aumento nos níveis proteicos do transportador *AtIRT1* (Kim & Guerinot, 2007; Colangelo & Guerinot, 2004). Este aumento é regulado pelo fator de transcrição *AtFRU*

(*FER-like Regulator of iron Uptake*), o qual é um ortólogo do gene *FER* de tomate (*LeFER*) e também apresenta aumento no acúmulo de transcritos na condição de deficiência de Fe (Buckhout *et al.*, 2009; Kim & Guerinot, 2007; Colangelo & Guerinot, 2004; Bauer *et al.*, 2004b). O gene *TcZNT1*, homólogo do gene *ZIP4* de *A. thaliana*, codifica para um transportador que possui alta afinidade por Zn e baixa afinidade por Cd (Pence *et al.*, 2000; Plaza *et al.*, 2007). Outro transportador, identificado primeiramente em trigo e denominado *TaLCT1* (*Low-affinity Cation Transporter1*), também pode estar envolvido na absorção do Cd pelas plantas. Através da expressão do cDNA de *TaLCT1* em levedura, foi possível verificar que o *TaLCT1* atua na absorção dos íons essenciais Ca, Na e K, bem como na absorção do Cd (Schachtman *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 1998). Recentemente foi identificado um gene homólogo ao *TaLCT1* em arroz (*OsLCT1*). O *OsLCT1* se localiza na membrana plasmática e está envolvido no transporte de Cd, K, Ca, Mg e Mn. Entretanto, enquanto o *TaLCT1* é descrito como mediador do influxo de íons o *OsLCT1* é considerado um exportador de íons. Por esta razão, os autores envolvidos neste último estudo sugerem que a diferenciação do arroz e do trigo resultou em funções divergentes para os referidos transportadores (Uraguchi *et al.*, 2011). Existe ainda outra forma de entrada do Cd como íon livre nas células, a qual envolve os canais catiônicos ativados por despolarização, canais catiônicos ativados por hiperpolarização e canais catiônicos insensíveis à voltagem (Lux *et al.*, 2011). Além disso, as plantas podem absorver o Cd associado à quelantes. A proteína transportadora de milho *ZmYS1* (*Yellow Stripe1*), membro da família OPT, atua no transporte de alguns metais quelados com fitosideróforo ou nicotianamina (Schaaf *et al.*, 2004). Os metais

transportados através do ZmYS1 incluem o Fe, Ni, Zn, Cu e, em uma taxa reduzida, o Mn e o Cd (Schaaf *et al.*, 2004; Curie *et al.*, 2009). Uma vez absorvido, o Cd pode ser transportado para fora das células da epiderme da raiz através do AtPDR8, um membro da subfamília PDR (*Pleiotropic Drug Resistance*) dos transportadores ABC. Plantas de *A. thaliana* superexpressando o *AtPDR8* são mais resistentes ao Cd em comparação com as plantas controle. O AtPDR8 reduz o teor de Cd nas plantas através do transporte deste metal do citoplasma para o apoplasto (Kim *et al.*, 2007). Este transportador também contribui para a resistência a patógenos em *A. thaliana*, possivelmente por facilitar a exportação de substâncias relacionadas com a defesa contra patógenos (Kobae *et al.*, 2006).

Em muitas espécies de plantas, a tolerância ao Cd é relacionada com a compartimentalização do metal no vacúolo (Verbruggen *et al.*, 2009; Lux *et al.*, 2011). O Cd livre pode ser transportado para o interior do vacúolo por meio dos seguintes mecanismos: através do antiporte  $H^+/Cd^{2+}$ , que envolve ortólogos de *AtCAX2* e *AtCAX4* (Korenkov *et al.*, 2007, 2009); por transportadores  $P_{1B}$ -ATPases, como ortólogos do *AtHMA3* (*Heavy Metal Associated3*) (Morel *et al.*, 2009), e possivelmente através de transportadores da família CDF, que inclui ortólogos do *TcMTP1* (*Metal Tolerance Protein1*) (Milner & Kochian, 2008). Transportadores ABC, como ortólogos do *AtMRP3* (*Multidrug Resistance Protein3*), atuam no transporte do Cd associado a quelantes (Tommasini *et al.*, 1998).

Os CAXs (*Cation Exchangers*) fazem parte do conjunto de transportadores que coordenam a redistribuição de cátions, incluindo o  $Ca^{2+}$  (Shigaki & Hirschi, 2006). Na presença de Cd, os transportadores *AtCAX2* e

AtCAX4 contribuem significativamente para o sequestro do metal no vacúolo (Korenkov *et al.*, 2009). Os transportadores P<sub>1B</sub>-ATPases pertencem a superfamília P-type ATPases, a qual abrange um grupo de enzimas que usam ATP para transportar uma vasta gama de cátions através da membrana contra o gradiente eletroquímico (Williams & Mills, 2005). Em *A. thaliana* foram identificados oito membros da subfamília P<sub>1B</sub>-ATPases, os quais são divididos em dois grupos: transportadores de Zn/Cd/Co/Pb (AtHMA1 – AtHMA4) e transportadores de Cu/Ag (AtHMA5 – AtHMA8) (Williams & Mills, 2005; Colangelo & Guerinot, 2006). O AtHMA3 atua no processo de desintoxicação dos metais Zn, Co, Cd, e Pb através do transporte destes elementos para o interior do vacúolo. A superexpressão do *AtHMA3* em *A. thaliana* aumentou a tolerância das plantas ao Zn, Co, Cd, e Pb e elevou o acúmulo de Cd em aproximadamente 2,5 vezes nas raízes e em aproximadamente 2 vezes na parte aérea (Morel *et al.*, 2009). Por meio dos transportadores CDF os cátions divalentes Zn, Co, Fe, Cd, Ni e Mn podem ser transportados do citoplasma para fora das células ou para compartimentos subcelulares (Montanini *et al.*, 2007). Muitos autores sugerem que o TcMTP1 se encontra localizado na membrana do vacúolo, atuando no transporte de Zn e possivelmente de Cd para o interior deste compartimento (Milner & Kochian, 2008; Verbruggen *et al.*, 2009). A maior abundância de mRNA do *TcMTP1* é verificada nas folhas em desenvolvimento das plantas jovens e adultas (Küpper & Kochian, 2010). Além disso, a expressão do *MTP1* na parte aérea de *T. caerulescens* é muito superior à expressão de seus homólogos em espécies relacionadas não acumuladoras de metais. Por esta razão, é especulado que o TcMTP1 tenha uma importante contribuição no processo de hiperacumulação de metais

pesados (Milner & Kochian, 2008; Küpper & Kochian, 2010). O transporte do Cd quelado com GSH envolve o AtMRP3, o qual não está envolvido somente no transporte de complexos com GSH, mas também no transporte de catabólitos de clorofila (Tommasini *et al.*, 1998; Lux *et al.*, 2011). Diversos trabalhos comprovam a presença do Cd quelado com PCs no vacúolo das plantas. Embora ainda não tenha sido identificado o transportador responsável por este processo, é sugerido o envolvimento de um transportador do tipo ABC (Verbruggen *et al.*, 2009).

A exportação do Cd para fora do vacúolo pode ocorrer através de transportadores NRAMP, incluindo ortólogos do *AtNRAMP3* e do *AtNRAMP4* (Lux *et al.*, 2011; Thomine *et al.*, 2000; Verbruggen *et al.*, 2009). O *AtNRAMP3* atua no transporte de Fe, Mn e Cd. Enquanto que o *AtNRAMP4* é responsável pelo transporte de Fe, Mn, Zn e Cd (Verbruggen *et al.*, 2009; Oomen *et al.*, 2009). A expressão dos genes *AtNRAMP3* e *AtNRAMP4* é aumentada em resposta à deficiência de Fe (Thomine *et al.*, 2000; Bereczky *et al.*, 2003). O mesmo efeito é verificado na expressão de outro gene que codifica para um transportador da mesma família, o *AtNRAMP1*. Este transportador também parece estar envolvido no transporte de Fe e Mn em *A. thaliana* e, diferentemente do *AtNRAMP3* e do *AtNRAMP4*, se encontra localizado na membrana plasmática (Cailliatte *et al.*, 2010; Curie *et al.*, 2000). A superexpressão do *AtNRAMP3* em *A. thaliana* resultou no aumento da sensibilidade desta planta ao Cd, tendo em vista a maior remobilização do metal a partir do vacúolo (Thomine *et al.*, 2000). O Cd presente no citoplasma das células da raiz pode atingir o xilema por meio de transportadores P<sub>1B</sub>-ATPases, como ortólogos do *AtHMA2* e do *AtHMA4* (Lux *et al.*, 2011; Wong &

Cobbett, 2009). Além disso, o Cd como íon livre e na forma de complexos também pode chegar até o xilema por uma rota apoplástica em regiões da raiz com ausência de bandas de Caspary (Lux *et al.*, 2011).

Recentemente, Wong e Cobbett (2009) demonstraram que os transportadores AtHMA2 e AtHMA4 juntos constituem o principal mecanismo de translocação do Cd das raízes para a parte aérea em *A. thaliana*. Além de transportar Cd, estes HMAs são essenciais para a translocação de Zn (Hussain *et al.*, 2004; Wong & Cobbett, 2009). Em condições normais de cultivo, o duplo mutante de *A. thaliana hma2,hma4* apresentou um fenótipo característico de deficiência em Zn. Entretanto, o fenótipo foi restituído pela aplicação adicional de Zn, sugerindo que em concentrações elevadas de Zn este metal é transportado por mecanismos adicionais. O mesmo pode ocorrer para o Cd, porém não pôde ser testado em *A. thaliana* devido à toxicidade do Cd em concentrações mais elevadas (Wong & Cobbett, 2009). A exposição de plantas de *A. thaliana* ao Cd e ao excesso de Zn não alteraram a expressão do *AtHMA2*. Contudo, estes dois metais induziram a atividade de ATPase do *AtHMA2* quando o gene codificante deste transportador foi expresso na membrana de vesículas de levedura (Eren & Arguello, 2004). A expressão do *AtHMA4* atinge os maiores níveis nas raízes de *A. thaliana* (Mills *et al.*, 2003). A superexpressão deste gene em *A. thaliana* resultou em um maior crescimento das raízes na presença de concentrações tóxicas de Zn, Cd e Co e também provocou um aumento no teor de Cd e Zn na parte aérea. Estes resultados evidenciam o papel do *AtHMA4* no transporte de Cd e Zn para o interior do xilema com a posterior translocação para a parte aérea (Verret *et al.*, 2004).

Outro membro da subfamília P<sub>1B</sub>-ATPases, o AtHMA1, também é relatado como transportador de Cd. A expressão do *AtHMA1* em levedura conferiu maior tolerância ao Cd e complementou funcionalmente um mutante hipersensível ao referido metal (Moreno *et al.*, 2008). Este mutante de levedura é deficiente na produção do transportador *yeast cadmium factor1*, o qual atua no transporte vacuolar de complexos formados com glutathiona (Eraso *et al.*, 2004). Além do Cd, os metais Zn, Cu e Co ativaram a atividade de ATPase do AtHMA1 expresso em levedura. O AtHMA1 também mostrou ter um importante papel na homeostase de Ca<sup>+</sup>, uma vez que a presença deste transportador complementou o fenótipo de leveduras mutantes deficientes na produção de transportadores de Ca<sup>+</sup> (Moreno *et al.*, 2008). Em *A. thaliana*, o AtHMA1 se localiza na membrana do cloroplasto, o que conduz ao questionamento de como este transportador foi capaz de complementar o mutante de levedura deficiente na produção de um transportador localizado no vacúolo (Moreno *et al.*, 2008; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Entretanto, este não é o único exemplo de transportador que parece ter localizações diferentes entre leveduras e plantas (Moreno *et al.*, 2008). Mais de uma função já foi descrita para o AtHMA1 em *A. thaliana*. Seigneurin-Berny e colaboradores (2006) demonstraram o envolvimento do AtHMA1 na importação de Cu para o interior do cloroplasto. Estes autores verificaram que o mutante *hma1* de *A. thaliana* apresentou redução no conteúdo de Cu nos cloroplastos e na atividade da SOD. Contudo, não foi detectada variação no conteúdo de plastocianina. Além disso, sob condições de intensa luminosidade, o mutante *hma1* apresentou fenótipo fotossensível. Nestas condições a liberação de ROS é aumentada e as enzimas SOD devem responder ao estresse oxidativo. Entretanto, a atividade

da SOD no mutante *hma1* pode ser insuficiente para controlar o estresse gerado, resultando na destruição das clorofilas. Kim *et al.* (2009) sugeriram que o AtHMA1 atua na exportação de Zn dos cloroplastos, tendo em vista a hipersensibilidade ao Zn e o aumento do teor deste metal nos cloroplastos de um mutante *hma1* de *A. thaliana*. Sendo assim, este último estudo não suporta a função do AtHMA1 como transportador de Cu para o interior do cloroplasto em *A. thaliana* (Nouet *et al.*, 2011).

O transportador AtATM3 (*ABC Transporter of the Mitochondria3*) contribui para a tolerância ao Cd e pode estar envolvido na exportação de Cd complexado com glutathiona (GSH) através da membrana mitocondrial em *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2006; Verbruggen *et al.*, 2009). A expressão do *AtATM3* nas raízes é induzida pelos metais Cd e Pb. Este transportador mitocondrial é também essencial para a homeostase de Fe. Além disso, o AtATM3 parece influenciar significativamente os níveis citoplasmáticos de GSH, possivelmente em função de fornecer uma via para a reciclagem deste antioxidante. Este papel na reciclagem de GSH é baseado na possibilidade de o AtATM3 atuar no transporte de complexos formados com GSH através da membrana da mitocôndria, constituindo uma rota de saída da GSH para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, o complexo formado com GSH pode ser dissociado e após a redução da glutathiona a mesma pode ser reutilizada como antioxidante. A superexpressão do *AtATM3* em *A. thaliana* resultou no aumento da tolerância ao Cd e ao Pb, bem como no aumento do conteúdo de Cd principalmente na parte aérea. Este maior teor de Cd na parte aérea pode envolver o aumento na translocação do Cd das raízes para a parte aérea, uma vez que o aumento nos

níveis citoplasmáticos de Cd complexado com compostos tiólicos possibilita uma maior liberação do Cd no apoplasto (Kim *et al.*, 2006).

## 2.5 Silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS)

Em plantas, o silenciamento gênico pós-transcricional é um importante e eficiente mecanismo natural de defesa contra a infecção viral (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2009). Plantas infectadas por vetores virais recombinantes induzem o mesmo mecanismo natural de defesa, que por sua vez terá como alvo o RNA correspondente ao transgene inserido (Voinnet, 2001). Dessa forma, a técnica de silenciamento gênico induzido por vírus (VIGS) permite o estudo da função de genes por meio da utilização de vetores virais, nos quais é inserido um fragmento gênico de interesse para formar o RNA dupla fita (dsRNA), dando início ao processo de silenciamento (Unver & Budak, 2009). Após a formação do dsRNA, este é clivado em fragmentos de 21 a 26 nucleotídeos pela DICER, uma enzima com domínios de RNase III. Estes fragmentos resultantes, denominados pequenos RNAs de interferência (siRNAs), são incorporados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que irá degradar o mRNA que possua identidade com a sequência do siRNA (Baulcombe, 2004; Unver & Budak, 2009). Liu e colaboradores (2002) demonstraram um eficiente sistema de VIGS, em *S. lycopersicum* cv. Micro-Tom, utilizando um vetor baseado no *Tobacco Rattle Virus* (TRV). Estes autores estabeleceram o silenciamento do gene endógeno fitoeno desaturase (*PDS*), sendo a inserção do TRV veiculada por *Agrobacterium tumefaciens* em plantas de tomate com três semanas de idade. Além deste trabalho, outros também relataram o sucesso do silenciamento de genes, em espécies do

gênero *Solanum*, através da utilização do vetor TRV (Hartl *et al.*, 2008; Brigneti *et al.*, 2004; Jablonska *et al.*, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Quantificação do teor Cd em cultivares de tomate

As quantificações dos teores de Cd foram realizadas nas folhas e nos frutos das cultivares Micro-Tom (sementes cedidas gentilmente pelo Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres da ESALQ/USP, SP, Brasil), Gaúcho (ISLA), Gaúcho Melhorado (Feltrin), IPA6 (Feltrin), Italiano (Topseed Garden®) e Salada (Estaca - Topseed Garden®). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em vasos de 6 litros de capacidade, utilizando como substrato a vermiculita expandida fina tratada a 900°C (Carolina Soil do Brasil Ltda.). Os tratamentos empregados consistiram na presença ou ausência de Cd no substrato. Para o tratamento com Cd a dose utilizada foi de 90 mg de Cd kg<sup>-1</sup> de substrato. Como delineamento experimental foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento e seis plantas por repetição. Deste total de seis plantas apenas três foram cultivadas até a fase reprodutiva, uma vez que as outras três foram coletadas aos 10 dias após a emergência para a análise de expressão gênica descrita no item 3.2. Para o preparo do tratamento com Cd (90 mg kg<sup>-1</sup>) foi utilizado o composto CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O diluído em solução nutritiva para tomate, a qual apresenta a seguinte composição: N (185,4 mg L<sup>-1</sup>), P (54,1 mg L<sup>-1</sup>), K (223,3 mg L<sup>-1</sup>), Ca (138,7 mg L<sup>-1</sup>), Mg (35,2 mg L<sup>-1</sup>), S (39,1 mg L<sup>-1</sup>), B (0,51 mg L<sup>-1</sup>), Cu (0,05 mg L<sup>-1</sup>), Fe

(2,47 mg L<sup>-1</sup>), Mn (0,427 mg L<sup>-1</sup>), Mo (0,108 mg L<sup>-1</sup>) and Zn (0,147 mg L<sup>-1</sup>) . Em seguida, a solução contendo o metal foi homogeneizada na vermiculita e transferida para os vasos. O mesmo processo foi realizado para a condição sem Cd, neste caso apenas a solução nutritiva foi adicionada à vermiculita. Após a colocação da vermiculita nos vasos, foi realizada a semeadura das seis cultivares com ajuste da densidade final para seis plantas por vaso. Durante o período experimental, as plantas dos dois tratamentos foram regadas com água destilada uma vez ao dia e com solução nutritiva uma vez por semana.

A coleta das folhas e frutos da cv. Micro-Tom proveniente do tratamento sem Cd foi feita aos 80 dias após a semeadura. Já a coleta das folhas e frutos desta mesma cultivar proveniente do tratamento com Cd foi feita aos 100 dias após a semeadura, uma vez que a presença do metal no substrato ocasionou um atraso na floração e na frutificação. As folhas e frutos das demais cultivares provenientes do tratamento sem Cd foram coletados aos 120 dias após a semeadura. Estas mesmas cultivares provenientes do tratamento com Cd também apresentaram atraso na floração e na frutificação e, portanto, tiveram suas folhas e frutos coletados aos 180 dias após a semeadura. Apenas as folhas mais velhas foram utilizadas para as determinações do teor de Cd, sendo coletadas as 6 primeiras folhas abaixo da primeira inflorescência, com exceção da cv. Micro-Tom para a qual foi necessária a utilização de todas as folhas. A secagem do material vegetal foi feita em estufa a 55 °C por 24 h para as folhas e 72 h para os frutos. O teor de Cd foi quantificado pelo Laboratório de Análises de Solos da UFRGS segundo a metodologia de abertura por digestão úmida nítrico-perclórica e análise por espectrofotometria de plasma (ICP-OES), tendo como limite inferior de detecção 0,2 mg kg<sup>-1</sup>. A partir das

determinações de Cd nas folhas das cultivares de tomate, foi realizado o cálculo do fator de bioacumulação. Este fator relaciona a concentração de um metal em determinado tecido da planta com a concentração deste mesmo metal no substrato (Zayed *et al.*, 1998). O cálculo foi realizado da seguinte forma:

$$\text{Fator de bioacumulação} = \frac{\text{concentração de Cd nas folhas (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentração de Cd adicionada no substrato (mg kg}^{-1}\text{)}}$$

As quantificações de Cd foram submetidas à análise de variância seguida pelo teste Bonferroni (folhas) ou pelo teste Kruskal-Wallis (frutos) ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.2 Caracterização da expressão de genes de tomate cultivado na presença de Cd**

Nesta etapa, as mesmas cultivares de tomate previamente descritas foram utilizadas para avaliar a expressão de genes relacionados com o transporte de metais em tomate.

#### **3.2.1 Material vegetal**

As plantas utilizadas nesta análise de expressão foram semeadas e cultivadas, até os 10 dias após a emergência, juntamente com as plantas que foram cultivadas até a fase reprodutiva e empregadas nas determinações dos teores de Cd, conforme detalhado no item 3.1. Desse modo, a análise de expressão também consistiu de três repetições por tratamento (presença ou ausência de Cd) e três plantas por repetição para cada cultivar.

### 3.2.2 Extração de RNA total

No momento da coleta, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído de aproximadamente 100 mg de tecido triturado na presença de nitrogênio líquido. Ao tecido triturado foi acrescentado 1 mL de TRI Reagent® (Ambion) e a extração foi procedida conforme as instruções do fabricante.

A concentração do RNA total foi estimada em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 1X [90 mM de Tris-HCl (pH 8,3); 90 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 mM de EDTA], sendo utilizado como marcador 500 ng de  $\lambda$ HindIII. O gel foi deixado em contato com uma solução de tampão TBE 1X adicionada de brometo de etídio (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) por 10 min. Em seguida, o gel foi exposto a luz UV e fotografado através do sistema de fotodocumentação computadorizado (Loccus Biotecnologia). Todas as demais separações de ácidos nucleicos por eletroforese seguiram estes mesmos procedimentos para análise de gel. Em sequência, o RNA extraído foi submetido à reação com a enzima DNase I (RQ1 RNase-Free DNase – Promega) de acordo com o protocolo do fabricante.

### 3.2.3 Síntese de cDNA

A reação de síntese de cDNA foi composta de aproximadamente 250 ng de RNA total tratado com DNase I; tampão 1X da GoScript™; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen); 1,3  $\mu$ M de oligo(dT) (5'- TTT TTT TTT TTT TTT T - 3'); 6 U de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) e 48 U de GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega), totalizando um volume de 6  $\mu$ L que foi submetido às seguintes condições: 5 min a 25 °C, 1 h a 42 °C e 15 min a 70 °C.

### 3.2.4 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

A estimativa da expressão gênica foi realizada através da quantificação do acúmulo de mRNA por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Os genes analisados nesta etapa foram: *LeNRAMP3*, *LeFER*, *LeIRT1* e *LeNRAMP1* (Tabela 1), sendo estes três últimos avaliados somente nas raízes. As reações de amplificação consistiram de 4 µL de cDNA diluído 40 vezes; tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; SYBR® Green (Invitrogen) diluído 10000X; 0,2 µL de ROX (Invitrogen); 0,25 U de Platinum® *Taq* e 3,05 µL de água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Todas as reações em tempo real foram executadas em um sistema de detecção de sequência modelo 7300 Applied Biosystems com as seguintes condições: 2 min a 50 °C; 10 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Ao final destes ciclos foi realizada a etapa de dissociação que consistiu de 15 s a 95 °C; 1 min a 60 °C; 15 s a 95 °C; 15 s a 60 °C. A especificidade de cada reação de amplificação foi verificada em gel de agarose e também através da curva de dissociação. O limiar de fluorescência foi automaticamente estabelecido e os valores de ciclo limiar (Ct) de cada reação foram calculados pelo programa “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem). Os níveis de expressão relativa do gene de interesse em relação ao gene endógeno *UBI3* (Ubiquitina) foram determinados pela diferença entre seus valores de Ct ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gene de interesse}} - Ct_{\text{gene endógeno}}$ ). Adicionalmente, a fim de comparar os níveis de expressão gênica nos tecidos (parte aérea ou raiz) das plantas cultivadas com Cd com o calibrador (expressão gênica nos tecidos das plantas cultivadas sem

Cd) foi utilizada a seguinte equação:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tecido do tratamento com Cd}} - \Delta Ct_{\text{tecido do tratamento sem Cd}}$ . Finalmente, a abundância de transcritos de cada gene de interesse foi determinada por meio da fórmula:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

**TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qRT-PCR.**

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
LeNRAMP3 F/R	TGGTAACTGGATTGTTGGCTGCTGGAC	ATGAATCAAAGAAGGGGGATCAGGGCA
LeFER F/R	TGGTAACTCCAACAAGCAAAGGCACGA	ATGAATTCAGAAGCTGCAATGTGTCCGCC
LeIRT1 F/R	TGGTAAACCCTGGCTACGGGGTTTATGC	ATGAATTCACATGATTTCCAGCCACAGC
LeNRAMP1 F/R	TGGTAAACGAGCGGTTTCGCGTTGTTTG	ATGAATTCGTCTTCCCGCTCCTGACGAT
UBI3*	TGCAGATCTTCGTGAAAACC	AGCGAGCTTAACCTTCTTCT

\* Sequências retiradas do estudo de Chen *et al.* (2009).

### **3.3 Busca de ortólogos aos genes *HMA*s (*HMA1* – *HMA4*) de *A. thaliana* em tomate**

A busca de ortólogos aos genes *AtHMA1*, *AtHMA2*, *AtHMA3* e *AtHMA4* foi realizada em cDNA da cv. Micro-Tom, a qual foi cultivada até os 10 dias após a emergência em vermiculita adicionada da dose de Cd de 90 mg kg<sup>-1</sup>. O preparo deste tratamento seguiu os mesmos procedimentos do item 3.1. Os procedimentos de extração de RNA total, tratamento com DNase e síntese de cDNA foram os mesmos adotados no item 3.2.

#### **3.3.1 Identificação dos ortólogos**

Os oligonucleotídeos iniciadores para os genes *HMA*s (Tabela 2) foram desenhados, sempre que possível, para regiões codificantes conservadas, as quais foram identificadas por meio do alinhamento entre a sequência de *A.*

*thaliana* com o maior número de espécies possível onde o gene em questão tenha sido identificado.

A PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen), contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 50 mM de KCl; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 µL de cDNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 20 µL. A reação foi realizada em um termociclador (Tonegen – Tonederm Genetic) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, pareamento a 55 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 1 min, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados pela comparação com o perfil eletroforético do marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen) em gel de agarose a 2% em TBE 1X. Os genes identificados em tomate foram submetidos à mesma análise de expressão descrita no item 3.2.

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e qRT-PCR.

	Direto (5' a 3')	Reverso (5' a 3')
HMA1-TRV F/R	TGGTTAACTTTACCGAGCATTGGGCCT	ATGAATTCTGATCTACAACAGCTCTTCC
HMA2-TRV F/R	ATGTTAACGTTCCGTCAAGAACCGTCAT	TAGAATTCGAGAAGTATGCCGGAACCA
HMA3-TRV F/R	ATGTTAACGGAATCCAACTGCAATGCT	TAGAATTCGTGCATCGTTAAGCCCATCT
HMA4-TRV F/R	ATGTTAACTGGGCTGGAACCATTAATCT	TAGAATTCAGCTTAGCCATTTTCGCAAC

\* As sequências em destaque representam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI* inseridos nos oligonucleotídeos iniciadores.

### 3.4 Silenciamento dos genes *PDS* e *HMA1*

A otimização do método VIGS em tomate foi realizada fazendo uso do gene *PDS* e do vetor de silenciamento baseado no vírus TRV (Valentine *et al.*, 2004). Este método foi validado para as cultivares Micro-Tom, Gaúcho e Salada. Após a otimização do método VIGS em tomate, os mesmos procedimentos empregados no silenciamento do *PDS* foram utilizados para o silenciamento do *HMA1*.

#### 3.4.1 Clonagem dos genes *PDS* e *HMA1* no vetor pGEM-T

Para a obtenção da sequência codificante do gene *PDS* foi realizada a extração de RNA total de plântulas de Micro-Tom, seguida do tratamento com DNase e síntese de cDNA, conforme detalhado no item 3.2. Em sequência, o cDNA foi utilizado como molde para a amplificação do *PDS* por PCR, na qual foram empregados oligonucleotídeos iniciadores contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *HpaI*, no iniciador direto, e *EcoRI*, no iniciador reverso, permitindo a posterior inserção direcional do *PDS* no vetor de silenciamento. A PCR foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (PDS-TRV F 5' -TGGTTAACGGCACTCAACTTTATAAACC - 3' e PDS-TRV R 5' -ATGAATTCCTCAGTTTTCTGTCAAACC - 3'); 1 U de Taq Platinum DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 µL de cDNA, sendo o volume final ajustado com água ultrapura para 20 µL. A reação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, pareamento a 55 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 1 min, seguida de uma extensão final a 72 °C por 5 min. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado em gel de agarose a 2%. Uma vez

confirmado o tamanho previsto pela análise da sequência *in silico*, o fragmento foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T© Promega® conforme indicação do fabricante. O fragmento de cDNA do *HMA1*, o qual foi obtido na etapa de identificação de ortólogos de *A. thaliana* em tomate (item 3.3), foi clonado neste mesmo vetor.

O produto de ligação entre os insertos (*PDS* e *HMA1*) e o vetor pGEM-T foi inserido em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* XL-1 (Stratagene, CA, USA) com auxílio do eletroporador MicroPulser™ (BIO RAD). Primeiramente, 2 µL da reação de ligação foram adicionados a 40 µL de células eletrocompetentes, sendo a mistura incubada durante 1 min em gelo antes da eletroporação, a qual foi realizada em cubetas de 0,1 cm (BIO RAD). O pulso aplicado foi de 1,8 kV e imediatamente foi acrescentado 1 mL de meio LB líquido. As células foram, então, transferidas para tubos de vidro e incubadas por 1 h a 37 °C sob agitação de 225 rpm. Após este período, uma alíquota de 100 µL da cultura foi plaqueada em meio LB sólido, acrescido de 40 µg mL<sup>-1</sup> de IPTG, 80 µg mL<sup>-1</sup> de X-Gal, 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina e 15 µg mL<sup>-1</sup> de tetraciclina. As bactérias foram mantidas a 37 °C em estufa por 12 h.

Após o cultivo das células transformadas, parte de cada colônia branca (recombinante) foi utilizada na PCR para a identificação das colônias. Nesta reação, foi utilizado tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (pUC/M13 F 5'- CGC CAC GGT TTT CCC AGT CAC GAC -3' e pUC/M13 R 5'- TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C -3'); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume de 20 µL. A reação foi feita sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 40 ciclos constituídos de desnaturação

a 94 °C por 1 min, pareamento a 50 °C por 45 s, extensão a 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, permitindo a identificação das colônias pGEM-PDS e pGEM-HMA1.

#### **3.4.2 Extração de plasmídeos recombinantes**

As colônias de *E. coli*, identificadas por PCR como portadoras dos plasmídeos pGEM-PDS ou pGEM-HMA1, foram utilizadas para a extração de seus plasmídeos recombinantes. Estas colônias foram transferidas para 3 mL de meio LB líquido contendo tetraciclina (15 µg mL<sup>-1</sup>) e ampicilina (50 µg mL<sup>-1</sup>). Após a manutenção da cultura por 16 h a 37 °C sob agitação (220 rpm), as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 x g por 5 min, sendo o precipitado ressuscitado em 200 µL de uma solução contendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de RNase; 50 mM de Tris-HCl (pH 8,0) e 10 mM de EDTA 10 mM. Sobre esta mistura foram acrescentados e homogeneizados 200 µL de NaOH a 200 mM e SDS a 1%, promovendo a lise celular. Em seguida, foram adicionados 200 µL de uma solução contendo acetato de potássio a 3 M (pH 5,5) e após uma nova homogeneização o material foi centrifugado a 16000 x g por 10 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi adicionado igual volume (aproximadamente 500 µL) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a agitação da mistura, foi realizada uma centrifugação a 16000 x g por 2 min a 4 °C. Para a precipitação do DNA plasmidial, a fase aquosa foi mais uma vez transferida para um novo tubo onde foi acrescentado igual volume de isopropanol (aproximadamente 400 µL) e 10% de acetato de sódio a 3 M (pH 5,2). Esta nova mistura foi mantida durante 2 h a -20 °C. Subsequentemente, foi feita uma centrifugação a 16000 x g durante 15 min a 4 °C. O precipitado

obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 16000 x g por 5 min a 4 °C e ressuspenso em 50 µL de água ultrapura. A concentração dos plasmídeos foi estimada em gel de agarose a 0,8%, sendo utilizado como marcador 500 ng de λHindIII (Invitrogen).

### **3.4.3 Sub-clonagem dos genes *PDS* e *HMA1* no vetor de silenciamento**

O vetor viral TRV foi cedido gentilmente por Jane Shaw e Christophe Lacomme do Instituto de Pesquisa Agrícola da Escócia, Dundee, UK. Este vetor é dividido em pTRV1 e pTRV2b-GFP. O primeiro plasmídeo contém as sequências que codificam para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável pela replicação; a proteína ligada ao movimento viral (MP) e a proteína 1b ou 16K, que parece atuar como um supressor fraco do silenciamento (Valentine *et al.*, 2004; Martín-Hernández & Baulcombe, 2008). Este plasmídeo não é manipulado, sendo apenas inserido e multiplicado em bactérias. O pTRV2b-GFP codifica para a proteína responsável pela produção do capsídeo (CP) e para a proteína 2b ligada ao movimento na raiz, além de conter o sítio múltiplo de clonagem. Esta última região possui os sítios de restrição das enzimas *HpaI* e *EcoRI*. Estes sítios estão presentes também nos insertos *PDS* e *HMA1*. A sequência que codifica para a GFP se localiza entre os sítios das enzimas citadas e, portanto, é substituída pelo inserto de interesse após as etapas de digestão e ligação, as quais são descritas abaixo.

Para a realização da sub-clonagem dos insertos (*PDS* e *HMA1*) no vetor de silenciamento, os plasmídeos pGEM-*PDS*, pGEM-*HMA1* e pTRV2b-GFP foram digeridos com as enzimas *HpaI* e *EcoRI*. A reação de digestão para cada plasmídeo consistiu de 550 ng de DNA plasmidial, tampão da *EcoRI* 1X, 10 U

de *EcoRI*, 5 U de *HpaI* e água ultrapura para completar o volume final de 50  $\mu\text{L}$ . As reações foram incubadas a 37 °C por 2 h. Imediatamente após o período de incubação, as reações passaram por uma re-extração para inativar a atividade das enzimas. O volume dos produtos das digestões foi ajustado para 500  $\mu\text{L}$ , ao qual foi acrescentado igual volume de fenol. Após a homogeneização da mistura foi realizada uma centrifugação a 16000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo onde foi acrescentado 1/2 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A nova mistura foi homogeneizada e centrifugada a 16000 x g por 2 min a temperatura ambiente. Novamente a fase aquosa foi transferida para outro tubo onde foi procedida a etapa de precipitação, a qual diferiu de acordo com o tamanho do fragmento que se desejava recuperar. No caso do produto de digestão do pTRV2b-GFP a precipitação realizada favoreceu a recuperação de moléculas grandes, ou seja, do vetor pTRV2b e não da GFP. Já o método de precipitação realizado para o produto de digestão do pGEM-PDS e do pGEM-HMA1 visou otimizar a recuperação de fragmentos pequenos, ou seja, do insertos *PDS* e *HMA1*. Dessa forma, o primeiro método, de precipitação para moléculas grandes, consistiu na adição de 2,5 volumes de etanol absoluto e mais 10% do volume inicial de acetato de amônio (7,5 M) sobre a fase aquosa. A mistura foi homogeneizada e incubada a -20 °C por 1 h. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação a 16000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, sendo feita uma última centrifugação a 16000 x g por 5 min a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspenso em 25  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. O outro método de precipitação,

que visou a recuperação de fragmentos pequenos, consistiu na adição de 2 volumes de etanol absoluto sobre a fase aquosa, homogeneização e incubação a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada a  $16000\text{ x g}$  por 30 min a  $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 95%. Em seguida, foi feita uma centrifugação a  $16000\text{ x g}$  por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspenso em  $25\text{ }\mu\text{L}$  de água ultrapura. Logo após a etapa de precipitação, a concentração das moléculas digeridas foi estimada em gel de agarose a 0,8%, utilizando o  $\lambda\text{HindIII}$  como marcador de massa molecular. Para a reação de ligação foi utilizado tampão para ligações rápidas 1X (Promega), 100 ng de vetor pTRV2b (12300 pb), 10 ng de inserto *PDS* (420 pb) ou 9 ng de inserto *HMA1* (364 pb), 3 U de T4 DNA ligase (Promega) e água ultrapura para completar o volume final de  $20\text{ }\mu\text{L}$ . Esta reação foi incubada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 16 h. Os produtos das ligações foram utilizados para a transformação de células eletrocompetentes de *E. coli* XL1, sendo seguida a metodologia descrita no item 3.4.1. Uma alíquota de  $100\text{ }\mu\text{L}$  da cultura de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido, acrescido de  $15\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de tetraciclina e  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina. As bactérias foram mantidas em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12 h.

Parte das colônias que cresceram no meio de cultura acima descrito foram avaliadas por PCR, possibilitando a identificação de colônias contendo o plasmídeo de interesse pTRV2b-PDS e pTRV2b-HMA1. A PCR destas colônias foi composta de tampão 1X (Invitrogen); 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,25 mM de cada dNTP; 0,5  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (TRV F 5'- GAG CAT AAT TAT ACT GAT TT -3' e TRV R 5'- CGA GAA TGT CAA TCT CGT AGG -3'); 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume

de 20  $\mu\text{L}$ . As reações foram submetidas às seguintes condições: desnaturação inicial a 94  $^{\circ}\text{C}$  por 3 min; 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94  $^{\circ}\text{C}$  por 45 s, pareamento a 45  $^{\circ}\text{C}$  por 30 s, extensão a 72  $^{\circ}\text{C}$  por 1 min; extensão final a 72  $^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. As colônias que apresentaram tamanho de banda correspondente ao *PDS* ou ao *HMA1* ligado no vetor pTRV2b foram empregadas nas etapas que compõem a extração de plasmídeo e sequenciamento. Este último procedimento foi realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS), utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Ao DNA plasmidial (100 ng) foram adicionados 4,5 pmol do oligonucleotídeo iniciador TRV F e 3  $\mu\text{L}$  do reagente de marcação *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96  $^{\circ}\text{C}$  por 3 min seguida de 25 ciclos de 96  $^{\circ}\text{C}$  por 10 seg, 55  $^{\circ}\text{C}$  por 5 seg e 60  $^{\circ}\text{C}$  por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10  $\mu\text{L}$  de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados fazendo uso do programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems).

#### 3.4.4 Infiltração com *A. tumefaciens* contendo os vetores virais

Uma vez confirmada a obtenção dos plasmídeos pTRV2b-PDS e pTRV2b-HMA1, estes foram inseridos em células eletrocompetentes de *A. tumefaciens*, sendo o mesmo realizado para os vetores virais pTRV1 e pTRV2b-GFP. As células de *A. tumefaciens* GV3101 utilizadas nesta etapa foram gentilmente fornecidas por José Antônio Peters do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas. Sendo assim, 2  $\mu\text{L}$  de cada plasmídeo foram, separadamente, misturados à 20  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes e deixados em gelo por 1 min. Em seguida, a mistura foi transferida para cubetas de 0,1 cm (BIO RAD), sobre a qual foi aplicado um pulso de 2,2 kV (MicroPulser™ - BIO RAD). As células foram cuidadosamente ressuspensas em 1 mL de meio LB líquido, transferidas para tubos de vidro e incubadas por 3 h a 28 °C sob agitação de 190 rpm. Após este período, uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de cada cultura de células transformadas foi plaqueada em meio LB sólido, acrescido de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de rifampicina e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de canamicina. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C até a visualização das colônias transformadas (aproximadamente 48 h). As colônias obtidas da transformação com pTRV2b-GFP, bem como as obtidas da transformação com pTRV2b-PDS e com pTRV2b-HMA1 foram submetidas à mesma PCR de colônia detalhada no item 3.4.3, tornando possível a confirmação da presença dos respectivos plasmídeos.

A agroinfiltração, procedida de acordo com o método descrito por Liu e colaboradores (2002), foi realizada em plantas de tomate aos 5 dias após a emergência. Para tanto, quatro diferentes colônias de *A. thumefaciens*, transformadas com pTRV1, pTRV2b-GFP, pTRV2b-HMA1 ou pTRV2b-PDS,

foram separadamente transferidas para 3 mL de LB líquido contendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de rifampicina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de canamicina. Após o cultivo das colônias a 28 °C por 16 h sob rotação de 190 rpm, 400 µL de cada cultura bacteriana foram adicionados a 20 mL de LB líquido contendo a mesma concentração dos antibióticos, 10 mM de MES e 20 µM de Acetoseríngona. As culturas foram novamente submetidas às condições recém-mencionadas por 18 h. Em seguida, as quatro diferentes culturas bacterianas foram lidas em espectrofotômetro (O.D.<sub>600nm</sub>), transferidas para tubos Falcon e centrifugadas por 10 min a 5000 rpm. Após a precipitação das células as mesmas foram ressuspensas em uma solução de infiltração composta de 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 10 mM de MES e 200 µM de Acetoseríngona, sendo a O.D. das culturas ajustada para 2. As células ressuspensas foram mantidas por 3 h a temperatura ambiente. Antes da infiltração, foi realizada a mistura na proporção 1:1 (v:v) das culturas pTRV1 e pTRV2b-GFP (inóculo controle), e também das culturas pTRV1 e pTRV2b-PDS (inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS) e pTRV1 e pTRV2b-HMA1 (inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1). A agroinfiltração foi efetuada com seringa de 1 mL nas duas folhas cotiledonares de cada planta.

#### **3.4.5 Confirmação do silenciamento do *PDS* e do *HMA1***

Por fim, a confirmação do silenciamento do PDS foi feita através da visualização do fotobranqueamento, em até 14 dias após a agroinfiltração (14 dpi), nas plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS. Este inóculo foi empregado em todos os demais experimentos de silenciamento para o controle das condições de cada novo experimento, os quais foram sempre realizados em câmara de crescimento a 23 ± 2 °C e fotoperíodo de 14 h. Aos 14 dpi, os valores de acúmulo de mRNA do *PDS* foram quantificados por meio

de qRT-PCR e comparados entre as plantas que receberam o inóculo controle e as plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS. As quantificações destes acúmulos foram feitas apenas nas folhas jovens, sendo utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores citados no item 3.4.1. O calibrador consistiu na média de cinco plantas agroinfiltradas com o inóculo controle. Estas análises seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.4 e foram realizadas também nos experimentos de silenciamento do *HMA1*. Neste caso as quantificações de acúmulo de mRNA do *HMA1* foram feitas em raízes e folhas jovens aos 9 dpi e os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram HMA1-TRV F 5'- TGG TTA ACT TTA CCG AGC ATT GGG CCT e ExternoHMA1 R 5'- TGA AAT TGA AGG AAG GTC TTT GCC TGT G -3'. Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### **3.4.6 Avaliação fenotípica das plantas silenciadas para o *HMA1***

Esta etapa objetivou caracterizar o papel do *HMA1* no processo de acumulação de Cd em tomate. Para tanto, sementes da cv. Micro-Tom foram germinadas em bandejas de isopor contendo vermiculita em contato com solução nutritiva para tomate, cuja composição foi descrita no item 3.1. Aos cinco dias após a emergência, as plântulas uniformes foram selecionadas e agroinfiltradas com o inóculo controle e com o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1. Em sequência, aos 10 dpi, as bandejas das plantas foram transferidas para três diferentes tratamentos. O tratamento controle consistiu no cultivo em solução nutritiva sem adição Cd, enquanto que os demais tratamentos consistiram nas doses de CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O equivalentes a 0,7 mM e 1,0 mM. Estes tratamentos foram renovados a cada 14 dias. Para o tratamento controle foram utilizadas 8

plantas (4 que receberam o inóculo controle e 4 que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1). Este número foi aumentado para 14 nos tratamentos com Cd. O experimento foi conduzido com duas repetições por tratamento. Por fim, ao final de dois meses após a primeira adição dos tratamentos, as plantas foram coletadas e utilizadas nas determinações do comprimento da raiz principal, peso seco (PS) das raízes, PS da parte aérea e teor de Cd na parte aérea. Os resultados foram submetidos à análise de variância seguida pelo teste Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Comparação dos teores de Cd entre seis cultivares de tomate

Conforme mencionado anteriormente, as cultivares de tomate Micro-Tom e Gaúcho foram recentemente caracterizadas como hiperacumuladoras de Cd, tendo em vista que estas cultivares foram capazes de tolerar e acumular em suas folhas concentrações superiores a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de PS. Entretanto, apenas a cv. Micro-Tom teve o teor de Cd quantificado também nos frutos (Silva, 2010). Diante disso, a presente etapa objetivou verificar se outras cultivares de tomate, que são utilizadas para consumo, também são capazes de acumular Cd em seus frutos. Adicionalmente, a fim de comparar mais detalhadamente a capacidade de acumulação de Cd entre as cultivares, o teor do metal foi quantificado também nas folhas. Para tanto, além da cv. Micro-Tom, foram utilizadas as cultivares Gaúcho, Gaúcho Melhorado, IPA6, Italiano e Salada. As quantificações de Cd realizadas nas folhas e frutos das plantas cultivadas sem a adição de Cd ficaram abaixo de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  PS e  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  PS, respectivamente.

Todas as cultivares de tomate analisadas foram caracterizadas como hiperacumuladoras de Cd, apresentando concentrações foliares do metal entre aproximadamente  $215$  até  $325 \text{ mg kg}^{-1}$  PS (Figura 1A). As cultivares IPA6 e Italiano apresentaram os maiores teores de Cd, enquanto que as demais

cultivares não diferiram estatisticamente entre si. Os teores de Cd nas folhas das cultivares IPA6 e Italiano foram aproximadamente 1,5 vezes superiores ao menor teor do metal verificado na cv. Gaúcho Melhorado. Nos frutos, a concentração de Cd variou entre aproximadamente 9 e 16 mg kg<sup>-1</sup> de PS, não diferindo estatisticamente entre as cultivares (Figura 1B). O teor de Cd na parte aérea pode ser influenciado pela diluição do metal através do crescimento da planta (Lux *et al.*, 2011). Entretanto, a concentração de Cd na parte aérea das cultivares comerciais foi estatisticamente igual ou superior à concentração verificada na cv. Micro-Tom, a qual apresenta um porte anão e completa seu ciclo em 70-90 dias. Além disso, o transporte de Cd para os frutos de tomate, inicialmente relatado em Micro-Tom por Silva (2010), foi verificado também nas cultivares utilizadas para consumo.

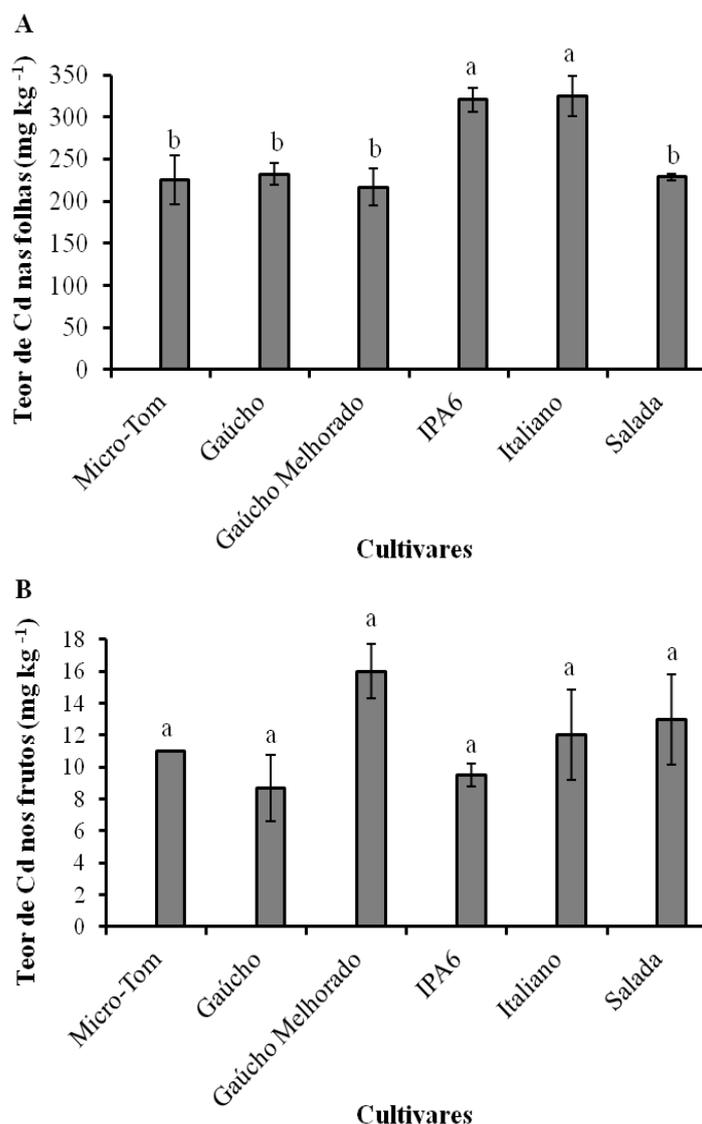


FIGURA 1. Teor de Cd nas folhas (A) e frutos (B) de seis cultivares de tomate cultivadas na presença da dose de Cd de  $90 \text{ mg kg}^{-1}$  substrato. Os valores são médias de 3 repetições biológicas. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste Bonferroni (A) ou pelo teste Kruskal-Wallis (B) ( $p \leq 0,05$ ).

As cultivares Gaúcho, Gaúcho Melhorado e Salada possuem hábito de crescimento indeterminado, já as cultivares Micro-Tom, IPA6 e Italiano são de crescimento determinado. Nas cultivares de crescimento determinado, após um período de crescimento vegetativo, são formadas inflorescências terminais na haste principal e o alongamento cessa. Nas cultivares de crescimento indeterminado o meristema apical da parte aérea permanece em

desenvolvimento contínuo (Georgelis, 2002). Pode ser sugerido, portanto, que as folhas mais velhas das plantas de crescimento indeterminado apresentem menor teor de Cd, tendo em vista a possibilidade de o Cd continuar sendo transportado para a parte aérea em desenvolvimento. Com exceção da cv. Micro-Tom, as determinações das concentrações foliares de Cd foram realizadas com as folhas mais velhas das cultivares de tomate. Dessa forma, o maior teor de Cd verificado nas folhas das cultivares IPA6 e Italiano pode estar relacionado com o hábito de crescimento determinado destas plantas. Emery e Munger (1970) mostraram que plantas de tomate de crescimento indeterminado apresentam maior teor de sólidos solúveis nos frutos em comparação com as plantas de crescimento determinado. Esta constatação foi atribuída ao maior número de folhas entre as inflorescências das plantas de tomate de crescimento indeterminado, uma vez que estas folhas atuam como fonte de fotossintatos para os frutos (Emery & Munger, 1970; Fridman *et al.*, 2002). Apesar disso, no presente trabalho, os teores de Cd nos frutos de tomate não diferiram estatisticamente mesmo entre as cultivares com diferentes hábitos de crescimento. Sendo assim, o hábito de crescimento não parece ter influência sobre o teor de Cd nos frutos das cultivares de tomate.

As determinações de Cd nas folhas das cultivares de tomate também possibilitaram o cálculo dos fatores de bioacumulação (BF) de cada cultivar (Tabela 3). Nas espécies excludoras de metais o valor típico do BF é abaixo de 1, enquanto que as espécies hiperacumuladoras possuem BF superior a 1 (Sun *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2003). No presente trabalho, todos os valores de BF foram superiores a 1,0 e variaram entre 2,41 e 3,61, demonstrando novamente a existência de um eficiente sistema de transporte de Cd do

substrato para a parte aérea de tomate. O BF relaciona a concentração de um metal na parte aérea da planta com a concentração do mesmo metal no substrato (Zayed *et al.*, 1998). Por esta razão, comparações feitas entre BFs devem levar em consideração a mesma dose de metal no substrato, bem como condições de cultivo semelhantes. Sendo assim, as comparações feitas a seguir incluem apenas os valores de BFs correspondentes ao cultivo das plantas sobre a mesma dose de Cd ( $90 \text{ mg kg}^{-1}$ ) utilizada neste trabalho. Os BFs das cultivares de tomate podem ser considerados relativamente baixos em comparação com determinadas populações de *T. caerulescens*, para as quais foram relatados BFs de aproximadamente 10 (Zhao *et al.*, 2003). Por outro lado, os BFs das cultivares IPA6 e Italiano foram próximos ao BF de aproximadamente 4 verificado em *Aeluropus litoralis*. Esta espécie foi identificada como hiperacumuladora de Cd e é considerada bastante promissora para a fitorremediação de solos contaminados com o referido metal (Rezvani & Zaefarian, 2011).

TABELA 3. Fator de bioacumulação de Cd das cultivares de tomate (média  $\pm$  DP).

Cultivares	Fator de bioacumulação (BF)
Micro-Tom	2,51 $\pm$ 0,32 b
Gaúcho	2,58 $\pm$ 0,15 b
Gaúcho Melhorado	2,41 $\pm$ 0,24 b
IPA6	3,57 $\pm$ 0,16 a
Italiano	3,61 $\pm$ 0,27 a
Salada	2,54 $\pm$ 0,05 b

\* Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

Diversos estudos relatam diferenças significativas entre cultivares quanto à capacidade de acumulação de Cd (McLaughlin *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2006). John e van Larhoven (1976) demonstraram variações de até 21 vezes no conteúdo de Cd em folhas de nove cultivares de alface. Quantificações de Cd na parte aérea de cultivares de feijão, pepino e abóbora também permitiram a verificação de diferenças significativas entre cultivares (Yang *et al.*, 2010). Estas diferenças são de grande interesse para a agricultura, tendo em vista a possibilidade de seleção das cultivares que representam menor risco para a entrada do Cd na cadeia alimentar (Zheng *et al.*, 2008; Alexander *et al.*, 2006). Entre as cultivares de tomate também foram detectadas variações significativas nos teores foliares de Cd. Contudo, todas as cultivares comerciais utilizadas neste trabalho oferecem o mesmo risco para as contaminações alimentares com o metal, tendo em vista que não houve diferença significativa entre os teores de Cd nos frutos destas cultivares de tomate.

#### **4.2 Análise de expressão de genes relacionados com o transporte de metais**

Na presente etapa, as cultivares de tomate foram utilizadas para a avaliação do efeito do Cd na expressão dos genes *LeFER*, *LeIRT1*, *LeNRAMP1* e *LeNRAMP3*. O primeiro gene codifica um fator de transcrição e os demais genes transportadores de metais. Todos estes genes que codificam transportadores já foram descritos em outras espécies como genes que codificam transportadores de Cd (Thomine *et al.*, 2000; Lux *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011). A expressão do gene *LeFer* foi avaliada em função da

atividade de seu produto sobre outros genes empregados nesta etapa. LeFER é um fator de transcrição básico do tipo hélice-alça-hélice (bHLH) que controla a expressão dos genes *LeIRT1* e *LeNRAMP1* em resposta a deficiência de Fe (Ling *et al.*, 2002; Barabasz *et al.*, 2012). Genes responsivos aos metais pesados, que também apresentam maior expressão em espécies hiperacumuladoras em comparação com espécies relacionadas não acumuladoras, são considerados candidatos promissores para o processo de hiperacumulação de metais (Hassinen, 2009; Küpper & Kochian; 2010). Sendo assim, comparações entre genótipos, com base nos níveis de indução de expressão de genes responsivos ao Cd, podem servir como um indicativo da capacidade de acumulação do referido metal. Por esta razão, as comparações dos níveis de expressão dos genes acima citados não foram feitas somente entre as plantas cultivadas com e sem Cd, mas também entre as cultivares de tomate.

Previamente a análise de expressão, os fragmentos de cDNA de todos os genes, amplificados por qRT-PCR, foram separados em gel de agarose para controle da especificidade da reação (Figura 2). Todas as reações foram específicas e os fragmentos amplificados apresentaram os tamanhos esperados através da análise *in silico*.

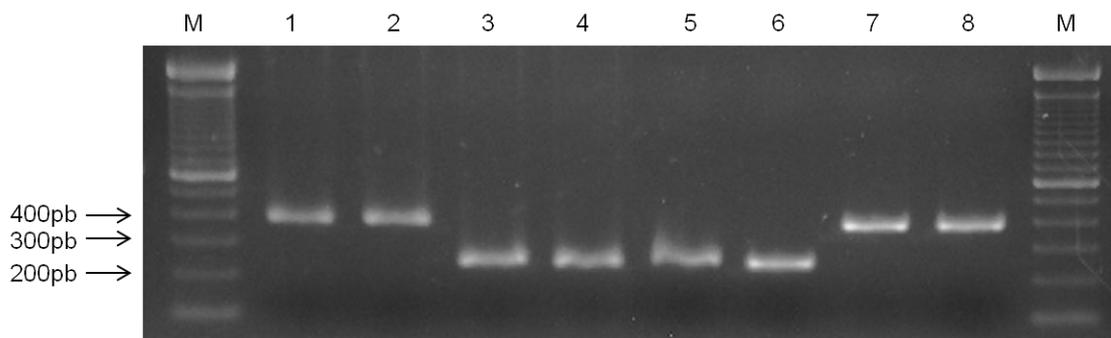


FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose de fragmentos amplificados por qRT-PCR a partir de cDNA de tomate. 1-2 *LeFer*, 3-4 *LeIRT1*, 5-6 *LeNRAMP3*, 7-8 *LeNRAMP1*. M – Marcador de massa molecular 100 pb.

O gene *LeNRAMP3* é expresso nas raízes e na parte aérea de plantas de tomate, já a expressão dos outros genes é verificada apenas nas raízes (Berezky *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2004a). Em face disso, todos os genes foram avaliados nas raízes das cultivares de tomate e o *LeNRAMP3* foi avaliado também na parte aérea (Figura 3). A adição de Cd no substrato resultou em um aumento significativo na expressão do *LeNRAMP3* tanto na parte aérea quanto nas raízes das cultivares de tomate, exceto na parte aérea da cv. Gaúcho. Berezky e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão do *LeNRAMP3* é aumentada, principalmente nas raízes, em resposta a deficiência de Fe. O *LeNRAMP3* provavelmente atua na liberação de Fe a partir de compartimentos intracelulares (Berezky *et al.*, 2003; Barabasz *et al.*, 2012). O transporte de Cd através do NRAMP3 é descrito em *A. thaliana*. Através do *AtNRAMP3*, os metais Cd, Fe e Mn podem ser transportados do interior do vacúolo para o citoplasma (Thomine *et al.*, 2000). Os aumentos induzidos por Cd nas expressões do *LeIRT1* e do *LeNRAMP1* apenas foram significativos nas cultivares (Gaúcho Melhorado, IPA6 e Italiano) onde o aumento na expressão do *LeFER* também foi significativo. Estas

observações eram esperadas, tendo em vista o controle do LeFER sobre os demais genes. Além disso, em raízes de *A. thaliana*, o Cd também foi responsável por um aumento significativo na expressão do ortólogo do *LeFER* (*AtFRU*) (Wu *et al.*, 2012). O LeIRT1 é responsável pelo transporte de Fe para o interior das células da raiz, já o papel do LeNRAMP1 envolve a redistribuição de Fe, a partir do vacúolo, em condições de deficiência deste elemento (Kim & Guerinot, 2007; Barabasz *et al.*, 2012). A expressão destes dois genes é aumentada em resposta a deficiência de Fe (Bereczky *et al.*, 2003; Barabasz *et al.*, 2012). Além de transportar Fe, o IRT1 de *A. thaliana* também atua no transporte de Cd, Co, Mn e Zn (Eide *et al.*, 1996; Korshunova *et al.*, 1999; Vert *et al.*, 2002). O envolvimento do NRAMP1 no transporte de Cd é descrito em arroz. Nesta espécie, o OsNRAMP1 se encontra localizado na membrana plasmática e parece atuar tanto na absorção de Cd quanto na distribuição deste metal dentro da planta (Takahashi *et al.*, 2011).

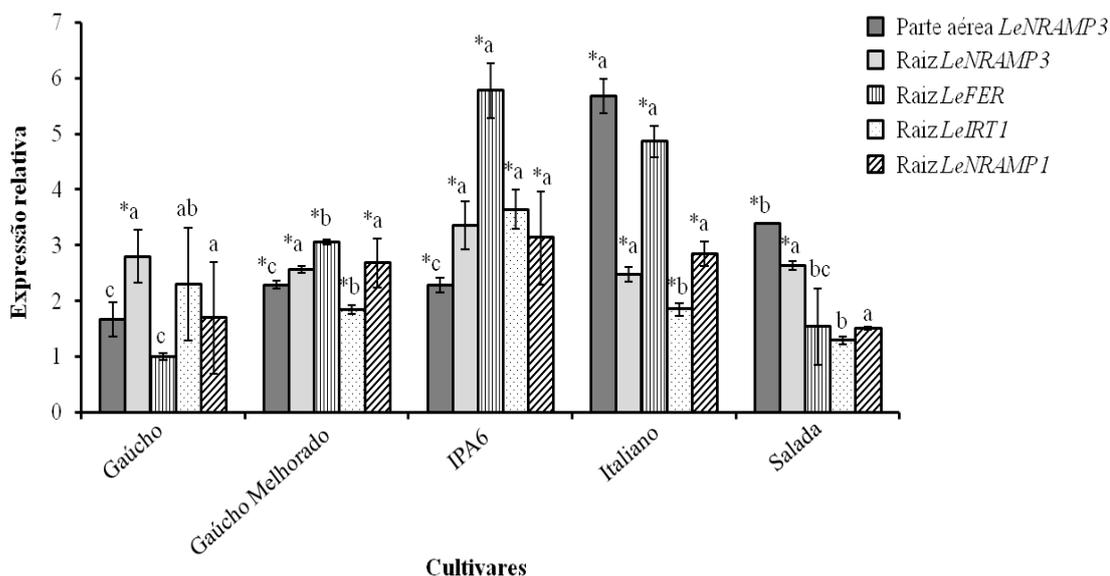


FIGURA 3. Expressão relativa dos genes *LeFER*, *LeIRT1* e *LeNRAMP1* nas raízes e do gene *LeNRAMP3* nas raízes e na parte aérea das cultivares de tomate. Todos os valores de Cts foram normalizados pelos Cts do controle endógeno *UBI3* ( $\Delta C_t$ ). Os valores de expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (parte aérea ou raiz de determinada cultivar proveniente do tratamento sem Cd) ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), cujo valor de expressão relativa foi calibrado para 1,0. Os valores são médias de 3 repetições biológicas. \* Médias que diferem significativamente do calibrador. As médias também foram comparadas entre cultivares para um mesmo gene. Estas médias receberam a mesma letra quando não diferiram pelo teste Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

Esses resultados indicam que, em tomate, a presença do Cd induziu o mesmo efeito que a deficiência de Fe induz na expressão dos genes avaliados. O efeito do Cd no conteúdo de Fe nas plantas é dependente da espécie e das condições experimentais utilizadas (Sandalo *et al.*, 2001). As monocotiledôneas não gramíneas e as dicotiledôneas, incluindo o tomate, ativam a estratégia I para a absorção de Fe em condições de deficiência deste elemento. Esta estratégia envolve a liberação de prótons na rizosfera, a indução da atividade de uma  $Fe^{+3}$  redutase e, por fim, a indução de um sistema de transporte de elevada afinidade por  $Fe^{+2}$ , realizado através do IRT1

(Thomine & Lanquar, 2011). López-Millán e colaboradores (2009) cultivaram plantas de tomate em meio hidropônico contendo 10  $\mu\text{M}$  de Cd. As raízes destas plantas apresentaram uma redução de 38% nas atividades de  $\text{Fe}^{+3}$  redutase. Por meio de quantificações do teor de Fe nestas plantas, os autores concluíram que o Cd induziu uma deficiência moderada de Fe. As reduções significativas no conteúdo deste metal não ocorreram nas raízes, mas sim nas folhas. A inibição das atividades de  $\text{Fe}^{+3}$  redutase nas raízes possivelmente ocorre devido à interação do Cd com os grupos sulfidril (SH) destas enzimas (Wozny *et al.*, 1990). Em plantas de pepino, cultivadas por duas semanas em meio hidropônico sem Fe e, posteriormente, na presença de Fe e 10  $\mu\text{M}$  de Cd, foi verificado que o Cd inibiu completamente a translocação do Fe das raízes para a parte aérea. Nestas mesmas plantas, a presença de Cd aumentou o teor de Fe nas raízes. Contudo, este Fe acumulado nas raízes permaneceu inacessível para a parte aérea, tendo em vista a inibição da translocação deste metal (Fordor *et al.*, 1996). Diante do exposto, é possível que as cultivares de tomate utilizadas na presente etapa também apresentem deficiência de Fe induzida pelo Cd.

As cultivares IPA6 e Italiano apresentaram os maiores teores de Cd nas folhas, bem como os maiores níveis de indução de expressão do gene *LeFER* em comparação com as demais cultivares. Além disso, o teor de Cd nas folhas foi estatisticamente igual entre as cultivares IPA6 e Italiano, sendo o mesmo verificado para a expressão do *LeFER*. Diante disso, o nível de expressão do gene *LeFER* induzido por Cd parece ter relação com a capacidade de acúmulo foliar de Cd. No entanto, futuros estudos de caracterização funcional serão

necessários para determinar a contribuição deste gene no processo de acumulação de Cd em tomate.

### **4.3 Identificação de genes ortólogos aos *HMA*s de *A. thaliana***

Todas as cultivares de tomate utilizadas neste trabalho foram capazes de transportar e acumular Cd em seus frutos. Esta constatação representa uma possível via de entrada do Cd na cadeia alimentar. Uma estratégia para contornar este tipo problema consiste no desenvolvimento de plantas que apresentem menor capacidade de transportar o Cd para o órgão consumido (Guimarães *et al.*, 2008). Contudo, a viabilidade desta estratégia depende da manutenção do estado nutricional, do crescimento e da produtividade das plantas (Uraguchi *et al.*, 2011). Sendo assim, não são considerados alvos de manipulação os genes que tenham papel considerável nestas características recém-mencionadas. Os genes descritos no item anterior não foram, portanto, alvos de estudos mais aprofundados sobre os seus papéis na hiperacumulação de Cd em tomate. Diante disso, foi procedida uma busca em tomate de genes ortólogos aos *HMA*s de *A. thaliana*. Esta busca objetivou a seleção de genes candidatos para o transporte e acúmulo de Cd em tomate, para a posterior caracterização funcional na cv. Micro-Tom. Os *HMA*s buscados em tomate incluem o *HMA1*, *HMA2*, *HMA3* e *HMA4*, os quais formam um grupo de transportadores de Zn, Cd, Co e Pb (Williams & Mills, 2005). Dentre estes genes, apenas o *HMA1* foi amplificado em tomate (Figura 4). A PCR realizada em cDNA resultou na amplificação de um fragmento de 364 pb tanto na raiz quanto na parte aérea de tomate. O fragmento foi sequenciado e apresentou 76% de similaridade com o *HMA1* de *A. thaliana* (acesso NM\_119890.6) e 99%

de similaridade com um cDNA parcial de um possível *HMA1* de *Solanum tuberosum* (acesso AM231415.1).

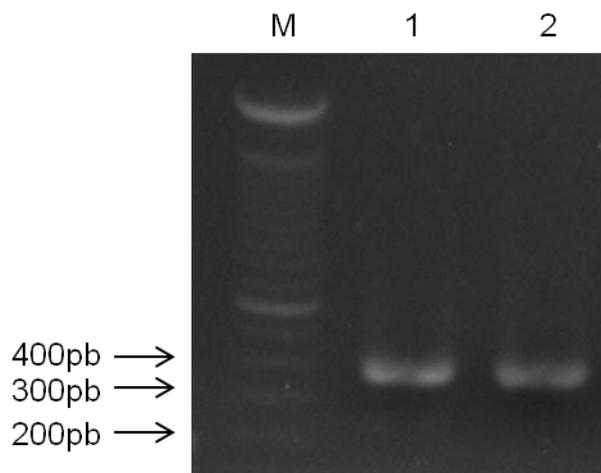


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose do fragmento *HMA1* amplificado a partir de cDNA da parte aérea (1) e das raízes (2) da cv. Micro-Tom cultivada até os 10 dias após a emergência em vermiculita adicionada da dose de Cd de  $90 \text{ mg kg}^{-1}$ . M – Marcador de massa molecular 100 pb.

Após a identificação do *HMA1* em tomate, a expressão deste gene foi avaliada na raiz e na parte aérea das cultivares provenientes do tratamento sem Cd. Nas cultivares Gaúcho Melhorado, IPA6 e Italiano o *HMA1* é igualmente expresso nas raízes e na parte aérea, já nas cultivares Micro-Tom, Gaúcho e Salada, este gene é mais expresso na parte aérea (Figura 5A). Em *A. thaliana*, a expressão do *AtHMA1* é maior nos tecidos verdes, o que é consistente com a localização deste transportador na membrana dos cloroplastos. Contudo, uma fraca expressão deste gene foi detectada também nas raízes, o que não exclui uma possível função do *AtHMA1* em outros plastídeos (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). O PAA1/*AtHMA6* de *A. thaliana* também é um transportador de metal presente na membrana dos cloroplastos (Shikanai *et al.*, 2003; Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Este gene apresenta

níveis de expressão próximos entre as raízes e os tecidos verdes, sugerindo um papel mais amplo em todos os tipos de plastídeos (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006). Este parece ser o caso do *HMA1* de tomate, tendo em vista o seu nível de expressão nas raízes e na parte aérea das seis cultivares. A expressão do *HMA1* também foi avaliada nas cultivares de tomate cultivadas com Cd (Figura 5B). Na parte aérea das cultivares a expressão do referido gene não foi induzida pelo metal. Já nas raízes da maioria das cultivares, a presença do Cd foi responsável por um aumento significativo na expressão do *HMA1*. Quando expresso em levedura, o AtHMA1 também foi responsivo à presença de Cd. Além do Cd, os metais Co, Cu e Zn elevaram a atividade de ATPase do AtHMA1 (Moreno *et al.*, 2008).

Em função dos resultados expostos, o *HMA1* identificado em tomate foi empregado nas etapas que compõem o método VIGS. Estas etapas são descritas nos itens seguintes.

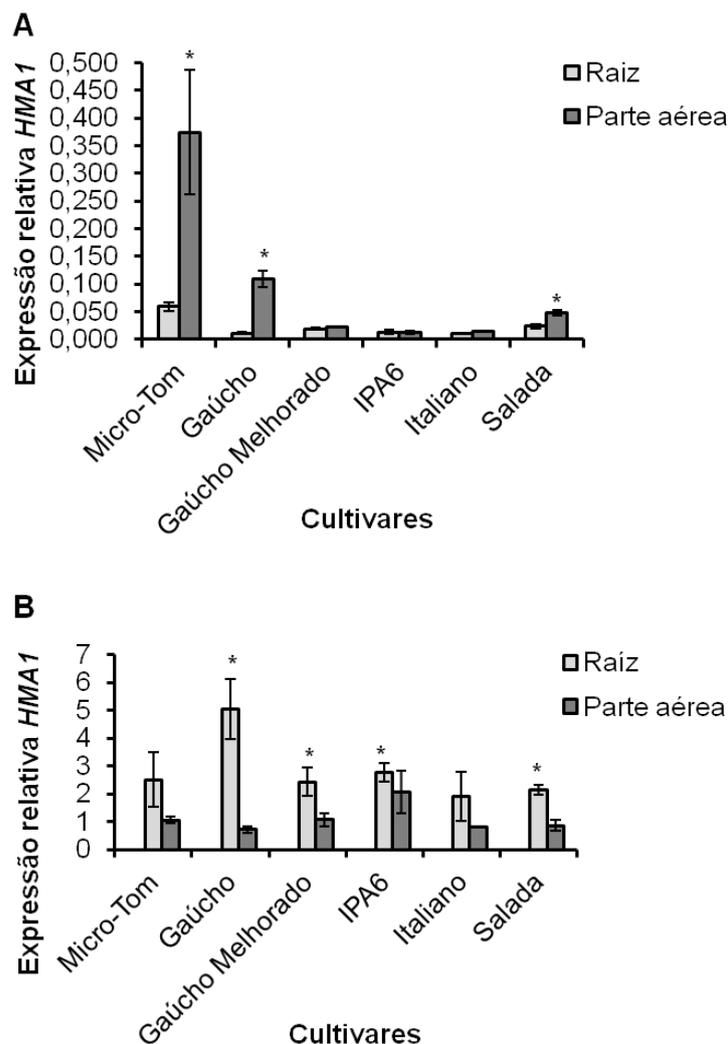


FIGURA 5. Expressão relativa do *HMA1*. A - Valores de expressão relativa do *HMA1* normalizado pelo controle endógeno *UBI3* ( $2^{-\Delta C_t}$ ) obtidos para as raízes e parte aérea das cultivares provenientes do tratamento sem adição de Cd. B - Valores de expressão que representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador (parte aérea ou raiz de determinada cultivar proveniente do tratamento sem Cd) ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ), cujo valor de expressão relativa foi calibrado para 1,0. Os valores são médias de três repetições biológicas. \* Diferença significativa entre tecidos de uma mesma cultivar (A) ou em relação ao calibrador (B). Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4 Silenciamento do gene *PDS* em tomate

O gene *PDS* foi utilizado para o estabelecimento das etapas e condições experimentais necessárias para o desenvolvimento do método VIGS em

tomate. O PDS atua na rota de síntese de carotenoides e, portanto, confere um fenótipo facilmente distinguível às plantas silenciadas, uma vez que estas apresentarão fotobranqueamento. A clonagem de um fragmento do *PDS* foi feita a partir do cDNA de plantas de tomate cv. Micro-Tom. O fragmento amplificado foi de 420 pb, o qual foi inserido no vetor viral pTRV2b-GFP, originando a construção de silenciamento pTRV2b-PDS (Figura 6).

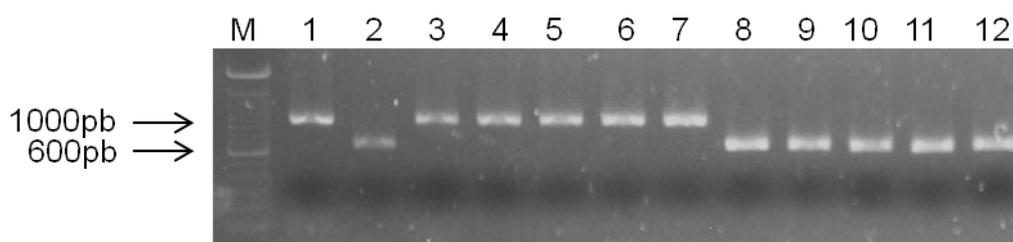


FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos plasmídeos TRV2-GFP (1) e TRV2b-PDS (2), bem como das colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os plasmídeos pTRV2b-GFP (3-7) e pTRV2b-PDS (8-12). A PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R, resultando na verificação de 254 pb adicionais ao tamanho do inserto.

A agroinfiltração, procedida nos cotilédones de plantas de tomate aos cinco dias após a emergência, resultou no fotobranqueamento nas plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS. O silenciamento do *PDS* foi validado para as cultivares Micro-Tom, Gaúcho e Salada, nas quais o fotobranqueamento foi verificado entre 8 a 14 dias após a agroinfiltração (dpi) (Figura 7). Em todos os experimentos desenvolvidos neste trabalho, todas as plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS apresentaram o fenótipo correspondente. Estes resultados conferem ao método uma eficiência de 100%. Liu e colaboradores (2002) avaliaram a eficiência de dois diferentes métodos de agroinfiltração visando o silenciamento do *PDS* na cv. Micro-Tom.

Os autores infiltraram *A. tumefaciens* em plantas com três semanas de idade com auxílio de seringa ou através do uso de borrifador, sendo obtidas eficiências de silenciamento de 50% e 90%, respectivamente. Nota-se, portanto, que a metodologia empregada neste trabalho resultou em uma maior eficiência. Em outro trabalho mais recente, uma eficiência de 100% também foi alcançada para o silenciamento do *PDS* em plantas de Micro-Tom agroinfiltradas no estágio de plântula (Jiang *et al.*, 2008). Diante disso, o método de agroinfiltração em folhas cotiledonares de plantas jovens parece otimizar a eficiência de silenciamento do *PDS* em tomate.

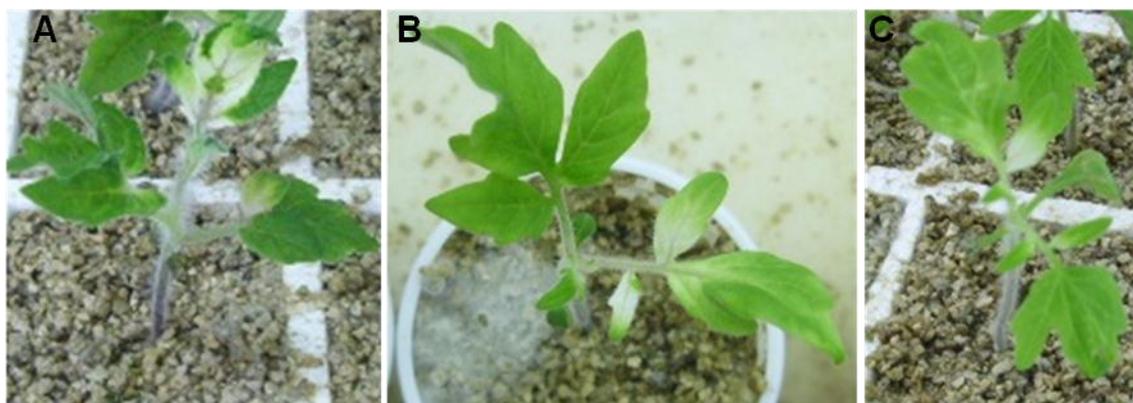


FIGURA 7. Fotobranqueamento em cultivares de tomate agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS. A – cv. Micro-Tom 10 dpi. B – cv. Gaúcho 8 dpi. C – cv. Salada 8 dpi.

Os níveis de acúmulo de mRNA do *PDS* foram quantificados na parte aérea da cv. Micro-Tom e comparados entre as plantas agroinfiltradas com o inóculo controle e as plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS (Figura 8). Nas plantas que receberam este último inóculo, o acúmulo de mRNA do *PDS* foi reduzido em mais de 60% em comparação com as plantas controle não silenciadas. O nível de redução do acúmulo de mRNA de um gene

alvo do VIGS pode ser variável entre as plantas silenciadas (Bhattarai *et al.*, 2007). Por esta razão, as quantificações destes acúmulos foram sempre feitas em plantas individualizadas.

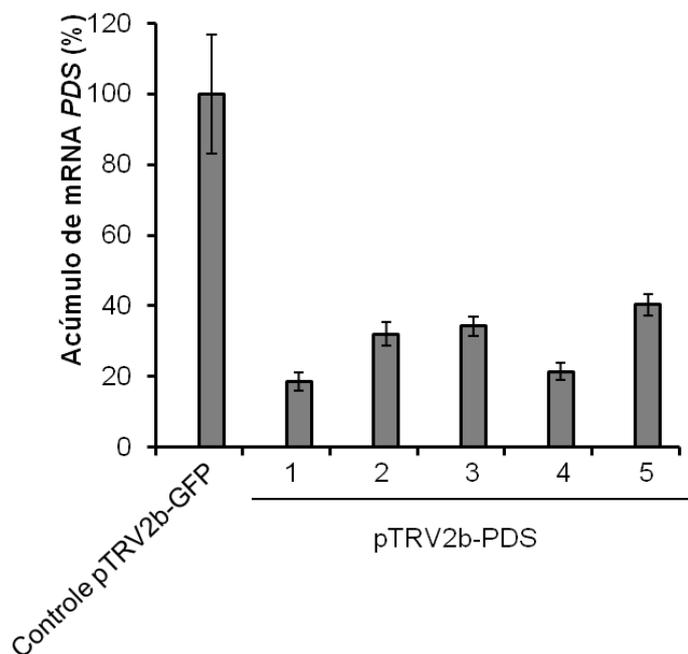


FIGURA 8. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA do *PDS* nas folhas jovens da cv. Micro-Tom aos 14 dpi. Os valores de 1-5 correspondem às plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-PDS e representam a redução no acúmulo de mRNA do *PDS* em relação ao acúmulo verificado nas plantas que receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-GFP) (calibrador). Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. Para o calibrador estão representados a média e o desvio padrão de cinco repetições biológicas. Para as plantas de 1-5 estão representadas as quantificações em plantas individualizadas e o desvio padrão de três repetições técnicas. As plantas de 1-5 diferiram do calibrador pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A cv. Micro-Tom contendo o gene *PDS* silenciado foi cultivada até o final de seu ciclo (70-90 dias). O fotobranqueamento permaneceu até o estágio reprodutivo, sendo visível em toda a parte aérea, incluindo flores e frutos (Figura 9). O silenciamento do *PDS* resulta na obtenção de frutos com teor de

licopeno reduzido, tendo em vista o bloqueio da biossíntese de carotenoides (Orzaez *et al.*, 2009). A maior parte dos estudos sobre VIGS relata uma duração de seus efeitos por até 3 semanas, enquanto que outros trabalhos demonstram que esta duração pode ser prolongada por mais de 3 meses. Contudo, trabalhos recentes comprovam que o VIGS pode ser até mesmo transmitido para a progênie das plantas. Isto foi verificado inclusive para o VIGS mediado por TRV em tomate (Senthil-Kumar & Mysore, 2011a, 2011b). A durabilidade do VIGS até o estágio reprodutivo, demonstrada neste e em outros trabalhos, é de extrema importância quando se deseja estudar os efeitos do silenciamento durante todo o desenvolvimento da planta.

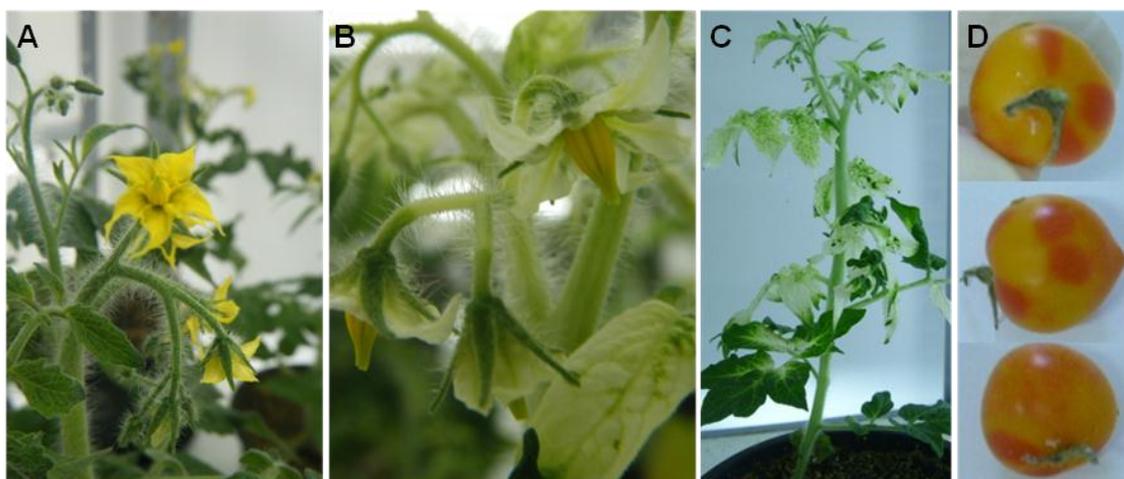


FIGURA 9. Fotobranqueamento até o estágio reprodutivo da cv. Micro-Tom. A – Planta adulta não silenciada para o *PDS*. B-C – Plantas adultas silenciadas para o *PDS*. D – Efeito do silenciamento do *PDS* nos frutos.

#### 4.5 Silenciamento do gene *HMA1* em tomate

No intuito de caracterizar o papel do *HMA1* no processo de acumulação de Cd em tomate, este gene foi utilizado como alvo do VIGS na cv. Micro-Tom. Para tanto, um fragmento de 364 pb, resultante da amplificação do *HMA1* em

cDNA de tomate, foi clonado no vetor pTRV2b-GFP, dando origem ao pTRV2b-HMA1 (Figura 10).

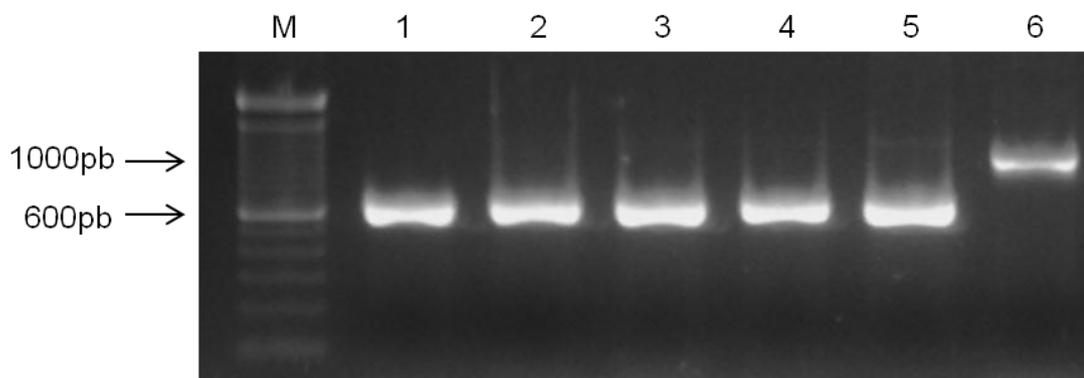


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônias de *A. tumefaciens* transformadas com os plasmídeos pTRV2b-HMA1 (1-5) e pTRV2b-GFP (6). A PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/R, resultando na verificação de 254 pb adicionais ao tamanho do inserto.

O vetor TRV2b utilizado neste trabalho desencadeia respostas ao VIGS tanto na parte aérea quanto nas raízes das plantas. Este efeito nas raízes é atribuído à presença da proteína 2b no vetor (Valentine *et al.*, 2004). Dessa forma, a quantificação do silenciamento do *HMA1* foi feita nas folhas e nas raízes da cv. Micro-Tom (Figura 11). Um dos oligonucleotídeos iniciadores utilizado é complementar à região externa ao fragmento do *HMA1* clonado, permitindo apenas a quantificação do acúmulo de mRNA do *HMA1* endógeno. As plantas utilizadas nesta análise foram coletadas aos 9 dpi. Do total de 10 plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1, sete apresentaram reduções significativas no acúmulo de mRNA do *HMA1* nas folhas e sete nas raízes. Estes resultados confirmam, portanto, o silenciamento do *HMA1* nos dois tecidos de tomate.

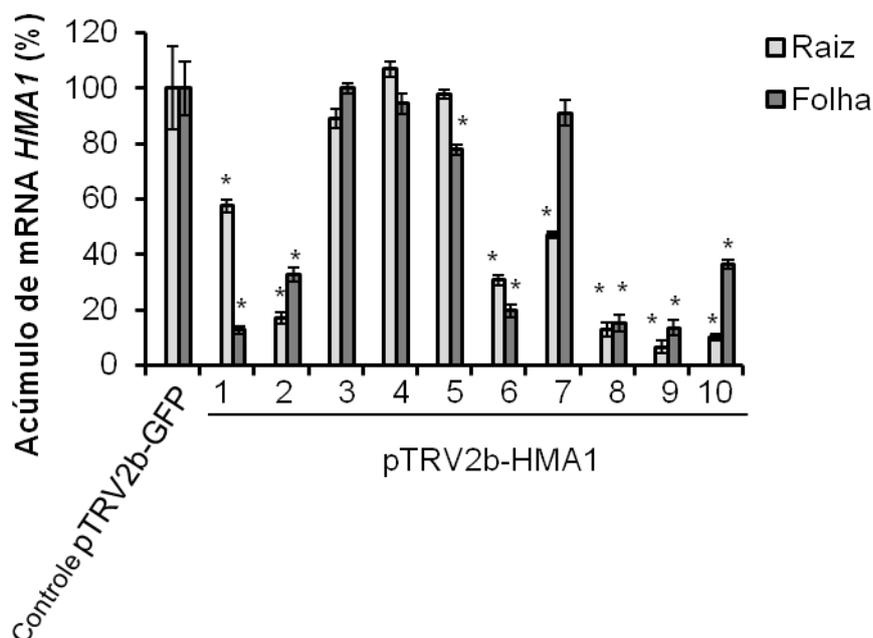


FIGURA 11. Quantificação, por qRT-PCR, do acúmulo de mRNA do *HMA1* nas folhas jovens e nas raízes da cv. Micro-Tom aos 9 dpi. Os valores de 1-10 correspondem às plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1 e representam a redução no acúmulo de mRNA do *HMA1* em relação ao acúmulo verificado nas plantas que receberam o inóculo controle (pTRV1+pTRV2b-GFP) (calibrador). Os níveis de acúmulo de mRNA são expressos em porcentagem. Para o calibrador estão representados a média e o desvio padrão de cinco repetições biológicas. Para as plantas de 1-10 estão representadas as quantificações em plantas individualizadas e o desvio padrão de três repetições técnicas. \*Diferem do calibrador pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Após a confirmação do silenciamento do *HMA1*, novas plantas de tomate foram agroinfiltradas com o inóculo controle e com o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1 para a posterior adição dos tratamentos sem Cd ou com Cd, realizada aos 10 dpi. As folhas jovens destas plantas foram coletadas aos 14 dpi e utilizadas nas quantificações dos níveis de silenciamento do *HMA1*. Todas as plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1

apresentaram reduções superiores a aproximadamente 60% no acúmulo de mRNA do *HMA1* (Figura 12).

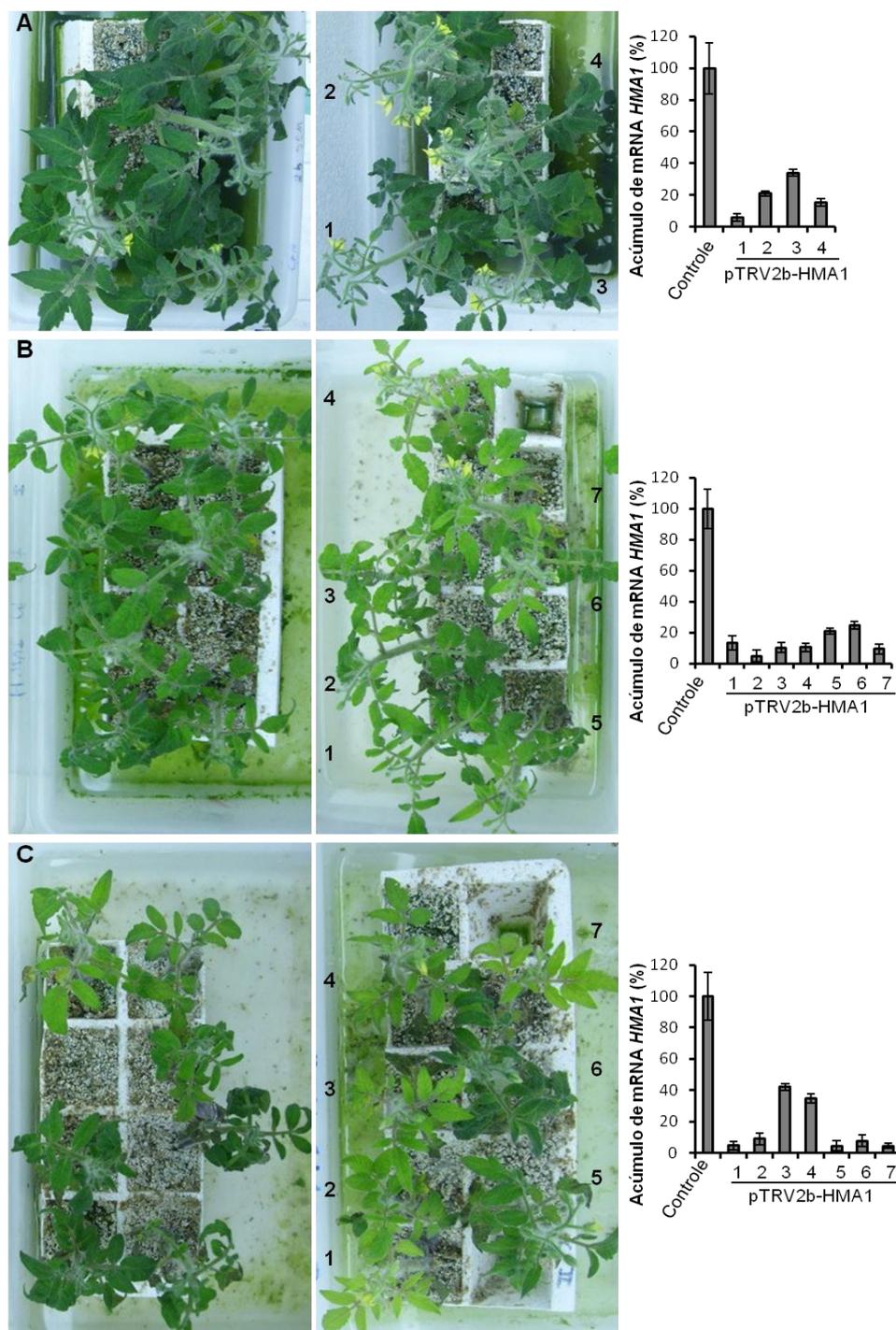


FIGURA 12. Plantas de tomate cv. Micro-Tom, não silenciadas ou silenciadas para o *HMA1*, submetidas aos tratamentos sem Cd ou com Cd. As plantas da esquerda representam as plantas não silenciadas, as plantas da direita representam as plantas silenciadas. As fotos

foram feitas três semanas após a primeira adição dos tratamentos sem Cd (A), Cd a 0,7 mM (B) e Cd a 1,0 mM (C). Aos 14 dpi as folhas jovens foram coletadas para a quantificação do acúmulo de mRNA do *HMA1* (gráficos). Os números de 1-4 (A) ou 1-7 (B e C) nos gráficos representam a identificação das plantas silenciadas. Para o controle estão representados a média e o desvio padrão de todas as plantas, de cada tratamento, agroinfiltradas com o inóculo controle. Para as plantas que receberam o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1 estão representadas as quantificações em plantas individualizadas e o desvio padrão de três repetições técnicas. Todas as plantas agroinfiltradas com o inóculo pTRV1+pTRV2b-HMA1 diferiram do calibrador (controle) pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Inicialmente, serão discutidos os efeitos do Cd nas plantas de tomate e, portanto, serão feitas comparações entre os tratamentos com e sem Cd. Em sequência, as plantas não silenciadas e silenciadas para o *HMA1* serão comparadas quanto à capacidade de tolerar o Cd. As variáveis utilizadas para estas comparações foram: PS da parte aérea, PS das raízes e comprimento da raiz principal. Adicionalmente, a fim de determinar o efeito do silenciamento do *HMA1* no acúmulo de Cd, o teor deste metal foi quantificado na parte aérea das plantas não silenciadas e silenciadas.

As plantas submetidas aos tratamentos com Cd (0,7 mM e 1,0 mM) apresentaram reduções significativas em todas as variáveis quantificadas em comparação com as plantas do tratamento sem Cd (controle) (Figura 13). A única exceção verificada foi para as raízes das plantas não silenciadas na presença de Cd a 0,7 mM, as quais não apresentaram redução significativa no valor de PS em comparação com o tratamento controle (Figura 13B) Nas espécies hiperacumuladores de Cd, este metal parece afetar menos o sistema radicular do que a parte aérea (Keller *et al.*, 2006). Silva (2010) demonstrou que o teor de Cd na parte aérea da cv. Micro-Tom foi sempre superior ao teor verificado nas raízes, o que consiste em uma importante característica de

espécies hiperacumuladoras. Sendo assim, o Cd provavelmente atinge concentrações tóxicas mais rapidamente na parte aérea do que nas raízes, justificando o seu efeito menos pronunciado neste último tecido. A exposição de plantas ao Cd comumente resulta na inibição do crescimento, bem como na inibição da produção de biomassa. Em populações hiperacumuladoras de Cd de *T. caerulescens*, foi verificado que aumentos na concentração de Cd (0 – 50  $\mu\text{M}$ ) também ocasionaram reduções de PS da parte aérea, PS das raízes e comprimento das raízes (Keller *et al.*, 2006). Outro efeito do Cd observado nas plantas de tomate foi a clorose foliar, a qual representa um dos principais sintomas visuais da fitotoxicidade do Cd (Figura 12). López-Millán e colaboradores (2009) verificaram que folhas de plantas de tomate cultivadas com Cd a 10  $\mu\text{M}$  apresentaram redução nos pigmentos fotossintéticos, além de uma deficiência moderada em Fe, justificando o sintoma de clorose nestas plantas. Além disso, as plantas cultivadas na presença de Cd a 1,0 mM apresentaram uma maior inibição de crescimento e de produção de biomassa, bem como uma clorose foliar mais intensa em comparação com as plantas cultivadas na menor dose de Cd (Figuras 12 e 13). Estas observações eram esperadas, tendo em vista que aumentos na concentração de Cd no substrato são acompanhados por aumentos no teor de Cd nas raízes e na parte aérea da cv. Micro-Tom, aumentando também os efeitos da toxicidade do metal (Silva, 2010).

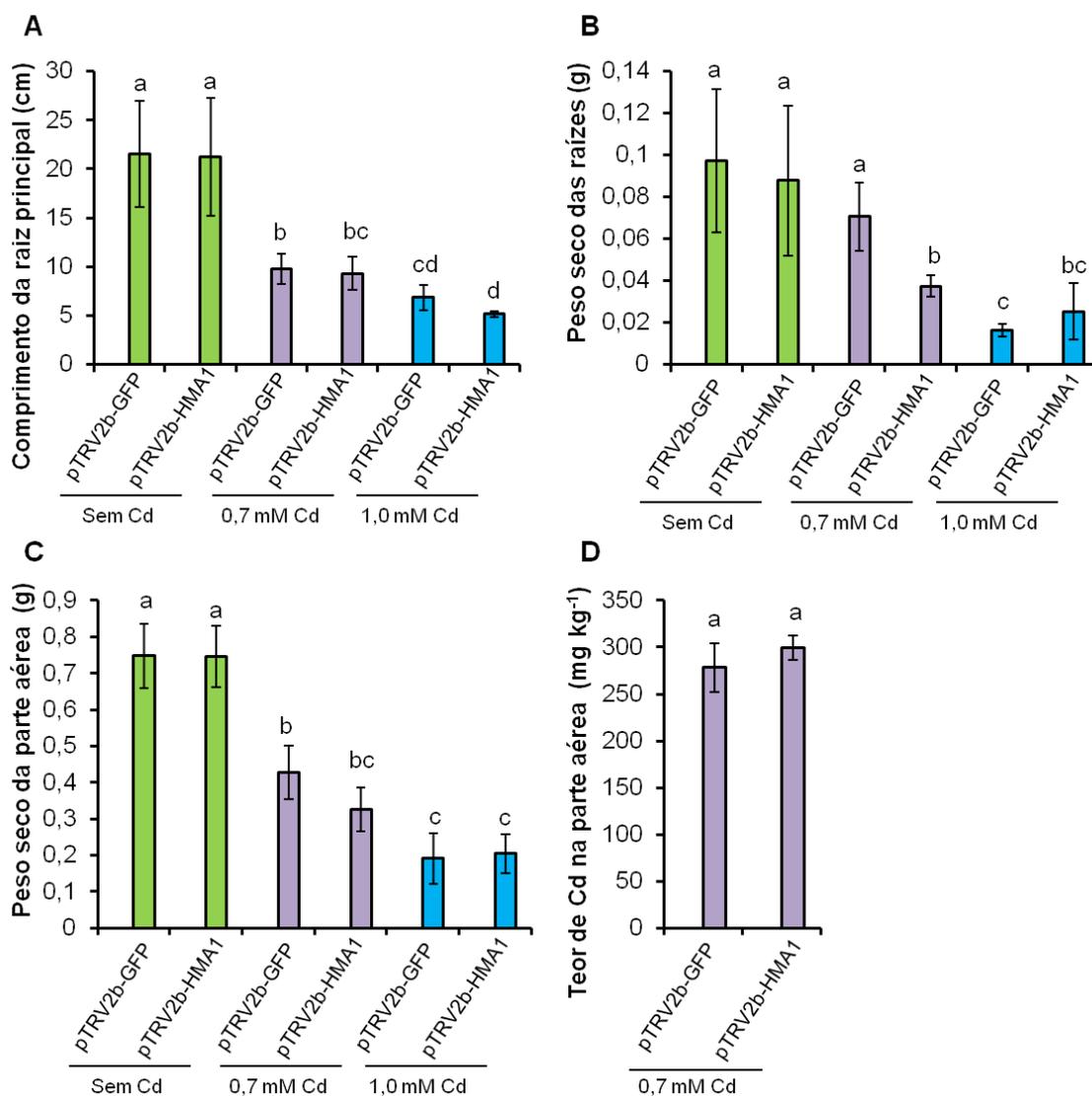


FIGURA 13. Quantificações de comprimento da raiz principal (A), PS das raízes (B), PS da parte aérea (C) e teor de Cd na parte aérea (D) em plantas da cv. Micro-Tom não silenciadas ou silenciadas para o *HMA1*. Aos 10 dpi as plantas foram transferidas para os tratamentos sem Cd ou com Cd (0,7 mM e 1,0 mM). Todos as quantificações foram feitas dois meses após a primeira adição dos tratamentos, os quais foram renovados a cada 14 dias. Os valores são médias de duas repetições com 7 plantas. As médias que receberam a mesma letra não diferem pelo teste Bonferroni ( $p \leq 0,05$ ).

Através das comparações entre as plantas de tomate não silenciadas e silenciadas para o *HMA1*, apenas uma diferença significativa foi verificada. Esta diferença ocorreu na presença de Cd a 0,7 mM e corresponde a uma redução de aproximadamente 2 vezes no PS das raízes das plantas

silenciadas em comparação com as plantas não silenciadas (Figura 13B). Outra comparação que pode ser feita consiste na intensidade dos sintomas de clorose. Apesar de não ter sido quantificado o teor de clorofila, foi possível perceber, principalmente na menor dose de Cd, uma clorose mais intensa nas plantas silenciadas. Contudo, não parece existir uma relação entre os maiores níveis de silenciamento e as maiores intensidades de clorose (Figura 12). Em resumo, estes resultados sugerem que as plantas de tomate contendo o gene *HMA1* silenciado parecem ser um pouco menos tolerantes ao Cd a 0,7 mM.

O *HMA1* de *A. thaliana* codifica para um transportador presente na membrana do cloroplasto e, possivelmente, localiza-se também na membrana de outros plastídeos (Seigneurin-Berny *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009). Moreno e colaboradores (2008) demonstraram o envolvimento do AtHMA1 no transporte de Cd ao promoveram a expressão deste gene em levedura. Em *A. thaliana*, mais de uma função já foi descrita para o AtHMA1. Seigneurin-Berny e colaboradores (2006) demonstraram o envolvimento do AtHMA1 na importação de Cu para o interior do cloroplasto. Contudo, um estudo mais recente sugere que o AtHMA1 atua na exportação de Zn do interior de cloroplastos e de outros plastídeos, colocando em questão a primeira descrição do AtHMA1 como importador de Cu (Kim *et al.*, 2009; Nouet *et al.*, 2011). Diante disso, pode ser esperado que o silenciamento do *HMA1* resulte na obtenção de plantas menos tolerantes ao Cd, considerando que este metal seja exportado dos cloroplastos da mesma forma que o Zn em *A. thaliana*.

Mutantes *hma1* de *A. thaliana*, cultivados em excesso de Zn (0,4 mM) por duas semanas, apresentaram maior sensibilidade à este metal e um aumento de 20% no conteúdo de Zn na parte aérea em comparação com as

plantas controle (Kim *et al.*, 2009). No presente trabalho, o teor de Cd foi quantificado na parte aérea das plantas de tomate não silenciadas e silenciadas para o *HMA1* (Figura 13D). Estas quantificações foram feitas apenas para as plantas cultivadas na presença de Cd a 0,7 mM, uma vez que as plantas cultivadas na maior dose não produziram biomassa suficiente para as quantificações. Desse modo, foi possível verificar que o silenciamento do *HMA1* em tomate não resultou em um aumento significativo no teor de Cd na parte aérea.

Diante dos resultados expostos, o silenciamento do *HMA1* em tomate parece ter apenas um pequeno efeito na tolerância das plantas ao Cd. Contudo, esta constatação se aplica somente a menor dose de Cd utilizada. Uma possível explicação para isto se baseia no trabalho de Wong e Cobbett (2009). Estes autores demonstraram que os genes *AtHMA2* e *AtHMA4* contribuem consideravelmente para a translocação de Zn e Cd em *A. thaliana*. O duplo mutante *hma2,hma4* apresentou um fenótipo característico de deficiência em Zn. Entretanto, o fenótipo foi restituído pela aplicação adicional de Zn, sugerindo que em concentrações elevadas de Zn este metal é transportado por mecanismos adicionais. Em função destes resultados, os autores sugeriram que mesmo pode ocorrer para o Cd, porém não pôde ser testado em *A. thaliana* devido à toxicidade do referido metal em concentrações mais elevadas. Dessa forma, é possível que na presença de Cd a 1,0 mM o transporte deste metal ocorra através de mecanismos adicionais, mascarando o efeito do silenciamento do *HMA1* em tomate.

## 5 CONCLUSÕES

A espécie *S. lycopersicum* é hiperacumuladora de Cd e, independentemente da cultivar, é capaz de acumular o metal nos frutos.

Os genes *LeNRAMP3*, *LeFER*, *LeIRT1* e *LeNRAMP1* podem servir como marcadores do estresse induzido por Cd em tomate.

A metodologia de VIGS empregada no presente trabalho permite o estudo dos efeitos do silenciamento nas raízes e em toda a parte aérea até o final do ciclo da cv. Micro-Tom.

O silenciamento do gene *HMA1* não tem efeito na acumulação de Cd na parte aérea de tomate, porém resulta em uma redução significativa no peso seco das raízes e em um aumento na intensidade de clorose nas plantas cultivadas com Cd a 0,7 mM.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, P. D.; ALLOWAY, B. J.; DOURADO, A. M. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 144, n. 3, p. 736-45, 2006.

BAKER, A. J. M. et al. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. S. (Ed.). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 85-107.

BALESTRASSE, K. B.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 262, n. 2, p. 373-381, 2004.

BARABASZ, A. et al. Metal response of transgenic tomato plants expressing P(1B)-ATPase. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 145, n. 2, p. 315-331, 2012.

BARYLA, A. et al. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. **Planta**, New York, v. 212, n. 5-6, p. 696-709, 2001.

BAUER, P. et al. Analysis of sequence, map position, and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in *Arabidopsis* and tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 4169-4183, 2004a.

BAUER, P. et al. Molecular regulation of iron uptake in the dicot species *Lycopersicon esculentum* and *Arabidopsis thaliana*. **Soil Science and Plant Nutrition**, Malden, v. 50, n. 7, p. 997-1001, 2004b.

BAULCOMBE, D. RNA silencing in plants. **Nature**, London, v. 431, p. 356-363, 2004.

BELKHADI, A. et al. Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 73, n. 5, p. 1004-11, 2010.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.

BERECZKY, Z. et al. Differential regulation of nramp and irt metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 27, p. 24697-704, 2003.

BHATTARAI, K. K. et al. The MI-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 312-23, 2007.

BIZARRO, V. G.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P. Teor de cádmio em fertilizantes fosfatados comercializados no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 247-250, 2008.

BOOMINATHAN, R.; DORAN, P. M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Biotechnology and Bioengineering**, Malden, v. 83, n. 2, p. 158-67, 2003.

BRIGNETI, G. et al. Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. **Plant Journal**, Malden, v. 39, p. 264-272, 2004.

BUCKHOUT, T. J.; YANG, T. J. W.; SCHMIDT, W. Early iron-deficiency-induced transcriptional changes in *Arabidopsis* roots as revealed by microarray analyses. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 147, 2009.

CAILLIATTE, R. et al. High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for *Arabidopsis* growth in low manganese conditions. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 3, p. 904-17, 2010.

CHEN, F. et al. Cadmium translocation and accumulation in developing barley grains. **Planta**, New York, v. 227, n. 1, p. 223-32, 2007.

CHEN, Y.-Y. et al. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 136, n. 3, p. 324-35, 2009.

CLEMENS, S. et al. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. **Plant Biology**, Malden, v. 95, p. 12043-12048, 1998.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1707-19, 2006.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRÄMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 309-15, 2002.

COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 825-32, 2000.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plant. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 3, p. 322-330, 2006.

COLANGELO, E. P.; GUERINOT, M. L. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3400-3412, 2004.

COURBOT, M. et al. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, p. 1052-1065, 2007.

CURIE, C. et al. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. **Biochemical Journal**, London, v. 347, p. 749-55, 2000.

CURIE, C. et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**, Oxford, v. 103, n. 1, p. 1-11, 2009.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997.

DEMIREZEN, D.; AKSOY, A. Heavy metal levels in vegetables in Turkey are within safe limits for Cu, Zn, Ni and exceeded for Cd and Pb. **Journal of Food Quality**, Malden, v. 29, n. 3, p. 252-265, 2006.

DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 1659-66, 2006.

EIDE, D. et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5624-8, 1996.

EMERY, G. C.; MUNGER, H. M. Effects of inherited differences in growth habit on fruit size and soluble solids in tomato. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 95, p. 51-56, 1970.

ERASO, P. et al. Ycf1-dependent cadmium detoxification by yeast requires phosphorylation of residues Ser908 and Thr911. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 577, n. 3, p. 322-6, 2004.

EREN, E.; ARGUELLO, J. M. *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal-transporting PIB-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn homeostasis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, p. 3712-3723, 2004.

FODOR, F. et al. Effects of Pb and Cd on cucumber depending on the Fe-complex in the culture solution. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 148, n. 3-4, p. 434-439, 1996.

FRIDMAN, E. et al. Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 266, n. 5, p. 821-6, 2002.

GEORGELIS, N. **High fruit sugar characterization, inheritance and linkage of molecular markers in tomato**. 2002. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Hortícolas) - School of Graduate Studies, Florida University, Gainesville, 2002.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 6, n. 2, p. 215-222, 2011.

GONÇALVES, J. F. et al. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 19, n. 3, p. 223-232, 2007.

GRANT, C. A. et al. Management factors which influence cadmium concentrations in crops. In: MCLAUGHLIN, M. J.; SINGH, B. R. (Ed.). **Cadmium in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 151-198.

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

GRATÃO, P. L. **Resposta de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) ao cádmio**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GROTZ, N.; GUERINOT, M.L. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1763, n. 7, p. 595-608, 2006.

GUIMARÃES, M. de A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v. 1, n. 3, p. 58-68, 2008.

GZYL, J.; RYMER, K.; GWOZDZ, E. A. Differential response of antioxidant enzymes to cadmium stress in tolerant and sensitive cell line of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 56, n. 4, p. 723-727, 2009.

HANIKENNE, M. et al. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. **Nature**, London, v. 453, p. 391-395, 2008.

HARTL, M. et al. Optimized virus-induced gene silencing in *Solanum nigrum* reveals the defensive function of leucine aminopeptidase against herbivores and the shortcomings of empty vector controls. **New Phytologist**, Malden, v. 179, p. 356-365, 2008.

HASSAN, M. J. et al. Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 168, n. 2, p. 255-261, 2005.

HASSINEN, V. H. **Search for metal-responsive genes in plants: putative roles in metal tolerance or accumulation**. 2009. 84 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Faculty of Natural and Environmental Sciences, University of Kuopio, Kuopio, 2009.

HÉDIJI, H. et al. Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 73, n. 8, p. 1965-74, 2010.

HSU, Y. T.; KAO, C. H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 42, p. 227-238, 2004.

HUSSAIN, D. et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 1327-1339, 2004.

INGWERSEN, J.; STRECK, T. A regional-scale study on the crop uptake of cadmium from sandy soils: measurement and modeling. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 34, n. 3, p. 1026-35, 2005.

JABLONSKA, B. et al. The Mi-9 gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of Mi-1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 1044-1054, 2007.

JIANG, C.-Z. et al. Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 4, p. 973-9, 2008.

JIMÉNEZ, A. et al. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, n. 1, p. 275-284, 1997.

JOHN, M. K.; VAN LARHOVEN, C. J. Differential effects of cadmium on lettuce varieties. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 10, p. 163-173, 1976.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 315 p.

- KELLER, C. et al. Cadmium tolerance and hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens* populations grown in hydroponics are related to plant uptake characteristics in the field. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 33, n. 7, p. 673, 2006.
- KIM, D.-Y. et al. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. **Plant Journal**, Malden, v. 50, n. 2, p. 207-18, 2007.
- KIM, D.-Y. et al. AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 922-932, 2006.
- KIM, S. A.; GUERINOT, M. L. Mining iron: iron uptake and transport in plants. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2273-80, 2007.
- KIM, Y.-Y. et al. AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, Malden, v. 58, n. 5, p. 737-53, 2009.
- KOBAE, Y. et al. Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. **Plant & Cell Physiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 309-18, 2006.
- KORENKOV, V. et al. Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. **Planta**, New York, v. 226, p. 1379-1387, 2007.
- KORENKOV, V. et al. Root-selective expression of AtCAX4 and AtCAX2 results in reduced lamina cadmium in field-grown *Nicotiana tabacum* L. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 7, n. 3, p. 219-26, 2009.
- KORSHUNOVA, Y. O. et al. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 37-44, 1999.
- KÜPPER, H.; KOCHIAN, L. V. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). **New Phytologist**, Malden, v. 185, n. 1, p. 114-29, 2010.
- LEITA, L. et al. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 19, p. 527-533, 1996.
- LI, J. et al. Risk assessment for safety of soils and vegetables around a lead/zinc mine. **Environmental Geochemistry and Health**, Dordrecht, v. 28, p. 37-44, 2006.
- LING, H.-Q. et al. The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 21, p. 13938-43, 2002.

LIU, H. et al. Influence of iron plaque on uptake and accumulation of Cd by rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 394, n. 2-3, p. 361-8, 2008.

LIU, Y. et al. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate-glutathione cycle in *Beckmeria nivea* (L.) Gaud. **Chemosphere**, Oxford, v. 69, n. 1, p. 99-107, 2007.

LIU, Y.; SCHIFF, M.; DINESH-KUMAR, S. P. Virus-induced gene silencing in tomato. **Plant Journal**, Malden, v. 31, n. 6, p. 777-786, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-MILLÁN, A.-F. et al. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 2-3, p. 376-385, 2009.

LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21-37, 2011.

MARKOVIĆ, M. et al. Assessment of heavy metal and pesticide levels in soil and plant products from agricultural area of Belgrade, Serbia. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 2, p. 341-351, 2010.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. M.; BAULCOMBE, D. C. Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. **Journal of Virology**, Washington, v. 82, n. 8, p. 4064-71, 2008.

MCLAUGHLIN, M. J. et al. Effect of cultivar on uptake of cadmium by potato tubers. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 45, p. 1483-1495, 1994.

MENDES, A. M. S. et al. Bioavailability of cadmium and lead in a soil amended with phosphorus fertilizers. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 328-332, 2006.

MILLER, J. R. et al. Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Río Pilcomayo basin, Bolivia. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 320, p. 189-209, 2004.

MILLS, R. F. et al. Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. **Plant Journal**, Malden, v. 35, n. 2, p. 164-176, 2003.

MILNER, M. J.; KOCHIAN, L. V. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. **Annals of Botany**, Oxford, v. 102, n. 1, p. 3-13, 2008.

MONTANINI, B. et al. Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 107, 2007.

MOREL, M. et al. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 2, p. 894-904, 2009.

MORENO, I. et al. AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup>/heavy metal pump. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 283, n. 15, p. 9633-41, 2008.

NIGAM, R.; SRIVASTAVA, S.; PRAKASH, S. Cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 230, p. 107-113, 2001.

NOCITO, F. F. et al. Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 8, p. 1-8, 2002.

NOUET, C.; MOTTE, P.; HANIKENNE, M. Chloroplastic and mitochondrial metal homeostasis. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 395-404, 2011.

ORZAEZ, D. et al. A visual reporter system for virus-induced gene silencing in tomato fruit based on anthocyanin accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 3, p. 1122-34, 2009.

PENCE, N. S. et al. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 9, p. 4956-60, 2000.

PETERSON, P.; ALLOWAY, B. J. Cadmium in soils and vegetation. In: WEBB, M. B. (Ed.). **The chemistry, biochemistry and biology of cadmium**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland and Biomedical Press, 1979. p. 45-92.

PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 10, p. 829-837, 2003.

PINTO, A. P. et al. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 326, n. 1-3, p. 239-47, 2004.

PLAZA, S. et al. Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 7, p. 1717-28, 2007.

REZVANI, M.; ZAEFARIAN, F. Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aeluropus litoralis*. **Australian Journal of Agricultural Engineering**, Melbourne, v. 2, n. 4, p. 114-119, 2011.

RODRÍGUEZ-NEGRETE, E. A.; CARRILLO-TRIPP, J.; RIVERA-BUSTAMA, R. F. RNA Silencing against Geminivirus: complementary action posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, n. 3, p. 1332-1340, 2008.

ROMERO-PUERTAS, M. C. et al. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. **Plant, Cell and Environment**, Bognor Regis, v. 25, p. 677-686, 2002.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-26, 2001.

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

SCHAAF, G. et al. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 10, p. 9091-6, 2004.

SCHICKLER, H.; CASPPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 105, p. 39-44, 1999.

SEIGNEURIN-BERNY, D. et al. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 5, p. 2882-92, 2006.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 12, p. 656-65, 2011b.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K. S. Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. **Plant Biotechnology Journal**, Malden, v. 9, n. 7, p. 797-806, 2011a.

SHIGAKI, T.; HIRSCHI, K. D. Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. **Plant Biology**, Malden, v. 8, n. 4, p. 419-29, 2006.

SHIKANAI, T. et al. PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 6, p. 1333-1346, 2003.

SILVA, A. A. **Identificação de espécies hiperacumuladoras e prospecção de genes relacionados à tolerância de plantas ao cádmio**. 2010. 84 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SOMASHEKARAIHAH, B. V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A. R. K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 85, p. 1399-3054, 1992.

SUN, Y.; ZHOU, Q.; DIAO, C. Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 1103-10, 2008.

TAKAHASHI, R. et al. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 14, p. 4843-50, 2011.

THOMINE, S. et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 9, p. 4991-6, 2000.

THOMINE, S.; LANQUAR, V. Iron transport and signaling in plants. In: GEISLER, M.; VENEMA, K. (Ed.). **Transporters and pumps in plant signaling**. Berlin: Springer-Verlag, 2011. p. 99-131.

TIRYAKIOGLU, M. et al. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Jena, v. 20, n. 3, p. 181-9, 2006.

TOMMASINI, R. et al. An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. **Plant Journal**, Malden, v. 13, n. 6, p. 773-80, 1998.

TÜZEN, M. Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 74, p. 289-297, 2003

UNVER, T.; BUDAK, H. Virus-induced gene silencing, a post transcriptional silencing method. **International Journal of Plant Genomics**, New York, v. 2009, p.1-8, 2009.

URAGUCHI, S. et al. Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 52, p. 20959-64, 2011.

VALENTINE, T. et al. Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. **Plant Physiology**, Rockville, v. 136, n. 12, p. 3999-4009, 2004.

VASSILEV, A. et al. Cadmium accumulation and tolerance of two salix genotypes hydroponically grown in presence of cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, n. 12, p. 2159-2177, 2005.

VASSILEV, A.; LIDON, F. Cd-induced membrane damages and changes in soluble protein and free amino acid contents in young barley plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 23, n. 2, p. 130-136, 2011.

VASSILEV, A.; YORDANOV, I.; TSONEV, T. Effects of Cd<sup>2+</sup> on the physiological state and photosynthetic activity of young barley plants. **Photosynthetica**, Dordrecht, v. 34, n. 2, p. 293-302, 1997.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, n. 3, p. 364-72, 2009.

VERMA, S.; DUBEY R. S. Influence of lead toxicity on photosynthetic pigments, lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in rice plants. **Indian Journal of Agricultural Biochemistry**, Vadodara, v. 15, p. 17-22, 2002.

VERRET, F. et al. Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His11 stretch. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, p. 1515-1522, 2005.

VERRET, F. et al. Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 576, n. 3, p. 306-12, 2004.

VERT, G. et al. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 6, p. 1223-1233, 2002.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, London, v. 17, n. 8, p. 449-459, 2001.

WAHID, A.; ARSHAD, M.; FAROOQ, M. Cadmium phytotoxicity: responses, mechanisms and mitigation strategies: a review. In: LICHTFOUSE, E. (Ed.). **Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p. 371-403.

WEI, S.; ZHOU, Q.; KOVAL, P. V. Flowering stage characteristics of cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their significance to phytoremediation. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 369, n. 1-3, p. 441-6, 2006.

WHITE, P. J.; BROWN, P. H. Plant nutrition for sustainable development and global health. **Annals of Botany**, Oxford, v. 105, p. 1073-1080, 2010.

WILLIAMS, L. E.; MILLS, R. F. P(1B)-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 491-502, 2005.

WONG, C. K. E.; COBBETT, C. S. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Malden, v. 181, n. 1, p. 71-8, 2009.

WOZNY, A.; STRONSKI, A.; GWOZDZ, E. **Plant cell responses to cadmium**. Poznań: Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, 1990. 29 p.

WU, H. et al. Co-overexpression FIT with AtbHLH38 or AtbHLH39 in *Arabidopsis*-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 790-800, 2012.

YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 167-179, 2010.

YANG, J. et al. Genotypic variations in the accumulation of Cd exhibited by different vegetables. **Journal of Environmental Sciences**, Amsterdam, v. 22, n. 8, p. 1246-1252, 2010.

YANG, Y. et al. Accumulation of cadmium in the edible parts of six vegetable species grown in Cd-contaminated soils. **Journal of Environmental Management**, London, v. 90, n. 2, p. 1117-22, 2009.

YUSUF, A. A.; AROWOLO, T. A.; BAMGBOSE, O. Cadmium, copper and nickel levels in vegetables from industrial and residential areas of Lagos City, Nigeria. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, p. 375-378, 2003.

ZAYED, A.; GOWTHAMAN, S.; TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 27, n. 3, p. 715-721, 1998.

ZHAO, F. J.; LOMBI, E.; MCGRATH, S. P. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 249, p. 37-43, 2003.

ZHENG, R.-L. et al. Cadmium accumulation in the edible parts of different cultivars of radish, *Raphanus sativus* L., and carrot, *Daucus carota* var. sativa, grown in a Cd-contaminated soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 81, p. 75-9, 2008.

## 7 APÊNDICES

APÊNDICE 1. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b-PDS com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em destaque está a sequência de nucleotídeos do *PDS* e as regiões grifadas em cinza indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*.

TGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAG**GTTAAC**GGCACTCAACTTTATAAAC  
CCTGACGAACTTTCAATGCAGTGCATTTT**GATCGC**ATTGAACAGGTTTCTTCAGG  
AGAAACATGGTTCAAAAATGGCCTTTTTAGATGGTAATCCTCCTGAGAGACTTTG  
CATGCCGATTGTTGAACACATTGAGTCAAAGGTGGCCAAGTCAGACTGAACTC  
ACGAATAAAAAAGATTGAGCTGAATGAGGATGGAAGTGTCAAGAGTTTTATACT  
GAGTGACGGTAGTGCAATCGAGGGAGATGCTTTTGTGTTTGCCGCTCCAGTGGA  
TATTTTCAAGCTTCTATTGCCTGAAGACTGGAAAGAGATTCCATATTTCCAAAAG  
TTGGAGAAGTTAGTCGGAGTACCTGTGATAAATGTACATATATGGTTTGACAGA  
AAACTGAG**GAATTC**TCTAGAAGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCACGC

APÊNDICE 2. Resultado do sequenciamento do produto de PCR do vetor pTRV2b-HMA1 com os oligonucleotídeos iniciadores TRV F/ R. Em destaque está a sequência de nucleotídeos do *HMA1* e as regiões grifadas em cinza indicam os sítios das enzimas *HpaI* e *EcoRI*.

TGACCTACTGGTTACTGTATCACTTACCCGAG**GTTAAC**TTTACCGAGCATTGGGCC  
TCATGGTAGCTGCATCACCTTGTGCATTAGCTGTGGCACCATTGGCTTACGCAA  
CTGCCATCAGTGCTTGTGCAAAAAGGGGCATATTGCTTAAAGGTGGACAGGTAC  
TTGATGCCTTGGCTTCATGCCATAGTATTGCATTTGACAAAAGTGGTACATTGAC  
AACAGGGGAGTTCATGTGCAAAGCAATTGAACCGATACATGGACATGCTAAGA  
GTGTTGGAAAAGGATTTGCTTCTTGTGTAACCCAGTTGTGAGAAAGAAGCAC  
TTGCTGTTGCAGCTGCAATGGAGAGGGGTACA**ACTCAC**CAATTGGAAGAGCTG  
TTGTAGATCAG**GAATTC**TCTAGAAGGCCTCCATGGGGATCCGGTACCGAGCTCAC  
GC