

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

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES HIPERACUMULADORAS E PROSPECÇÃO
DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA DE PLANTAS A CÁDMIO

Adriano Alves da Silva
Engenheiro Agrônomo, MSc./UFRGS

Tese apresentada com um dos requisitos
à obtenção do Grau de Doutor em Fitotecnia
Ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Julho de 2010

Dedico à minha família:

meus pais

Paulo Regis Ferreira da Silva e Sueli Alves da Silva

minha irmã

Alessandra Alves da Silva

minha avó

Zeferina Duarte Alves

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as pessoas que colocou ao meu lado iluminando meu caminho.

Aos meus pais, Paulo e Sueli, que sempre me apoiaram em tudo que eu fiz e são responsáveis por tudo que sou hoje.

Ao professor Marcelo Gravina de Moraes pela orientação, apoio, compreensão e ensinamentos.

À professora e amiga Carla Andréa Delatorre, pela amizade e conselhos, simplesmente uma pessoa com um conhecimento ímpar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pelo apoio financeiro.

À minha grande amiga e colega de laboratório Ana Paula Trivilin, pelo companheirismo, amizade e ajuda.

À minha irmã Alessandra e ao meu cunhado Hudson pela amizade e companheirismo nos momentos de descanso.

A um grande professor, orientador e amigo que sempre esteve do meu lado e em quem sempre me espelhei, meu pai.

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES HIPERACUMULADORAS E PROSPECÇÃO DE GENES RELACIONADOS À TOLERÂNCIA DE PLANTAS A CÁDMIO¹

Autor: Adriano Alves da Silva

Orientador: Marcelo Gravina de Moraes

RESUMO

Nas últimas décadas, com aumento da industrialização e o uso mais intenso de práticas agrícolas, está havendo a liberação de altas quantidades de elementos potencialmente tóxicos na biosfera, como o metal pesado cádmio (Cd), que é muito tóxico à maioria dos organismos. Uma alternativa para solucionar este problema é o uso da fitoextração, que se baseia no cultivo de plantas para recuperar áreas degradadas. Porém, atualmente, poucas espécies de plantas foram descritas como hiperacumuladoras de Cd e há pouca informação sobre os mecanismos envolvidos na tolerância das plantas dessas espécies a altos teores deste metal em seus tecidos. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar novas espécies da família Solanaceae hiperacumuladoras de cádmio e os respectivos genes relacionados à sua absorção, translocação e acúmulo em plantas. Utilizaram-se três estratégias de análise. Inicialmente foram identificadas novas espécies hiperacumuladoras de Cd. Após, realizou-se um estudo na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* para identificar genes relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd nas plantas e, finalmente, buscou-se a aplicação dos conhecimentos obtidos em *A.thaliana* em duas espécies identificadas neste trabalho como hiperacumuladoras de Cd. Foram identificadas e caracterizadas duas espécies hiperacumuladoras de plantas, *Solanum americanum* e *Solanum lycopersicum* (tomate), cultivares Micro-Tom e Gaúcho. Os resultados obtidos evidenciaram que os genes *HMA2* e *HMA3* de *A. thaliana* estão relacionados ao processo de acúmulo de Cd na parte aérea da planta. Nesse estudo, foram identificados genes ortólogos aos genes *HMA2* e *HMA3* de *A. thaliana* em tomate, cv. Micro-Tom. A análise dos genes *HMA2* e *HMA3* indica alteração de suas expressões quando as plantas são expostas a Cd, sugerindo a participação desses genes em algum mecanismo de tolerância do tomate a esse metal pesado. Estudos de análise funcional dos genes identificados (*HMA2* e *HMA3*) em tomate, cv. Micro-Tom, será importante para comprovar a importância desses dois genes nos processos de detoxificação e acúmulo de Cd nos tecidos das plantas.

¹Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (90p.) Julho, 2010.

IDENTIFICATION OF HYPERACCUMULATOR SPECIES AND PROSPECTING PLANT GENES RELATED TO CADMIUM TOLERANCE¹

Author: Adriano Alves da Silva

Adviser: Marcelo Gravina de Moraes

ABSTRACT

In recent decades, with increasing industrialization and more intensive management of agricultural practices, the release of large quantities of potentially toxic elements in the biosphere has also increased, such as the heavy metal cadmium (Cd), which is extremely toxic element to most organisms. An alternative to solve this problem is phytoextraction, which is based on the use of plants to recover degraded areas. But so far, few plant species have been described as a Cd hyperaccumulator and there is little information about the mechanisms that allow these plants to tolerate high levels of this metal in their tissues. The aim of this study was to identify and characterize new species of Solanaceae Cd hyperaccumulators species and the genes related with Cd absorption, translocation and accumulation in these plants. Three strategies were used. First, Cd hyperaccumulators species were identified. Then, a study in the model specie *Arabidopsis thaliana* was performed to identify genes related to Cd absorption, translocation and accumulation and, finally, we tried to apply the knowledge obtained in *A. thaliana* to two species described here as Cd hyperaccumulators. Two new Cd hyperaccumulator plant species were identified and characterized, *Solanum americanum* and *Solanum lycopersicum* (tomato), cultivar Micro-Tom and Gaucho. In this study, the *A. thaliana* genes *HMA2* and *HMA3* were related to the process of shoot Cd accumulation. From this result, we identified orthologous genes in tomato cv. Micro-Tom to the *A. thaliana* genes *HMA2* and *HMA3*. The analysis of these genes indicates change in their expressions patterns when plants are exposed to cadmium, suggesting their participation in some mechanism of tolerance of this species to heavy metal. Functional analysis studies of identified genes (*HMA2* and *HMA3*) in tomato cv. Micro-Tom will be important to demonstrate the importance of these two genes in the process of detoxification and accumulation of Cd in tissues.

¹Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (90p.) July, 2010.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Potencial do estudo de solanáceas silvestres para identificação de novas espécies hiperacumuladoras de Cd.....	6
2.2. Fitotoxicidade de Cd.....	8
2.3. Fitorremediação.....	10
2.4. Genes relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em plantas.....	13
2.5. Ionomia de plantas.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Resposta de <i>Solanum americanum</i> a doses de Cd no substrato.....	19
3.1.1 Caracterização fisiológica de <i>Solanum americanum</i> em função de doses de Cd no substrato.....	19
3.1.2 Fatores de translocação e de bioacumulação e taxa de extração de cádmio.....	20
3.1.3 Análise estatística.....	21
3.2 Resposta de <i>Solanum lycopersicum</i> a doses de Cd no substrato.....	21
3.2.1 Caracterização fisiológica de tomate em função de doses de Cd no substrato.....	21
3.2.2 Identificação de genes ortólogos relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em tomate cv. Micro-Tom e análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	23
3.2.3 Análise estatística.....	27
3.3 Prospecção de genes relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em <i>Arabidopsis thaliana</i>	27
3.3.1 Caracterização e seleção de um acesso de <i>Arabidopsis thaliana</i> para acúmulo de Cd na parte aérea.....	28
3.3.2 Microarray de DNA baseado em BSA.....	28
3.3.3 Análise de expressão gênica de <i>HMA2</i> e <i>HMA3</i> por RT-qPCR.....	29
3.3.4 Enxertia de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.3.5 Clonagem e <i>sequenciamento</i> de DNA genômico dos genes <i>HMA2</i> e <i>HMA3</i>	30
3.3.6 Análise estatística.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1. Resposta de <i>Solanum americanum</i> a doses de Cd no substrato.....	32

	Página
4.1.1. Efeito do Cd na planta.....	33
4.1.2. Acúmulo de Cd na planta.....	35
4.1.3. Fatores de translocação e de bioacumulação e taxa de extração de cádmio em <i>Solanum americanum</i>	35
4.2. Resposta de <i>Solanum lycopersicum</i> a doses de Cd no substrato.....	38
4.2.1. Efeito do Cd na planta.....	38
4.2.2. Teor de Cd em tomate nas cultivares Micro-Tom e Gaúcho	40
4.2.3. Perfil ionômico de plantas de tomate cv. Micro-Tom.....	42
4.2.4. Fatores de translocação e de bioacumulação e taxa de extração de cádmio em tomate cv. Micro-Tom.....	44
4.2.5. Identificação de genes ortólogos e análise de expressão de <i>HMA2</i> e <i>HMA3</i> em tomate cv. Micro-Tom.....	46
4.3. Prospecção de genes relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em <i>Arabidopsis thaliana</i>	48
4.3.1. Seleção do acesso de <i>Arabidopsis thaliana</i> em função de sua resposta à Cd.....	48
4.3.2. Mapeamento dos genes relacionados ao fenótipo baixo Cd no acesso de <i>Arabidopsis thaliana</i> CS28181.....	49
4.3.3. Sequenciamento e análise de expressão dos genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>HMA2</i> e <i>HMA3</i>	52
4.3.4. Enxertia de <i>Arabidopsis thaliana</i>	54
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8. VITA.....	79

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e RT- qPCR na direção 5' a 3'	27
2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e RT- qPCR nas direções 5' a 3' e 3' a 5'	31
3. Teores de 20 elementos nas raízes, na parte aérea e nos frutos de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>), cv. Micro-Tom, sem e com aplicação de 50 mg kg ⁻¹ de cádmio (Cd) no substrato, na média de seis épocas de coleta de material. West Lafayette, IN, EUA, 2009.....	43

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Teor relativo de clorofila na folha (A), massa seca da parte aérea e das raízes (B) e teor de cádmio (Cd) na parte aérea e nas raízes (C) de <i>Solanum americanum</i> , avaliados aos 60 dias após a emergência, em função de doses de Cd aplicadas no substrato. Porto Alegre-RS, 2008..	34
2. Taxa de extração de metal (TEM) (a), fator de bioacumulação (b) e fator de translocação (c) de cádmio (Cd) em <i>Solanum americanum</i> em função de doses no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.....	37
3. Teor relativo de clorofila na folha (a), massa seca da parte aérea e das raízes por planta (a) e peso fresco dos frutos (b) de <i>Solanum lycopersicum</i> , cv. Micro-Tom, avaliados aos 60 dias após a emergência, em função de doses de cádmio (Cd) aplicadas no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.....	39
4. Teor de cádmio (Cd) na parte aérea, nas raízes (a) e nos frutos (b) em <i>Solanum lycopersicum</i> , cv. Micro-Tom, e na parte aérea da cv. Gaúcho (c) em função de doses de Cd no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.....	41
5. Evolução do teor de cádmio (Cd) nas raízes e na parte aérea de <i>Solanum lycopersicum</i> , cv. Micro-Tom, ao longo de seu ciclo de desenvolvimento, cultivado sem e com aplicação de 50 mg kg ⁻¹ de Cd no substrato. West Lafayette-IN, EUA, 2009.....	42
6. Fatores de translocação (a) e de bioacumulação (b) e taxa de extração de metal (TEM) (c) em <i>Solanum lycopersicum</i> , cv. Micro-Tom, em função de doses de Cd no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.....	45
7. Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados dos genes de tomate cv. Micro-Tom ortólogos aos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
8. Expressão relativa do gene <i>HMA2</i> nas raízes (a) e na parte aérea (b) e do gene <i>HMA3</i> nas raízes (c) e na parte aérea (d) de plantas de tomate cv. Micro-Tom, crescidas na ausência e na presença (50 mg kg ⁻¹) de cádmio (Cd) no substrato. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos dos Cts do controle endógeno (Gapdh). Os valores representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador na ausência de Cd.....	47
9. Distribuição de 70 acessos de <i>Arabidopsis thaliana</i> em função de sua capacidade de acúmulo de cádmio (Cd) na parte aérea. Em destaque, o acesso selecionado CS28181, com fenótipo com baixo teor de Cd. West Lafayette-IN, EUA, 2009.....	49

	Página
10. Histograma do teor de cádmio (Cd) na parte aérea nos acessos de <i>Arabidopsis thaliana</i> CS28181 Col-0 e na população F2 gerada pelo cruzamento entre os dois .As plantas foram crescidas em solo por cinco semanas e analisadas por ICP-MS. West Lafayette-IN, EUA, 2009.....	50
11. Bulk segregant analysis para o fenótipo baixo Cd na população F2, oriunda do cruzamento entre os acessos de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 e CS28181. Os dados apresentados representam a diferença na hibridização entre os dois <i>pools</i> de DNA, baixo (CS28181) e alto (Col-0) teor de Cd na parte aérea. Assim, os valores do eixo Y para puro Col-0 seria -1,0 e para puro CS28181 seria 1,0. West Lafayette-IN, EUA, 2009.....	51
12. Mapa do cromossomo 4 de <i>Arabidopsis thaliana</i> mostrando os genes <i>HMA2</i> (AT4G30110.1) e <i>HMA3</i> (AT4G30120.1) distribuídos em sequência no genoma. Figura obtida através do site www.arabidopsis.org	52
13. Expressão relativa dos genes <i>HMA2</i> e <i>HMA3</i> nas raízes (a) e na parte aérea (b) no controle Col-0 e no acesso CS28181 . Plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> três semanas após a emergência. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos dos Cts do controle endógeno (Gapdh). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador O ppm de Cd.....	53
14. Teor de cádmio (Cd) na parte aérea de plântulas de <i>A.thaliana</i> enxertadas aos cinco dias após emergência e transferidas para o solo para análise após quatro semanas de crescimento. As barras mostram o teor de Cd na parte aérea das plantas quando a parte aérea é CS28181 e a raiz Col-0 (28181/Col-0), parte aérea Col-0 e raiz CS28181 (Col-0/28181) além das plântulas não enxertadas (ne) ou auto-enxertadas (ae). West Lafayette-IN, EUA, 2009.	54

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, devido ao uso mais intensivo da industrialização e de práticas agrícolas, aumentou também a liberação na atmosfera de elementos potencialmente tóxicos, dentre os quais se pode destacar o arsênio (As), o cádmio (Cd), o cobre (Cu), o chumbo (Pb), o mercúrio (Hg) e o níquel (Ni), que são definidos como metais pesados (Nriagu, 1979; Nieboer e Richardson, 1980; Nriagu e Pacyna, 1988). Dentre esses metais, destaca-se a presença do Cd como poluidor potencial do ambiente, devido à elevação do nível e do número de áreas contaminadas em todo o mundo. Este metal pesado representa sério risco para a saúde humana e para os organismos vivos em geral, por ser facilmente incorporado à cadeia alimentar.

Para contornar este problema, uma das alternativas é a prospecção de genes que confirmem maior tolerância a fatores abióticos e/ou maior resistência a fatores bióticos. Uma fonte potencial para identificação dos genes de interesse é o estudo de espécies silvestres que ainda não tenham passado pelo processo de melhoramento antrópico. No Estado do Rio Grande do Sul, há grande variedade de espécies silvestres que ainda não foram exploradas pelo homem, com destaque para as pertencentes à família das solanáceas.

A utilização de estratégias de genômica para identificação de genes em espécies de solanáceas silvestres potencialmente envolvidos na absorção, na translocação e no acúmulo de Cd poderá contribuir significativamente para

entendimento dos mecanismos envolvidos nesses processos e para desenvolvimento de genótipos com maior capacidade de absorção e de acúmulo de Cd. Nesse sentido, o sequenciamento genético, concluído no ano de 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), da espécie silvestre *Arabidopsis thaliana*, que é modelo para estudos genéticos, bioquímicos, moleculares e fisiológicos, trouxe novas ferramentas e perspectivas. Atualmente, *A. thaliana* é a espécie de planta vascular mais bem estudada sob os mais diversos aspectos e, assim como outros organismos modelos, pode auxiliar a elucidar mecanismos na planta, contribuir para desenvolvimento de técnicas e facilitar a identificação de genes de interesse. O grande enfoque dos estudos realizados com essa espécie é atribuído a diversos aspectos: pequeno porte, ciclo rápido de desenvolvimento e reprodução autógama, acessibilidade e facilidade de manipulação genética, grande produção de sementes, pequeno tamanho do genoma e ampla conservação de mecanismos fisiológicos, genéticos, bioquímicos e moleculares. Atualmente, o uso desta espécie de planta modelo de transformação genética permite a análise de grande número de genes de interesse com facilidade e rapidez.

Os conhecimentos obtidos em *A. thaliana* também poderão ser aplicados em outras espécies vegetais como, por exemplo, as de interesse agrícola. Assim, esses estudos poderão gerar conhecimento e ferramentas biotecnológicas necessários para desenvolver estratégias para fitorremediação de áreas degradadas ou para produção segura de culturas alimentícias, mesmo quando cultivadas em áreas contaminadas com cádmio. Em consequência, haverá redução na contaminação ambiental e nos custos decorrentes da fitorremediação e garantia de segurança alimentar de famílias que cultivam espécies para produção de alimentos para sobrevivência em áreas contaminadas com metais pesados.

Hipóteses:

As seguintes hipóteses foram testadas no presente trabalho:

1. A família Solanaceae possui espécies de plantas com potencial para hiperacumular Cd na parte aérea, que se constitui em uma estratégia de fitorremediação.
2. A caracterização de uma população silvestre de *Arabidopsis thaliana* quanto ao teor de Cd na parte aérea é uma estratégia eficiente para identificação de genes relacionados à tolerância e ao acúmulo deste metal pesado em plantas, devido à grande variabilidade fenotípica existente e às facilidades que esta espécie possui para estudos moleculares.
3. Genes importantes nos processos de absorção, translocação, acúmulo e detoxificação de Cd em plantas são conservados entre as espécies hiperacumuladoras deste metal, sendo que a expressão desses genes determina maior capacidade das plantas de tolerarem a presença de altas concentrações desse metal no solo e nos tecidos.

Para testar as hipóteses formuladas, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

Objetivo geral

Identificar e caracterizar novas espécies hiperacumuladoras de cádmio dentro da família *Solanaceae* e os genes relacionados à absorção, à translocação e ao acúmulo desse metal em plantas.

Objetivos específicos

- 1 Identificar e caracterizar novas espécies hiperacumuladoras de cádmio na família das solanáceas.

- 2 Identificar e caracterizar genes que contribuam para tolerância de *Arabidopsis thaliana* a cádmio.
- 3 Identificar genes ortólogos a genes de *A. thaliana* relacionados à tolerância de plantas ao Cd em espécies de solanáceas hiperacumuladoras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com a maior industrialização e o manejo mais intensivo de áreas agrícolas aumentou também a liberação de elementos potencialmente tóxicos na biosfera. Um dos elementos que mais causa preocupação pela sua toxicidade aos organismos vivos em geral é o cádmio (Cd). O aumento de áreas contaminadas com este metal pesado tem preocupado a comunidade científica, no sentido de desenvolver técnicas de remediação.

Uma estratégia possível para contornar este problema é o estudo de genes que possam auxiliar nos processos de absorção, translocação e acúmulo de Cd na parte aérea das plantas. Assim, estes elementos tóxicos poderiam ser retirados do ambiente, descontaminando áreas com excesso deste metal pesado ou evitando que o mesmo entre na cadeia alimentar, pelo desenvolvimento de cultivares com capacidade de acúmulo alterada. Algumas espécies de plantas possuem alta capacidade de acumular Cd nos tecidos, sendo denominadas hiperacumuladoras e tem sido usadas como organismos-modelos para estudos de prospecção de genes envolvidos no processo de acúmulo de Cd nos tecidos. Assim, a busca de novas espécies hiperacumuladoras de Cd é muito importante e, neste contexto, as pertencentes à família das solanáceas podem ser uma excelente fonte de novos genes, devido à diversidade de espécies, à capacidade de adaptação a diferentes ambientes e à disponibilidade de recursos moleculares.

Além disto, a possibilidade de realização da análise do ionoma, que é o conjunto de todos os elementos minerais e outros elementos (metais pesados) presentes em um organismo, surge como uma ferramenta importante no processo de identificação de genes relacionados à tolerância de plantas a metais pesados, por possibilitar a caracterização fisiológica de plantas crescidas sob presença e ausência desses elementos.

Dessa forma, o grande desafio é conciliar estes conhecimentos, da melhor maneira possível, pela identificação de novas espécies hiperacumuladoras de Cd e de genes dessas espécies e de espécies modelos, responsáveis pelo seu maior acúmulo em plantas.

2.1 Potencial do estudo de solanáceas silvestres para identificar novas espécies hiperacumuladoras de Cd

A primeira descrição de espécies solanáceas presentes no Estado do Rio Grande do Sul foi feita por Rambo (1961). A partir da década de 1980, outros diversos trabalhos florísticos ou taxonômicos foram realizados sobre essas espécies (Guaranha, 1981 e 1984; Stehmann, 1989 e 1999). Mais recentemente, espécies do gênero *Solanum* nativas desse estado têm sido estudadas mais especificamente (Mentz e Oliveira, 2004; Vignoli-Silva, 2004; Vignoli-Silva e Mentz, 2005).

A maior diversidade de espécies de solanáceas está concentrada na América do Sul (Hunziker, 1979; Purdie et al., 1982) e na América Central (Purdie et al., 1982). Purdie et al. (1982) reconhecem cerca de 90 gêneros e estimam em 2600 o número de espécies de solanáceas, com ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e temperadas, a maioria nativa da América do Sul e da América Central. Em 1991, D'Arcy evidenciou que a maior diversidade de espécies de solanáceas está concentrada na América do Sul, com cerca de 50 gêneros endêmicos.

Estimativas de diversidade de espécies solanáceas, à exceção da monografia de Sendtner (1846) publicada na *Flora brasiliensis* de Martius, são raras. Em um estudo realizado por Mentz (1999) foram descritas para a região Sul do Brasil 87 espécies nativas do gênero *Solanum*.

Essa grande variedade de espécies da família das solanáceas possibilita a identificação de características de interesse agrônomo, como tolerância a altas concentrações de metais pesados no solo como, por exemplo, de Cd. Algumas espécies, como *Solanum nigrum*, já foram descritas como hiperacumuladoras de Cd (Wei et al., 2004, Sun et al., 2007, Ebbs e Sankaran, 2008), o que indica que esta família pode apresentar grande potencial para elucidação de mecanismos envolvidos na acumulação, na translocação e no acúmulo de Cd em plantas.

No Brasil, há muitas espécies nativas de solanáceas que apresentam grande similaridade com *S. nigrum*, dentre elas a *Solanum americanum*. A similaridade entre espécies pertencentes ao gênero *Solanum* é frequentemente referida em estudos etnobotânicos. A maior divergência na classificação taxonômica entre as espécies deste gênero está entre *S. nigrum* e *S. americanum*, sendo a segunda frequentemente descrita como *S. nigrum* (Schilling et al., 1992). *S. americanum* ocorre em toda a região Sul do Brasil e, em especial, no Estado do Rio Grande do Sul. A sua grande similaridade com *S. nigrum* e ampla distribuição, mesmo em áreas degradadas, pode indicar que ela apresente características desejáveis, como maior tolerância à presença de metais pesados no solo.

Sendo assim, pode-se supor que há grande possibilidade de se usar espécies nativas do gênero *Solanum* com objetivo de identificar genes de interesse relacionados à maior tolerância de plantas a metais pesados, como o Cd.

2.2 Fitotoxicidade de Cd

Dentre os metais pesados que estão sendo liberados na biosfera nas últimas décadas, pode-se destacar o arsênico (As), o cádmio (Cd), o cobre (Cu), o chumbo (Pb), o mercúrio (Hg) e o níquel (Ni), que são definidos como metais pesados (Nriagu, 1979; Nieboer e Richardson, 1980; Nriagu e Pacyna, 1988; Senesi et al. 1999). Dentre esses metais, o Cd se destaca como problema potencial no Estado do Rio Grande do Sul, devido ao uso mais intenso de práticas agrícolas e industriais, que podem aumentar o nível e o número de áreas contaminadas.

A contaminação de solos com Cd pode ocorrer a partir de uma grande variedade de atividades humanas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). Devido ao alto teor de Cd, os subprodutos de maior significado como potenciais contaminantes do solo são os resíduos sólidos resultantes da produção de metais não ferrosos e da manufatura de artigos contendo Cd e as cinzas produzidas por incineradores. Além disso, a extração de minérios, como o zinco, tem grande potencial para contaminar solos com Cd, pois estão comumente associados. Algumas práticas agrícolas também são importantes fontes de contaminação como, por exemplo, a aplicação de fertilizantes fosfatados e de lodo de esgoto em lavouras que frequentemente contêm Cd. Segundo a WORLD HEALTH ORGANIZATION (1992), a aplicação destes compostos tem aumentado gradativamente o teor de Cd nestes solos. Solos altamente contaminados com Cd têm sido identificados em diversos países, como China e França, com concentrações superiores a 100 mg kg^{-1} (Kabata-Pendias e Pendias, 2001). Com estes elevados teores no solo, o Cd pode reduzir o crescimento de plantas e causar prejuízos à saúde humana após seu ingresso na cadeia alimentar (Tiryakioglu et al., 2006).

O Cd é um metal pesado encontrado naturalmente no solo em concentrações em torno de $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (Peterson e Alloway, 1979). É altamente tóxico à maioria dos organismos, com toxicidade duas a 20 vezes maior que a de outros metais pesados (Vassilev, 1998). Dessa forma, é considerado um poluente muito perigoso ao ambiente, sendo que essa maior contaminação de solos tem aumentado muito os riscos à saúde humana. O Cd é considerado pela Agency for Toxic Substances & Disease Registry, o quarto elemento mais preocupante atualmente aos organismos vivos em geral, levando em consideração não apenas a sua toxidez, mas o risco de contaminação (ASTDR, 2007). Os outros elementos, na ordem, são Arsênio, Chumbo e Mercúrio.

O efeito fitotóxico de Cd envolve três estágios (Leita et al., 1995). Inicialmente, há um efeito indireto na abertura de estômatos, devido ao aumento do potencial osmótico das folhas. Em seguida, o Cd age diretamente nas células-guarda e causa severa inibição no crescimento de raízes, o que limita a absorção de água e promove o fechamento de estômatos. Finalmente, quando sua concentração na parte aérea da planta se torna alta, há um declínio metabólico, com perda da turgidez foliar e fechamento estomatal hidropassivo. Em termos gerais, consideram-se como tóxicas as concentrações de Cd entre $5\text{-}30 \text{ mg kg}^{-1}$ na massa seca da parte aérea das plantas da maioria das espécies (Kabata-pendias e Pendias, 1985). O Cd afeta ainda a transpiração, o balanço de água e a absorção de nutrientes pelas plantas (Barceló e Poschenrieder, 1990). Além disso, o Cd reduz a atividade das enzimas que atuam no processo da fotossíntese, especialmente as envolvidas no ciclo de Calvin e na biossíntese de clorofila (Vitória et al., 2001).

Assim, o Cd no solo é absorvido pelas plantas, incluindo muitas espécies alimentícias como o trigo, arroz, batata e várias sementes. O Cd é absorvido pelo

corpo, principalmente, através de inalação ou ingestão. Em doses elevadas, o Cd acumula-se no fígado e rins onde se liga a metalotioninas e outras proteínas ligadoras de metais. Cerca de um terço a metade do Cd total em um indivíduo contaminado se acumula nos tecidos dos rins (Nordberg & Nordberg, 2001). A meia vida estimada do Cd nos rins é de uma a quatro décadas (ATSDR, 1999; Diamond et al., 2003). Os rins são um alvo crítico e é o primeiro local onde se visualiza os efeitos tóxicos do Cd no corpo.

Dessa forma, a presença de Cd em solos contaminados tem se tornado um sério risco à saúde humana e aos organismos vivos em geral, por ser facilmente incorporado na cadeia alimentar. Muitas alternativas já foram testadas para remediar áreas contaminadas por Cd, porém elas são, em sua maioria, caras e também causam impacto ao ambiente. Sendo assim, uma alternativa promissora para reduzir os efeitos fitotóxicos do Cd é a fitorremediação.

2.3 Fitorremediação

A fitorremediação é uma tecnologia que utiliza plantas para remover, transformar ou estabilizar contaminantes localizados em água, em sedimentos ou em solo (Peuke & Rennenberg, 2005). Já foram identificadas muitas espécies de plantas com potencial para fitorremediação. A fitorremediação pode ser utilizada de várias maneiras, sendo composta por várias técnicas, com destaque para a fitoextração. A fitoextração utiliza plantas que absorvem metais ou outros contaminantes com objetivo de removê-los do solo, dos sedimentos ou da água. Um processo de fitoextração eficiente tem por objetivo reduzir a concentração do contaminante a níveis aceitáveis do ponto de vista ambiental. Já do ponto de vista econômico, esse objetivo deve ser alcançado a um custo mais baixo que o de uma técnica alternativa ou do custo para manter o solo em pousio, para sua recuperação natural (Robinson et

al., 2003). Comparado a métodos físicos e químicos existentes para remediação de solos contaminados, como o uso de plantas é o que possui o menor custo e causa menor impacto ao ambiente (Cunningham e Berti, 2000). As outras técnicas de remediação podem ser divididas em dois grande grupos: técnicas *in situ*, com o tratamento do contaminante no próprio solo (sem movimentação do solo) e *ex situ*, com a remoção do material contaminado (escavação do solo).

Algumas espécies, conhecidas como hiperacumuladoras, são muito promissoras para cumprir este papel, uma vez que podem acumular nos tecidos das plantas concentrações de metais 50 a 500 vezes superiores em relação às encontradas em plantas de espécies não hiperacumuladoras (Lasat, 2000). A capacidade de concentrar alta quantidade de um dado metal nos tecidos e disponibilidade de um sistema eficiente de translocação do contaminante das raízes para a parte aérea são fatores que garantem às espécies hiperacumuladoras de metais alta capacidade de detoxificação (McGrath e Zhao, 2003).

No entanto, apesar da intensa pesquisa realizada sobre esse tema na última década, poucas alternativas práticas de campo ou comerciais foram desenvolvidas utilizando a fitoextração (Robinson et al., 2006). Muitas das espécies hiperacumuladoras possuem crescimento lento e baixa produção de biomassa, requerendo, dessa forma, vários anos para descontaminar áreas poluídas. Sendo assim, uma alternativa é a utilização de espécies arbóreas, devido ao sistema radicular maior e mais profundo, ao crescimento relativamente rápido e à alta produção de biomassa (Gullner et al., 2001; Pilon-Smits e Pilon, 2002).

A fitoextração é um método simples e de baixo custo para remediação de solos contaminados com metais pesados. No momento, a tecnologia está limitada pelo longo período requerido para remediação, pelo pequeno número de metais que

podem ser potencialmente acumulados em plantas, pela profundidade limitada que pode ser explorada pelas raízes, pela baixa produção de massa seca das plantas das espécies hiperacumuladoras e pela falta de conhecimento agrônomo e genético dessas espécies (Ernst, 2005; McGrath et al., 2006; Robinson et al., 2006). Outra preocupação de se utilizar plantas hiperacumuladoras, é o risco dos metais entrarem na cadeia alimentar, devido à herbivoria por animais que habitam estas áreas contaminadas.

A acumulação de metais pelas plantas só é eficiente se o contaminante for depois removido do solo, através, por exemplo, da colheita da matéria vegetal. Se a maior parte dos metais pesados capturados se localizar na parte aérea das plantas, a colheita poderá ser realizada utilizando os métodos de agricultura tradicionais. Em geral, é necessário colher as plantas antes da queda das folhas ou antes da sua morte e decomposição, de modo a que os contaminantes não se dispersem ou retornem ao solo (Lima e Viegas, 2002).

Depois da colheita, a biomassa deverá ser processada para extração e recolha da maior parte dos metais. Se forem solos com Ni, Zn, Cu ou Co, o valor do metal extraído pode incentivar a remediação. Alternativamente, o volume ou o peso da biomassa podem ser reduzidos por meio de processos térmicos, físicos, químicos ou microbiano (Lima e Viegas, 2002). Segundo estes mesmos autores, no caso da queima das plantas, por exemplo, a energia produzida representa uma valorização econômica do processo e as cinzas podem ser tratadas como um minério, do qual pode ainda ser extraída a contaminação metálica (especialmente, se as cinzas estiverem enriquecidas em apenas um ou dois metais).

Em alguns casos, a remoção é realizada espontaneamente, por volatilização dos metais absorvidos pela vegetação. É o caso, por exemplo, do metalóide selênio,

que se volatiliza em alguns sistemas vegetativos, sob a forma de dimetilselenídeo ($\text{Se}(\text{CH}_3)_2$) e dimetildiselenídeo ($\text{Se}_2(\text{CH}_3)_2$) (Leduc et al., 2004)

A capacidade de fitoextração das plantas pode ser melhorada significativamente por manipulação genética e por tecnologias de transformação de plantas (Raskin, 1996; Pilon-Smits e Pilon, 2002; Van Huysen et al., 2004). A identificação de genes específicos ou diferencialmente expressos em espécies hiperacumuladoras e a sua transferência para espécies de rápido crescimento vem se constituindo em alternativas viáveis e muito eficientes em estudos recentes com plantas transgênicas com capacidade de fitoextração melhorada como, por exemplo, o caso do mercúrio. No caso do mercúrio, a fitovolatilização envolve a introdução do gene bacteriano, reductase do íon mercúrico, que reduz ao metal (Hg), que é volátil à temperatura ambiente, nas plantas (Ellis et al., 2004).

Algumas espécies de plantas silvestres hiperacumuladoras de metais podem acumular doses de 10 a 500 vezes mais elevadas que as espécies culturas de importância agrícola. As espécies de plantas hiperacumuladoras geralmente se desenvolvem em áreas com elevados teores de metais e acumulam esses elementos na parte aérea em altas concentrações (Baker & Brooks, 1989; Kramer & Chardonnens, 2001). A porcentagem de um dado metal na massa seca da parte aérea das plantas de uma dada espécie as classificam como normais e hiperacumuladoras, podendo extrair do solo mais de 100 mg kg^{-1} de Cd, ou mais de 1000 mg kg^{-1} de Ni ou mais de 10000 mg kg^{-1} de Zn (Baker & Brooks, 1989).

Outro fator que é utilizado para definir se uma espécie é hiperacumuladora de metal pesado é o nível crítico de tolerância (NCT). Em geral, em plantas, os valores de NCT para Cd encontram-se na faixa de $5\text{-}30 \text{ mg de Cd kg}^{-1}$ (Kabata-pendias & Pendias, 1985). Nas espécies muito sensíveis, como soja, alfafa, feijão e cevada, o

NCT varia de 5-10 mg kg⁻¹, enquanto naquelas um pouco menos sensíveis, como alface, tomate, nabo, milho e repolho, esse valor situa-se próximo a 50 mg kg⁻¹ (Macnicol & Beckett, 1985). Estes valores são considerados baixos quando comparados aos verificados em algumas espécies hiperacumuladoras de Cd, que podem tolerar concentrações no tecido de até 400 mg kg⁻¹ (*Solanum nigrum*), espécie muito similar a *Solanum americanum* (Sun et al., 2006), que será utilizada no presente estudo, podendo chegar a 2700 mg kg⁻¹ na espécie *Thlaspi caerulescens* (Brooks et al., 1998; Sun et al., 2006). Infelizmente, a taxa de crescimento e a produção de biomassa destas espécies hiperacumuladoras são, em sua maioria, muito baixas, o que limita sua utilização direta na fitoextração de metais pesados. Apesar dessas limitações, as espécies de plantas hiperacumuladoras de metais são organismos modelo altamente atraentes, uma vez que elas superaram os principais entraves fisiológicos que limitavam o acúmulo de metais na massa seca e a tolerância aos mesmos (Salt & Krämer, 2000). Além disso, o estudo dessas espécies pode levar à identificação de genes importantes no processo de hiperacumulação de metais, os quais podem no futuro ser utilizados para aumentar a capacidade fitoextratora de plantas pela grande produção de biomassa.

2.4 Genes relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em plantas

Nos últimos anos, muitos estudos vêm sendo realizados para identificar genes envolvidos no processo de tolerância de plantas a metais pesados. Este processo pode ocorrer por grande variedade de proteínas transportadoras pertencentes a várias famílias, incluindo os transportadores dos tipos ABC, CDF, ZIP, ATPase e Nramp (Williams et al., 2000; Hall & Williams, 2003; Grotz et al., 2006). Este fato pôde ser observado devido a diversos trabalhos envolvendo mutantes com sensibilidade

alterada a metais pesados (Thomine et al., 2000; Andres-Colas et al., 2006; Arrivault et al., 2006) ou organismos heterólogos nos quais os transportadores de plantas foram expressos (Thomine et al., 2000; Desbrosses-Fonrouge et al., 2005; Arrivault et al., 2006). Em alguns casos, os transportadores foram caracterizados em experimentos que mostraram o transporte direto de elementos (Thomine et al., 2000; Voskoboinik et al., 2001; Arrivault et al., 2006).

Em plantas, o transporte de metais pesados não essenciais pode ser consequência acidental da similaridade entre as propriedades iônicas de algum íon essencial e não essencial específico ou ainda pode ocorrer através de algum transportador de grande espectro envolvido na detoxificação de algumas espécies de plantas, sejam estas tolerantes ou hiperacumuladoras de metais pesados de uma maneira geral.

Entre os mecanismos estudados até o momento relacionados à toxidez e à hiperacumulação de Cd em plantas, pode-se destacar os que envolvem uma família de transportadores do tipo P-adenosina trifosfatase (ATPase). Recentemente, Cobbett & Wong (2009) descreveram dois genes membros dessa família (*HMA2* e *HMA4*) como tendo papel central na translocação de Cd das raízes para a parte aérea em *A.thaliana*. Segundo estes autores, membros da subfamília P_{1B} ATPases transportam metais pesados. Existem oito P_{1B} ATPases (ou HMAs) em *A.thaliana*, alguns dos quais transportam Cu (Hirayama et al., 1999; Seigneurin- Berny et al., 2006; Moreno et al., 2008), enquanto outros, incluindo *HMA2* and *HMA4*, são essenciais para homeostase de Zn (Hussain et al., 2004).

Da mesma maneira que as proteínas codificadas pelos genes *HMA2* e *HMA4* transportam Zn, há estudos que comprovam que estes mesmos transportadores também transportam Cd com alta afinidade. O gene *HMA4*, por exemplo, aumenta a

tolerância a Cd quando expresso em levedura (Mills et al., 2003, 2005; Verret et al., 2005). O Zn e o Cd podem induzir a atividade da ATPase de *HMA2* quando este gene é expresso em membranas de vesículas de leveduras (Eren & Arguello, 2004). Plantas transgênicas que superexpressam *HMA4* aumentam a tolerância e o acúmulo de Cd na parte aérea (Verret et al., 2004), enquanto o mutante *hma4* mostrou maior sensibilidade a Cd (Verret et al., 2005). Outros estudos também demonstraram que os genes *HMA2* e *HMA4* são relacionados à maior tolerância e acúmulo de Cd (Courbot et al., 2007; Hanikenne et al., 2008).

Além de *HMA2* e *HMA4*, o subgrupo de transportadores de Zn^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} e Co^{+2} em *A.thaliana* tem potencialmente três membros, incluindo-se o *HMA3*, que difere dos genes *HMA2* e *HMA4* principalmente pelo tamanho da sequência de aminoácidos na região C-terminal da proteína (Argüelo, 2003). Segundo Morel et al. (2009), o gene *HMA3* está envolvido na tolerância de plantas a metais pesados, como o Cd, junto com outros transportadores, como o CAX (Calcium exchangers) e os quelantes, como fitoquelatinas, metalotioninas e ácidos orgânicos (Korenkov et al., 2007a, 2007b; Clemens et al., 2002). Segundo esses autores, o papel do gene *HMA3* é a detoxificação de metais tóxicos pela sua estocagem em vacúolos celulares da raiz. Além disso, a superexpressão de *HMA3* aumenta a tolerância e o acúmulo de Cd, pelo seu sequestro nos vacúolos da parte aérea, sendo essa propriedade importante para uso da fitorremediação (Morel et al., 2009).

Por também estar relacionado à absorção de Cd pelas plantas, outro gene que tem sido objeto de estudo é o IRT1 (transportador regulado por Fe). O IRT1 é uma proteína do tipo ZIP, que atua como transportador de metais em muitos eucariotos (Guerinot, 2000). Membros da família ZIP são conhecidos por transportar Fe, Zn e Mn em bactérias (Grass et al., 2002), em levedura (Zhao & Eide, 1996a, 1996b;

MacDiarmid et al., 2000), em seres humanos (Gaither & Eide, 2000, 2001) e em plantas (Eide et al., 1996; Eckhardt et al., 2001; Vert et al., 2001). Quando expresso em levedura, o gene IRT1 atua nas absorções de Fe (Eide et al., 1996) e de Zn e Mn (Korshunova et al., 1999). O Cd inibe a absorção de Zn e Mn pela ação de IRT1 (Eide et al., 1996), cuja expressão em levedura aumenta a sensibilidade a Cd (Rogers et al., 2000), o que sugere que esse metal pesado também é transportado por esta proteína.

Assim, muitos genes vêm sendo estudados para elucidar os mecanismos utilizados na tolerância e no acúmulo de Cd em tecidos de plantas. Além dos genes descritos, outros genes também já foram identificados como estando relacionados a este processo como, por exemplo, o GSH1 (glutathione sintetase) (Guo et al., 2008), o GR1 (glutathione reductase) (Pilon-Smits et al., 2008), o MTP1 (transportador de metal) (Shahzad et al., 2010), o PCS1 (fitoquelatina sintetase) (Guo et al., 2008), o PDS (fitoeno desaturase) (Lopez et al., 2008) e o SAT (serina acetiltransferase) (Pye et al., 2004), entre outros.

Dessa maneira, como salientado anteriormente, uma estratégia eficiente para identificar genes relacionados à tolerância de plantas a metais pesados é o estudo das relações existentes entre a absorção dos diferentes íons pelas plantas e como os metais pesados afetam essa absorção. Assim, o estudo do ionoma de plantas torna-se uma ferramenta essencial para facilitar a identificação destes genes.

2.5 Ionoma de plantas

Sistemas vivos são apoiados e sustentados pelo genoma pela ação do transcriptoma, do proteoma, do metaboloma e do ionoma. Esses são considerados os quatro pilares bioquímicos básicos da genômica funcional, e representam, respectivamente, a soma de todos os genes expressos, proteínas, metabólitos e

elementos de um organismo (Salt et al., 2008). A resposta dinâmica e a interação desses “omas” bioquímicos definem como um sistema vivo funciona, sendo que atualmente seu estudo constitui-se em um dos maiores desafios nas ciências da vida (Salt, 2004).

Estudos sobre ligações funcionais entre genoma e transcriptoma (Martzivanou & Hampp, 2003; Becher et al., 2004; Leonhardt et al., 2004), entre genoma e proteoma (Koller et al., 2002) e entre genoma e metaboloma (Fiehn et al., 2000) estão bem avançados. Em contraste, o estudo do ionoma está apenas começando, sendo desconhecida a maioria dos genes envolvidos em sua regulação. Além disso, por estar envolvido em um amplo espectro de fenômenos biológicos, incluindo a eletrofisiologia, a sinalização, a enzimologia, a osmorregulação e os transportes, o estudo do ionoma apresenta grande potencial para se obter novas e importantes descobertas científicas (Salt et al., 2008).

O ionoma foi descrito pela primeira vez como o conjunto de todos os metais, metalóides e não-metais presentes em um organismo (Lahner et al., 2003), estendendo o termo metaloma (Outten & O'Halloran, 2001; Williams, 2001; Szpunar, 2004) para incluir não-metais importantes, como nitrogênio, fósforo, enxofre, selênio, cloro e iodo. O ionoma, o metaboloma e o proteoma se sobrepõem. Compostos não-metais contendo fósforo, enxofre ou nitrogênio, por exemplo, enquadram-se tanto no ionoma quanto no metaboloma. Em metaloproteínas, metais como zinco, cobre, manganês e ferro seriam estudadas dentro do proteoma ou da metaloproteoma como foram descritas (Szpunar, 2004).

Assim, a análise do ionoma é uma ferramenta importante para identificar, entre outros aspectos, genes que contribuam para maior ou menor acúmulo de elementos, como os metais pesados, pois constitui-se em um mecanismo muito

preciso para avaliação do perfil de ions presentes em um tecido. O conhecimento do ionoma, aliado ao uso de técnicas de biologia molecular, formam um sistema muito eficiente para mapeamento gênico, para estudos de genômica funcional e para caracterização geral do estado fisiológico das plantas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em três etapas. A primeira etapa consistiu da caracterização das respostas fisiológicas e morfológicas de uma espécie silvestre de solanácea, *Solanum americanum*, e de uma espécie de tomate (*Solanum lycopersicum*), cv. Micro-Tom, submetidas a diferentes doses de Cd no substrato. Foram realizados ensaios biológicos para testar a tolerância dessas espécies a esse metal pesado. Ainda nesta primeira etapa, testou-se a cultivar de tomate Gaúcho, utilizada comercialmente por produtores, quanto ao acúmulo de Cd na parte aérea. A segunda etapa da pesquisa consistiu da caracterização de 360 acessos de *Arabidopsis thaliana* submetidos ao Cd, selecionando-se aqueles com capacidade alterada de absorção, translocação e acúmulo de metais pesados e realizando-se o posterior mapeamento de genes envolvidos nestes fenótipos diferenciados. Para caracterização dos acessos de *A.thaliana* e do tomate cv. Micro-Tom procedeu-se a análise do ionoma dessas espécies submetidas ao Cd. Na terceira etapa, após caracterização e identificação de genes relacionados à tolerância ao Cd em *A.thaliana*, extrapolou-se o conhecimento gerado para a espécie hiperacumuladora tomate cv. Micro-Tom, pela busca de genes ortólogos e pela análise de sua expressão sob condições de ausência e presença de Cd no substrato.

A apresentação do material e métodos será realizada por espécie estudada (*Solanum americanum*, tomate e *Arabidopsis thaliana*).

3.1 Resposta de *Solanum americanum* a doses de Cd no substrato

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de plantas de *Solanum americanum* a doses de Cd no substrato, em termos de crescimento da planta e de absorção, translocação e acúmulo desse metal pesado nos tecidos.

3.1.1 Caracterização fisiológica de *Solanum americanum* em função de doses de Cd no substrato

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento, em vasos de dois litros de capacidade, no Departamento de Fitossanidade, da Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre-RS. A temperatura do ar durante o período experimental (semeadura a 60 dias após a emergência) foi de 25°C e o fotoperíodo de 16 horas de luz, com 8 horas de escuro (90 mmol m⁻² s⁻² de intensidade de luz).

Os tratamentos constaram de uma testemunha sem adição de Cd e da adição de quatro doses desse metal (4, 8 e 16 e 32 mg de Cd kg⁻¹ de substrato) no substrato. A adição do Cd ao substrato foi realizada em uma única vez antes da semeadura das espécies. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completamente casualizados, com quatro repetições. A fonte de Cd utilizada foi o CdCl₂.1H₂O. Utilizou-se vermiculita como substrato, sendo a contaminação realizada pela diluição das doses utilizadas do metal em solução nutritiva e sua homogeneização no substrato. Após a colocação do substrato nos vasos, realizou-se a semeadura de sementes (4 covas com duas sementes por cova) de *S. americanum*, com ajuste da densidade final para quatro plantas por vaso.

As plantas foram coletadas aos 60 dias após a emergência. Durante o período experimental, a disponibilidade de água foi mantida sempre próxima à capacidade de campo pela adição semanal de solução nutritiva. Na ocasião da coleta, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes. O material foi lavado intensamente,

primeiro com água corrente e após com água destilada, seco em estufa a 100°C por 10 minutos e, após, a 70°C até secar por completo.

As determinações realizadas foram estatura de planta, massa seca da parte aérea e das raízes, teor relativo de clorofila na folha (TRC), teor de Cd na parte aérea e nas raízes, segundo a metodologia de abertura por digestão úmida nítrico-perclórica e análise por espectrofotometria de plasma (ICP-OES) no Laboratório de Análises de Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e cálculo dos fatores de translocação e bioacumulação e da taxa de extração de metal (TEM).

O TRC foi medido por ocasião da coleta das plantas com clorofilômetro manual, modelo Minolta SPAD-502, nas cinco últimas folhas expandidas das quatro plantas de cada unidade experimental. Foram realizadas duas leituras por folha em pontos situados na metade a dois terços do seu comprimento, a partir da base e a dois centímetros da sua margem.

3.1.2 Fatores de translocação e de bioacumulação e taxa de extração de cádmio

O fator de translocação pode ser definido como a capacidade da planta em translocar o metal das raízes para a parte aérea, enquanto o fator de bioacumulação é a relação entre os teores de metal na parte aérea e no solo. Já a taxa de extração do metal pode ser definida como a capacidade da planta em extrair o metal do solo durante seu ciclo de desenvolvimento. Esses parâmetros foram calculados segundo as fórmulas a seguir (Sun et al., 2007):

Fator de translocação = teor de Cd na parte aérea / teor de Cd nas raízes

Fator de bioacumulação = teor de Cd na parte aérea / teor de Cd no solo

TEM (Taxa de extração do metal) = teor de Cd na parte aérea x (massa seca da parte aérea / teor de Cd no solo) x peso do volume de solo explorado pelas raízes (estimado) x 100

3.1.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância. A magnitude do efeito dos tratamentos frente ao erro experimental foi testada pelo teste F. O efeito de doses de Cd sobre os parâmetros analisados foi estimado pela análise de regressão.

3.2 Resposta de *Solanum lycopersicum* a doses de Cd no substrato

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Micro-Tom a doses de Cd no substrato, em termos de crescimento e de absorção, translocação e acúmulo de Cd nos tecidos. Já na cultivar de tomate Gaúcho foi avaliado o acúmulo de Cd na parte aérea.

3.2.1 Caracterização fisiológica de plantas de tomate em função de doses de Cd no substrato

O local de realização do experimento, as condições de crescimento das plantas, o substrato e a fonte de Cd utilizados, os parâmetros determinados e seus métodos de análise e a análise estatística foram similares às descritas no item 3.1.1.

Neste estudo, foram utilizadas duas cultivares de tomate, Gaúcho e Micro-Tom. A primeira é uma cultivar comercial utilizada por produtores e a segunda foi inicialmente desenvolvida para fins ornamentais, pelo cruzamento das cultivares Florida Basket e Ohio 4013-3, apresentando baixa estatura de planta, mas com produção de frutos viáveis (Scott & Harbaugh, 1989). A baixa estatura de planta, o rápido crescimento (ciclo completo com 70 a 90 dias) e a fácil transformação genética (Sun et al., 2006) têm determinado o intenso uso dessa espécie como

organismo modelo de estudos genéticos e moleculares (Meissner et al., 1997; EyaL & Levy, 2002). As plantas das duas cultivares de tomate foram coletadas aos 60 dias após a emergência, sendo que neste momento a cv. Gaúcho estava ainda na fase vegetativa e a cv. Micro-Tom encontrava-se no estágio de frutos maduros. Os tratamentos constaram de uma testemunha sem Cd e da adição de três doses deste metal (5, 25 e 125 mg kg⁻¹) no substrato.

Em uma segunda etapa desse experimento, realizada na Universidade de Purdue, localizada na cidade de West Lafayette-IN, EUA, utilizou-se o tomate cv. Micro-Tom para obtenção de uma curva de absorção de Cd ao longo de seu ciclo. O teor de Cd nos tecidos foi medido pelo equipamento denominado ICP-MS (espectômetro de massa por ionização acoplada por plasma). Com utilização do ICP-MS também foi possível obter o perfil ionômico completo das plantas, na presença e na ausência de Cd. As plantas utilizadas nessa análise foram crescidas em condições controladas de ambiente, com 8 horas de luz e 16 horas de escuro (90 mmol m⁻² s⁻² de intensidade de luz) e temperatura de 25°C. Após a semeadura das sementes (duas por cova) e a sua germinação, foi realizado desbaste, corrigindo-se a densidade para uma planta por vaso. A dose de Cd utilizada neste experimento foi de 50 mg kg⁻¹ de substrato e o modo de contaminação do substrato utilizado (vermiculita) foi o mesmo descrito no item 3.2.1. As plantas foram regadas semanalmente com solução nutritiva 0,25X Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), adicionada sempre na base dos vasos. A partir da emergência, as plantas foram coletadas semanalmente para análise do perfil ionômico até o início da frutificação. Após esta fase, as plantas foram coletadas novamente apenas quando os frutos se apresentavam maduros.

Na ocasião das coletas, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes, lavadas em água destilada, secas em estufa a 65°C por cinco dias, pesadas, maceradas

e homogeneizadas. Retirou-se uma amostra de 2 a 4 mg, que foi colocada em tubo de digestão Pirex. Nesses tubos, as amostras foram secas a 92°C por mais 20 horas para análise de 18 elementos. A seguir, as amostras foram resfriadas e digeridas com 0,7 ml de ácido nítrico concentrado (OmniTrace; VWR Scientific Products; <http://www.vwr.com>) e diluídas para 6 mL com água destilada. As análises foram realizadas por ICP-MS (Elan DRCe; PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com>) para Li, B, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo e Cd. Todas as amostras foram normalizadas por seus pesos pré-digestão.

3.2.2 Identificação de genes ortólogos relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em tomate cv. Micro-Tom e análise de expressão gênica por RT-qPCR

Para realização desta análise, o RNA das plantas foi coletado uma semana após a emergência, para análise de expressão de alguns genes específicos. As plantas crescidas com e sem Cd foram coletadas, separadas em raízes e parte aérea, lavadas em água destilada, enroladas em papel alumínio, colocadas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até a extração do RNA. Para essa extração foi utilizado o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen), segundo a metodologia descrita pelo fabricante. As plantas foram maceradas sempre em nitrogênio líquido, para evitar o descongelamento do tecido. Após extração, os RNAs foram quantificados. A síntese do cDNA (Fita de DNA sintetizada a partir do RNA mensageiro) foi realizada utilizando-se o kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). O cDNA produzido foi utilizado para análise de expressão gênica por RT-qPCR.

A expressão gênica em plantas de tomate cv. Micro-Tom crescidas na presença e na ausência de Cd foi determinada pelo método de quantificação relativa por PCR em tempo real. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram

GAPDH-F e GAPDH-R (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (Shih et al., 1991), para controle endógeno, e *HMA2-F* e *HMA2-R* (Transportador de metal pesado do tipo ATPase) (Eren & Argüello, 2004), *HMA3-F* e *HMA3-R* (Transportador de metal pesado do tipo ATPase) (Cobbetc & Wong, 2009) e *IRT1-F* e *IRT1-R* (Transportador de metal regulado por Ferro) (Guerinot et al., 2002), primers para genes descritos na literatura como estando relacionados a absorção, translocação, acúmulo e detoxificação de Cd em plantas (Tabela 1). Estes genes foram selecionados para análise de expressão baseados nos resultados obtidos em *A.thaliana* descritos no item 4.3. Além destes, outros genes envolvidos no processo de tolerância de plantas ao Cd foram selecionados para identificação de ortólogos em tomate Cv. Micro-Tom e os seus primers encontram-se descritos na Tabela 1. Estes genes são os seguintes: *GSH1* (Glutathione sintetase), *GRI* (Glutathione redutase), *HMA1* e *HMA4* (Transportadores de metal pesado do tipo ATPase), *MTP1* (Transportador de metal), *PCSI* (Fitoquelatina sintetase), *PDS* (Fitoeno desaturase) e *SAT* (Serina acetiltransferase). Os genes foram selecionados *in silico*, sendo os primers desenhados, sempre que possível, baseados em regiões conservadas dos genes alinhando-se a sequência do maior número de espécies possíveis onde o gene em questão tenha sido identificado.

Para identificação dos genes ortólogos e para análise da especificidade de reação para RT-qPCR foi utilizada a metodologia descrita a seguir. O DNA foi extraído pelo método CTAB, adaptado de Murray & Thompson (1980), a partir de folhas de plantas de tomate Cv. Micro-Tom. Cerca de 100 mg de tecido vegetal foi coletado e triturado na presença de N₂ líquido em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL). Em seguida, foram adicionados 750 µL de tampão de extração CTAB (CTAB, 55 mM; Tris, 100 mM pH 8,0; EDTA, 10 mM; NaCl, 0,7 M) e 15 µL de 2-mercaptoetanol. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 2 min, incubada a

65 °C durante 15 min e, posteriormente, acrescentados 520 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v:v). A mistura foi novamente homogeneizada vigorosamente por 1 min e centrifugada por 10 min a 18.400 x g em temperatura ambiente. A fase líquida sobrenadante foi transferida para um novo tubo, sendo adicionado igual volume de isopropanol (500 µL) e 50 % do volume de acetato de amônio 7,5 M (250 µL). Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 18.400 x g em temperatura ambiente. A fase sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70 % por duas vezes, centrifugado por 5 minutos a 18.400 x g, seco a 65 °C e solubilizado em 100 µL de H₂O ultrapura. O material extraído foi armazenado a – 20 °C.

O DNA extraído foi submetido a PCR com utilização dos pares de oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1. A PCR foi realizada em um volume final de 20 µl, contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 25 mM KCl; 2,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen); 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). A reação foi realizada no termociclador PTC-100TM (MJ Research) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C (2 min), seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C (30 s), pareamento a 58 °C (30 s) e extensão a 72°C (60 s) e uma etapa final de extensão a 72 °C durante cinco minutos. O tamanho dos fragmentos foi estimado pela análise do perfil eletroforético visualizado em gel de agarose 2 % (TBE 1x) com auxílio do marcador de massa molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado pelo sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

A especificidade das condições aplicadas ao RT-qPCR foi verificada pelo gel de agarose, conforme condições descritas acima, e pela curva de dissociação

realizada após a reação de amplificação de acordo com as seguintes condições: 95 °C (15 s), 60 °C (1 min), 95 °C (15 s) e 60 °C (15 s). As amostras para realização da PCR consistiram de 5 µL de cDNA diluído (20 vezes), obtido conforme descrito anteriormente. A reação da qPCR foi realizada com mix Platinum® Sybr® Green qPCR – UDG com ROX (Invitrogen), sendo a concentração final dos oligonucleotídeos iniciadores de 0,2 µM. A reação foi executada em um sistema de detecção de seqüências modelo 7500 Applied Biosystems.

As condições de termociclagem consistiram de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C. O sinal verde fluorescente do fluoróforo SYBR foi normalizado por um marcador de referência passiva (corante ROX) incluído no mix da Invitrogen. O limiar de fluorescência foi estabelecido no início da curva, representando a taxa de amplificação do amplicon. O número de ciclos pelo qual a fluorescência passou o limiar (CT) para cada reação, foi calculado pelo programa “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem) e posteriormente exportados para planilhas do programa “Microsoft Excel” para análise. O nível de expressão de cada amostra de cDNA foi obtido pela normalização com um gene endógeno Gapdh (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, Shih *et al.*, 1991). Os níveis de quantificação relativa do transcrito pelo gene de referência (ΔCT) foram determinados pela subtração do CT do gene endógeno pelo CT do gene alvo pela função $\Delta CT = CT (\text{gene alvo}) - CT (\text{gene endógeno})$. Para comparar níveis de expressão entre plantas crescidas com e sem Cd com o calibrador (plantas de tomate sem Cd na parte aérea ou nas raízes dependendo da parte da planta analisada), a função $\Delta\Delta CT$ foi primeiramente determinada usando a equação $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{com Cd}) - \Delta CT (\text{controle})$ (Livak & Schmittgen, 2001).

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e RT-qPCR na direção 5' a 3'.

	Direto (5' a 3')	Reverso (3' a 5')	Espécies alinhadas para desenho dos primers e número de acesso no GenBank
GAPDH*-F/R	CTGCTCTCTCAGTAGCCAACAC	CTTCCTCCAATAGCAGAGGTTT	Tomate (U_97257)
SAT-F/R	TGTTTTGATTGGTGTGGAA	TTGGATTCTCCCTCCCTCCT	Tomate (NC_004578.1)
PDS-F/R	CAGTCTGACTTGGCCACCCT	TTGACGGTGGCTTCCACAA	Tomate (EF_650011.1)
PCS1-F/R	AAGGGATCTCCTTTGGGAAA	TTTTGATCGCATTGAACAGG	<i>A.thaliana</i> (NM_123774.3), fumo (AY_235426.1), batata (AJ_548472.1) e <i>Nicotiana glauca</i> (EU_247758.1)
MTP1-F/R	CTCTCTGACGTTGCTGCCTT	CCATGACTRTGACCATGATC	<i>A.thaliana</i> (AK_317164.1), <i>Thlaspi ceamulescense</i> (AY_483146.1), <i>Brassica juncea</i> (AY_483149.1), <i>Thlaspi arvense</i> (AY4_83145.1) e <i>Thlaspi goeigenense</i> (AY_560017.1)
HMA4-F/R	AGCTTAGCCATTTTCGCAAC	TGGGCTGGAACCAATTAATCT	<i>A.thaliana</i> (NM_127468.4) e <i>Thlaspi ceamulescense</i> (AY_486001.1)
HMA3-F/R	GGAAATCCAAA CTGCAATGCT	GTGCA TCGTTAAGCCCATCT	<i>A.thaliana</i> (NM_119158.3)
HMA2-F/R	GTTCCGTCAAGAACCCTCAT	GAGAAGTATGCCGGAAACCA	<i>A.thaliana</i> (NM_119157.3)
HMA1-F/R	CAACTGCCATCAGTGTGT	TTGCTTTGCACATGAACTCC	<i>A.thaliana</i> (NM_119890) e batata (AM_231415.1)
GRI-F/R	CGTGGTTGTGTGCCTAAAA	GCAATCAATATGTGCTTTGC	<i>A.thaliana</i> (NM_113322.4) e arroz (D_78136.1)
GSH1-F/R	GCCGAA TGGGAGATATGAGA	CAAGACCAGCACGGAACTTT	<i>A.thaliana</i> (NM_118439.3), fumo (DQ_444219.2) e tomate (AF_017983.1)
IRT1-F/R	TGAAAGCAAAGTGCAGCAAC	GACGGAGTTGAAGGCACTAAA	<i>A.thaliana</i> (NM_179215), fumo (AB_263746.1), <i>Thlaspi ceamulescense</i> (AM_293351.1) e tomate (AF_136579.1)

*IRT1 (Transportador de metal regulado por Ferro), *GSH1* (Glutationa sintetase), *GRI* (Glutationa reductase), *HMA1*, *HMA2*, *HMA3* e *HMA4* (Transportadores de metal pesado do tipo ATPase), *MTP1* (Transportador de metal), *PCS1* (Fitoquelatina sintetase), *PDS* (Fitoeno desaturase), *SAT* (Serina acetiltransferase) e *GAPDH* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

3.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância, utilizando-se o delineamento de blocos completamente casualizados, com 4 repetições. A magnitude do efeito dos tratamentos frente ao erro experimental foi testada pelo teste F. Tanto o efeito de doses de Cd sobre os parâmetros analisados quanto o efeito da época de coleta sobre a dose de Cd, na curva de absorção desse metal, foram estimados pela análise de regressão. A comparação do efeito do Cd sobre a expressão dos genes *HMA2* e *HMA3* foi feita pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3.3 Prospecção de genes relacionados a absorção, translocação e acúmulo de Cd em *Arabidopsis thaliana*

O objetivo desse estudo foi selecionar e caracterizar acessos de *Arabidopsis thaliana* quanto à capacidade de acumular Cd na parte aérea e identificar genes relacionados a esta característica.

3.3.1 Caracterização e seleção de um acesso de *Arabidopsis thaliana* para acúmulo de Cd na parte aérea

Inicialmente realizou-se a caracterização de uma população de acessos de *Arabidopsis thaliana* coletados em vários lugares do mundo, quanto à sua capacidade de acúmulo de Cd na parte aérea. Esta caracterização foi realizada pelo perfil ionômico, segundo metodologia descrita no item 3.3.1.1. Foi realizada a caracterização do perfil ionômico de 360 acessos de *A.thaliana* na Universidade de Purdue, tendo sido selecionado um acesso baseado em sua capacidade de acumular Cd diferencialmente do controle utilizado, o ecótipo Col-0. Após esta etapa, foi

realizado cruzamento entre o acesso selecionado CS28181 (baixo teor de Cd) (masculino) e o Col-0 (alto teor de Cd) (feminino). Quando em F2, foi aplicada a técnica de microarray de DNA baseada em *bulked segregant analysis* (BSA).

3.3.2 Microarray de DNA baseado em BSA

O microarray baseado em BSA foi realizado como descrito anteriormente em outros trabalhos (Borevitz et al., 2003; Hazen et al., 2005). Resumidamente, foram identificados Single Feature Polymorphisms (SFP) entre Col-0-0 e CS28181, hibridizando-se o DNA marcado de cada acesso ao microarray Affymetrix ATH1 e comparando-os com as hibridizações previamente realizadas com Col-0, que podem ser baixadas no site <http://www.Xam.naturalvariation.org/>.

Dois *pools* de DNA genômico foram extraídos a partir de uma população F2 de um cruzamento entre CS28181 e Col-0, que foi hibridizado em microarray separadamente. Para formação de cada *pool*, as plantas foram selecionadas quanto ao seu teor de Cd na parte aérea. Assim, os dois *pools* formados apresentaram teores de Cd na parte aérea contrastantes. Um *pool* apresentou fenótipo similar ao controle Col-0 (Alto Cd) e o outro apresentou o fenótipo do acesso CS28181 (Baixo Cd). Para cada *pool* foram selecionadas 40 plantas. No *locus* ligado ao fenótipo de baixo Cd, os *pools* deveriam possuir quantidades equivalentes de cada genótipo e o sinal de hibridização de cada SFP seria intermediário entre os pais (CS28181 e Col-0), sendo a diferença média entre os dois microarrays de DNA igual a zero. No *locus* ligado à característica em questão, a diferença entre os dois grupos de DNA deve ser de, aproximadamente, dois terços da diferença entre os acessos parentais. Por suavização do sinal através de múltiplos SFPs, o ruído é reduzido, sendo que o pico das diferenças no sinal da hibridização corresponderá à região cromossômica do *locus* controlador da característica baixo Cd. Após identificação da região do genoma que

controla este fenótipo, realizou-se o mapeamento direcionado pelos primers selecionados baseados em SNP (Single Nucleotide Polymorphism), para identificação dos genes possivelmente relacionados.

3.3.3 Análise de expressão gênica de *HMA2* e *HMA3* por RT-qPCR

A coleta de plantas de *A.thaliana*, a extração do RNA, a síntese do cDNA e as metodologias e os cálculos aplicados ao RT-qPCR foram realizados conforme descrito no item 3.3.2.

A expressão gênica em plantas de *A.thaliana* Col-0 e CS28181 foi determinada pelo método de quantificação relativa por PCR em tempo real nas raízes e na parte aérea. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram GAPDH-F (GAAATGCATCTTGCACTACCAACTGTCTTGC) e GAPDH-R (CTGTGAGTAACCCCATTCATTATCATAACCAAGC) (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (Shih *et al.*, 1991), para controle endógeno, e *HMA2*-F (GTTCCGTCAAGAACCGTCA) e *HMA2*-R (GAGAAGTATGCCGGAAACCA) (Transportador de metal pesado do tipo ATPase) (Eren & Argüello, 2004), *HMA3*-F (GGAATCCAACTGCAATGCT) e *HMA3*-R (GTGCATCGTTAAGCCCATCT) (Transportador de metal pesado do tipo ATPase) (Cobbetc & Wong, 2009).

3.3.4 Enxertia de *Arabidopsis thaliana*

A enxertia realizada em *A.thaliana* teve por objetivo identificar qual parte da planta, raízes ou parte aérea, estaria relacionada ao fenótipo de baixo Cd demonstrado pelo acesso CS28181. Para tanto, essa técnica foi realizada em plântulas de *A.thaliana* como descrito anteriormente (Rus et al., 2006).

Primeiramente foram preparadas 30 placas com meio ½ MS (12g/L de ágar) enriquecido com vitaminas, 3ppm de Benomil (adicionado após a

autoclavagem), 0,04ppm de 6-benzilaminopurina e 0,02ppm de ácido indol acético. Após secagem completa das placas, as sementes esterilizadas e com a dormência quebrada (3 dias em meio 0,01% de ágar, no escuro a 4°C) foram plaqueadas. As placas foram marcadas com uma linha divisória ao meio. Foram plaqueadas com o auxílio de uma ponteira P1000 (ponta cortada) 15 sementes de cada acesso de *A.thaliana*, cada uma no seu respectivo lado da placa. As placas foram colocadas na vertical, em câmara de crescimento a 25°C, fotoperíodo de 16 horas de luz, sob baixa humidade para remover toda a água que puder se acumular na superfície da placa por 11 dias (nas primeiras 24 horas pode-se cobrir as placas com o objetivo de se alongar o hipocótilo). A enxertia foi realizada no quinto dia de crescimento das plântulas com o auxílio de uma lâmina afiada de 5 mm. As plântulas a serem enxertadas foram selecionadas por apresentarem diâmetro de hipocótilo e estágio de desenvolvimento similares. O corte do hipocótilo foi realizado com um movimento suave, com ângulo de 45°, pressionando a lâmina para baixo e para frente, sempre buscando uma superfície de corte de 90°. Isto facilita a ligação entre hipocótilos posteriormente. Após o corte, move-se, com o uso da própria lâmina, a parte aérea para uma região próxima da plântula do outro acesso de *A.thaliana* (já cortada) a qual vai ser enxertada com esta nova parte aérea e irá ceder a parte aérea para a enxertia na plântula cortada anteriormente. Após, colocou-se em contato as superfícies cortadas que são atraídas quase como uma ímã. Sempre moveu-se a parte aérea, nunca as raízes. Como resultado, obteve-se dois novos indivíduos: A/B e B/A. Após a enxertia, as placas foram seladas com fita micropore, identificadas, e recolocadas na mesma posição (vertical) na câmara de crescimento sob as mesmas condições por mais seis dias. Após este período, as plântulas que apresentarem boa união da região enxertada foram transferidas para o solo saturado com água, descartando-se aquelas

que apresentavam raízes adventícias. As plantas foram adaptadas por uma semana em fotoperíodo de dias curtos e após foram transferidas para as condições ambientais.

As plântulas foram colhidas para análise do teor de Cd quatro semanas após a transferência para o solo. A região enxertada foi analisada sob lupa para identificar eventuais formações de raízes adventícias nos indivíduos enxertados. Indivíduos com raízes adventícias emergentes da região enxertada ou acima da mesma foram eliminados das análises subsequentes.

3.3.5 Clonagem e sequenciamento de DNA genômico dos genes *HMA2* e *HMA3*

O DNA genômico de *HMA2* e *HMA3* foi isolado a partir de plantas de *A.thaliana* (CS28181) aos 10 dias após a emergência usando o kit Dneasy Plant Mini (Qiagen Valencia, CA). Devido ao grande tamanho dos genes *HMA2* e *HMA3* foi utilizado para desenho dos primers um programa que divide a sequência do gene em fragmentos menores para tornar possível o sequenciamento (programa disponível no site http://www-fgg.eur.nl/kgen/primer/Overlapping_Primers.html). Os nove fragmentos de DNA amplificados, contendo aproximadamente 1 kb foram amplificados de uma região cerca de 0,250 kb à montante e 0,250 kb à jusante da ORF (Open reading frame). Os diferentes primers utilizados encontram-se descritos na Tabela 2.

As condições utilizadas em todas as reações de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C, seguida por 30 ciclos de 94°C 30 seg, 50°C 40 seg, 72°C 1 min 30 sec e extensão final a 72°C por 10 min. Após confirmação da amplificação em gel de agarose 1%, os fragmentos foram seqüenciados, sendo as seqüências analisadas pelo programa DNASTAR (www.dnastar.com).

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e RT-qPCR nas direções 5' a 3' e 3' a 5'.

	Direto (5' a 3')	Reverso (3' a 5')
<i>HMA2-1</i> F/R	GGTTTGGCAATCTTTGGTTG	GTGAGTAACGCGAGAAGTCG
<i>HMA2-2</i> F/R	AAATCACTAAATCGCAAGCAGAC	GGTAGGCTGCTGCTTCTTTC
<i>HMA2-3</i> F/R	GGCAGTCCGACAAATAATATCG	ATTAAGGGGTGCATGTAACG
<i>HMA2-4</i> F/R	ATTGCGATGAATGTAGAACG	GGAGAAGTATGCCGAAACC
<i>HMA2-5</i> F/R	CGTAACGCATCACATTTAC	CTCCAGTCTCTGCAATCACG
<i>HMA2-6</i> F/R	TGTTCACAATCGCTGAATGG	CTGCCTTTGTGAGTGACACG
<i>HMA2-7</i> F/R	TTTGTGGCTATCCCATTTGC	CATGGCTTGAGCTACACCAG
<i>HMA2-8</i> F/R	TCTGATGGTTCTTTGCTTTGG	GTCCGAAGTGGCTTTAGCTG
<i>HMA2-9</i> F/R	ACTTGAAGGTGATGCTGCTG	AATGGGGTTGGGAAGATTTG
<i>HMA3-1</i> F/R	AAAGTGGTCAAGTGGATGTG	TTGGAAGTGGAAACATTACGC
<i>HMA3-2</i> F/R	AGCAATCCTTGTTGTTGTC	GAAGATTGGGTCCCCTTCAG
<i>HMA3-3</i> F/R	GAATTAATATTTGAGTACCTAAGTCG	TAGAAGTGGGCTTGTTGCAG
<i>HMA3-4</i> F/R	ATAACACGGGTCCCTCTCTG	ACATGGGAGCAAACTGACC
<i>HMA3-5</i> F/R	GGCAATAGCTCTGCTTCACC	AGCATGTTTTGCGGTAATCC
<i>HMA3-6</i> F/R	GGCTGCCTTAGTGAGAGCAC	CTCAGTTGCAGATTGGCTTG
<i>HMA3-7</i> F/R	GGCGCTAAGCTCATCAGTG	TTGGAATCTGCTGTTTCATCG
<i>HMA3-8</i> F/R	CGAAAGTCAAAACGTCGATTG	AATGGAACTGCGGTCAGAG
<i>HMA3-9</i> F/R	GAGCCTATGGGCCATAACA	TTTTATAGCTGCGTGGGAC

3.3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Quando houve significância, a comparação entre médias foi feita pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

Neste ítem, serão apresentados os resultados relativos à caracterização morfológica e fisiológica de uma espécie silvestre de solanácea, *Solanum americanum*, e de uma espécie de tomate (*Solanum lycopersicum*), cv. Micro-Tom, em função de doses de Cd no substrato. Especificamente na cultivar de tomate Gaúcho, serão apresentados apenas os resultados referentes ao acúmulo de Cd na parte aérea. Em sequência, serão descritos os resultados obtidos na espécie *Arabidopsis thaliana* referentes à identificação e à caracterização de genes relacionados à sua tolerância a Cd. Por fim, serão apresentados os resultados obtidos em *A.thaliana* que foram extrapolados para a espécie hiperacumuladora de tomate, cv.Micro-Tom, pela busca de genes ortólogos e a sua análise de expressão sob condições de ausência e presença de Cd no substrato.

A apresentação dos resultados será realizada pela ordem da espécie estudada (*Solanum americanum*, *Solanum lycopersicum* e *Arabidopsis thaliana*).

4.1 Resposta de *Solanum americanum* a doses de Cd no substrato

A resposta dessa espécie a doses de Cd foi avaliada pelos seguintes parâmetros: teor relativo de clorofila na folha, massa seca da parte aérea e de raízes, teores de Cd na parte aérea e nas raízes, fatores de bioacumulação e de translocação e taxa de extração de Cd.

4.1.1 Efeito de Cd nas plantas

Até o período de 60 dias após a emergência, as plantas de *Solanum americanum* sobreviveram em substrato com doses de Cd de até 32 mg kg⁻¹ de substrato (Figura 1). No entanto, pela análise de alguns parâmetros, como teor relativo de clorofila na folha (TRC) e massa seca da parte aérea e de raízes, foram observados sintomas de toxicidade já com a aplicação das menores doses de Cd.

O TRC reduziu-se de forma quadrática com incremento da dose de Cd no substrato (Figura 1A). Até a dose de 16 mg kg⁻¹, os valores desse parâmetro não se alteraram significativamente. Já com aplicação de doses superiores a 16 mg kg⁻¹ houve redução significativa nos valores desse parâmetro, o que coincidiu com a avaliação visual de amarelecimento de folhas.

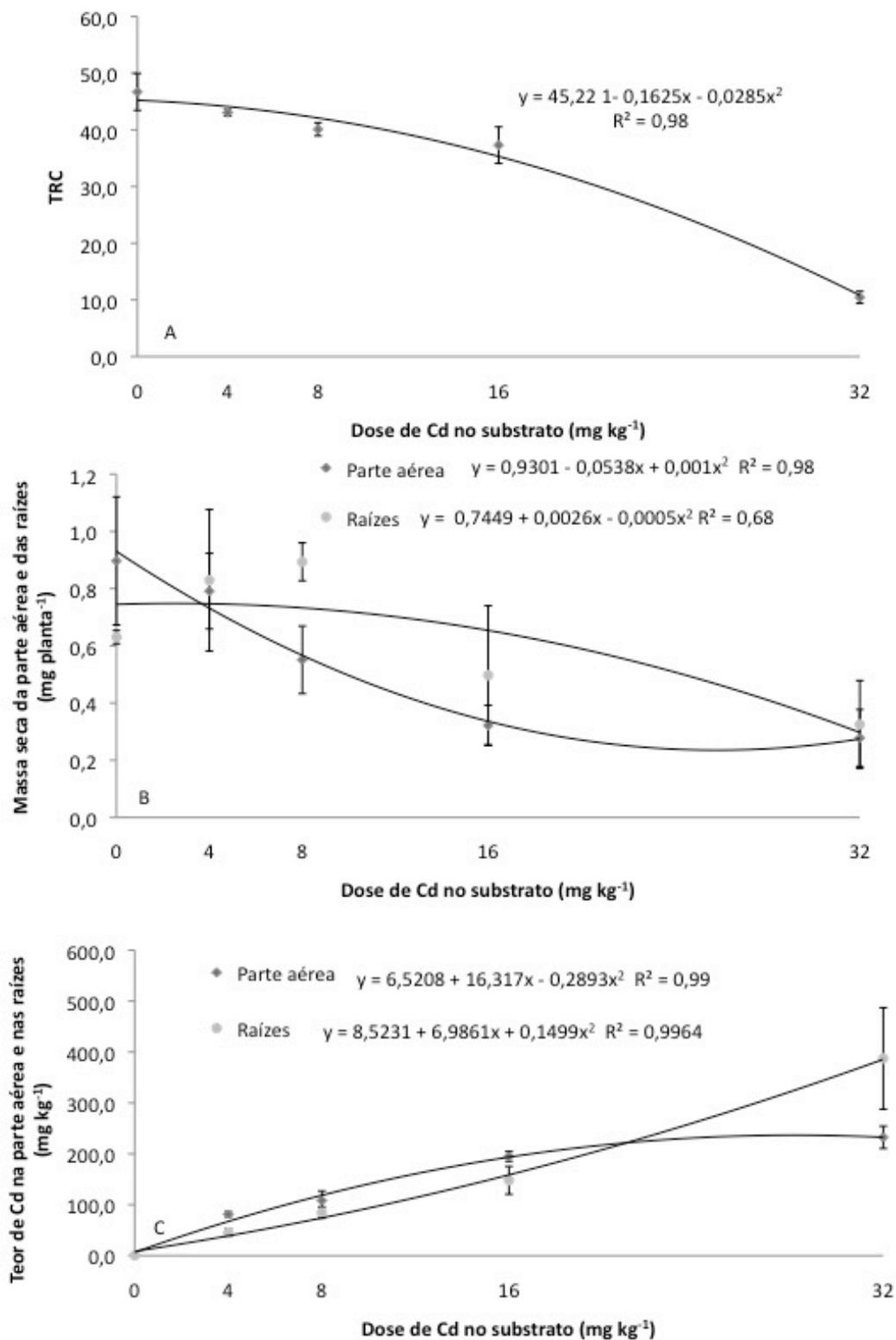


FIGURA 1. Teor relativo de clorofila (TRC) na folha (A), massa seca da parte aérea e de raízes (B) e teor de cádmio (Cd) na parte aérea e nas raízes (C) de *Solanum americanum*, avaliados aos 60 dias após a emergência, em função de doses de Cd aplicadas no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.

Apesar das plantas apresentarem sintomas de amarelecimento mais evidentes apenas nas doses de Cd superiores a 16 mg kg ha^{-1} , o efeito fitotóxico desse metal pesado pode ser observado na massa seca da parte aérea já com aplicação de menores doses (8 mg kg ha^{-1}) (Figura 1B). A produção de massa seca da parte aérea por planta reduziu-se de forma quadrática com incremento da dose de Cd no substrato. A produção de massa seca da parte aérea foi mais sensível que a das raízes, mostrando redução significativa já a partir da dose de 8 mg kg ha^{-1} . O maior valor observado para massa seca da parte aérea ocorreu no tratamento testemunha, sem aplicação de Cd no substrato.

Já a massa seca de raízes apresentou comportamento diferente. Ela aumentou de forma quadrática com o incremento da dose de Cd no substrato até à dose de 8 mg kg ha^{-1} , havendo acentuada redução nesse parâmetro com aplicação de doses mais altas (16 e 32 mg kg ha^{-1}) (Figura 1B). Dessa forma, a relação massa seca raízes/parte aérea foi alterada em função de doses de Cd no substrato.

4.1.2 Acúmulo de Cd nas plantas

Os teores de Cd na parte aérea e nas raízes das plantas aumentaram de forma quadrática com incremento da dose de Cd no substrato, obtendo-se valores máximos de $236,6$ e $377,4 \text{ mg de Cd kg}^{-1}$ de massa seca na parte aérea e raízes, respectivamente (Figura 1C). O teor de Cd na parte aérea foi superior ao verificado nas raízes até à dose de 21 mg kg^{-1} . Apenas na dose de 32 mg kg ha^{-1} de Cd no substrato, o teor desse metal nas raízes foi maior do que o da parte aérea.

4.1.3 Fatores de translocação e de bioacumulação e taxa de extração de cádmio

Além das características já descritas, três outros parâmetros são utilizados para caracterizar de maneira mais completa o potencial de fitorremediação de uma

espécie: fatores de bioacumulação e de translocação e taxa de extração do metal. Esses três parâmetros reduziram-se linearmente com incremento da dose de Cd no substrato (Figuras 2A, B e C). Os valores máximos dos fatores de bioacumulação e de translocação e da taxa de extração de Cd foram, respectivamente, de 19,3 (Figura 2A), 1,8 (Figura 2B) e 9,29% (Figura 2C).

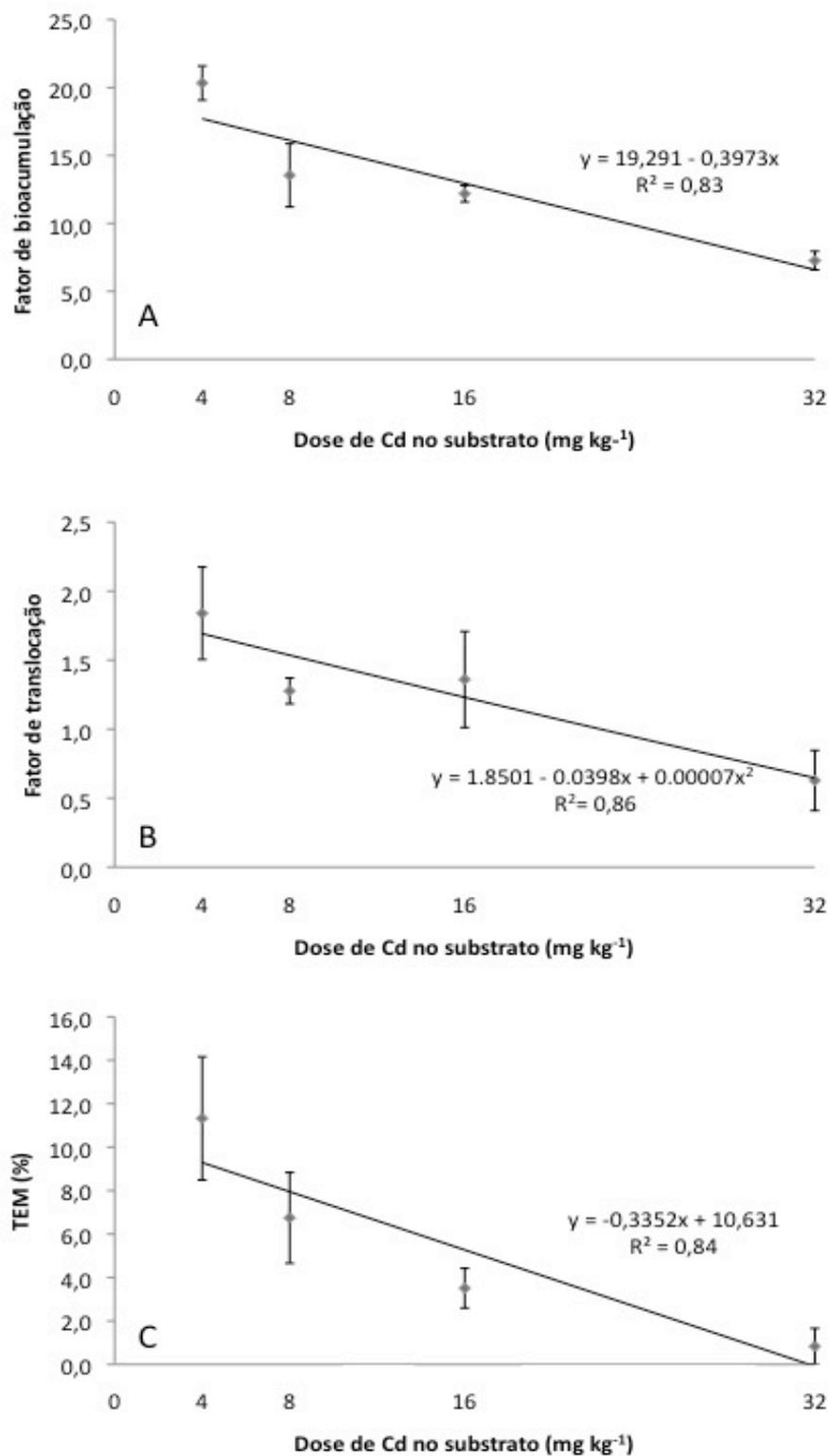


FIGURA 2. Fator de bioacumulação (A), fator de translocação (B) e taxa de extração (TEM) de cádmio (Cd) em *Solanum americanum* em função de doses de Cd no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.

4.2 Resposta de *Solanum lycopersicum* a doses de Cd no substrato

A resposta de tomate, cv. Micro-Tom, a doses de Cd no substrato foi avaliada pelos seguintes parâmetros: teor relativo de clorofila (TRC) na folha, massa seca da parte aérea e de raízes, teor de Cd na parte aérea e nas raízes, fatores de bioacumulação e de translocação e taxa de extração de Cd. Já para a cultivar de tomate Gaúcho foi avaliado apenas o teor de Cd na parte aérea.

Nesse ítem serão também apresentados os resultados referentes ao perfil ionômico, à identificação de genes ortólogos e à análise de expressão dos genes *HMA2* e *HMA3* em tomate, cv. Micro-Tom, na presença e na ausência de Cd no substrato.

4.2.1 Efeitos do Cd nas plantas

Durante os 60 dias de condução do experimento, as plantas de tomate, cv. Micro-Tom, sobreviveram em substratos com doses de Cd de até 125 mg kg⁻¹ (Figura 1). Até à dose de 25 mg kg⁻¹, não se visualizaram nas plantas sintomas de toxidez por Cd (Figura 3).

O TRC na folha apresentou resposta quadrática ao incremento de doses de Cd no substrato (Figura 3A). Houve redução significativa desse parâmetro apenas com a aplicação da maior dose de Cd (125 mg kg⁻¹), em relação às menores doses.

A massa seca da parte aérea e da massa seca de raízes não variaram em função de doses de Cd aplicadas no substrato (Figura 3A). Já o peso fresco dos frutos da cultivar de tomate Micro-Tom reduziu-se de forma quadrática com incremento da dose de Cd no substrato (Figura 3C), sendo esta redução observada somente a partir da dose de 25 mg kg⁻¹.

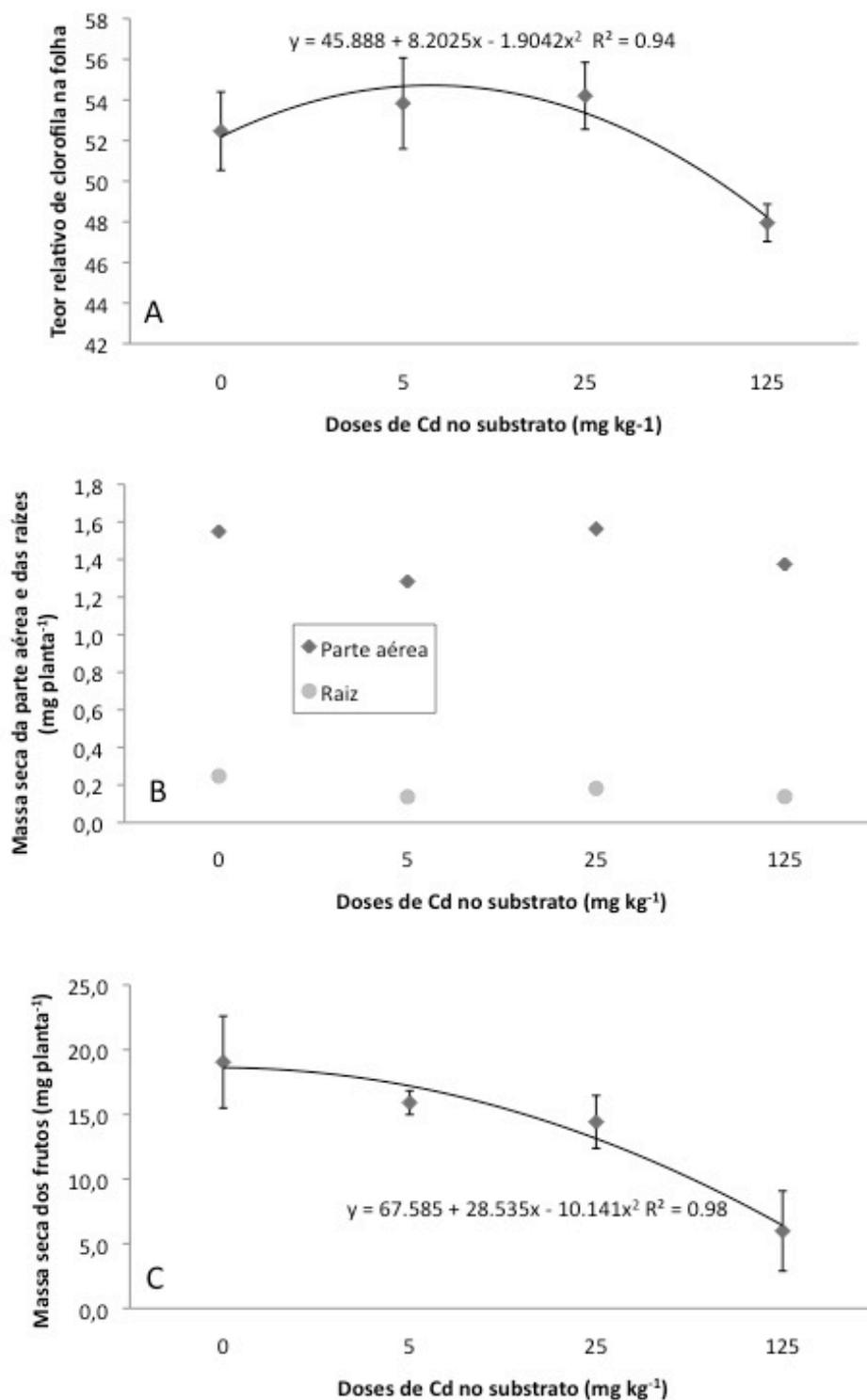


FIGURA 3. Teor relativo de clorofila (TRC) na folha (A), massa seca da parte aérea e de raízes (B) e peso fresco dos frutos (C) de *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom, avaliados aos 60 dias após a emergência, em função de doses de cádmio (Cd) aplicadas no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.

4.2.2 Teor de Cd nas plantas

Os teores de Cd na massa seca de raízes e parte aérea e nos frutos da cultivar de tomate Micro-Tom e os teores de Cd na parte aérea da cultivar Gaúcho aumentaram de forma quadrática com incremento da dose de Cd no substrato (Figura 4A, B e C).

O teor de Cd na parte aérea das plantas de tomate, cv. Micro-Tom, atingiu valores superiores a 2100 mg kg^{-1} com a aplicação da maior dose (125 mg kg^{-1}) desse metal no substrato (Figura 4A). Os teores de Cd foram sempre superiores na parte aérea do que nas raízes. Não houve diferença estatística entre as duas doses intermediárias de Cd (5 e 25 mg kg^{-1}). O teor de Cd nos frutos atingiu valores superiores a 30 mg kg^{-1} (Figura 4B).

A cultivar de tomate Gaúcho (Figura 4C) apresentou teores de Cd na parte aérea expressivamente menores em relação à cultivar Micro-Tom (Figura 4A). Porém, mesmo apresentando valores inferiores desse metal na parte aérea aos verificados na cv. Micro-Tom, a cv. Gaúcho ainda apresenta grande absorção e acúmulo de Cd na parte aérea, atingindo valores superiores a 300 mg kg^{-1} .

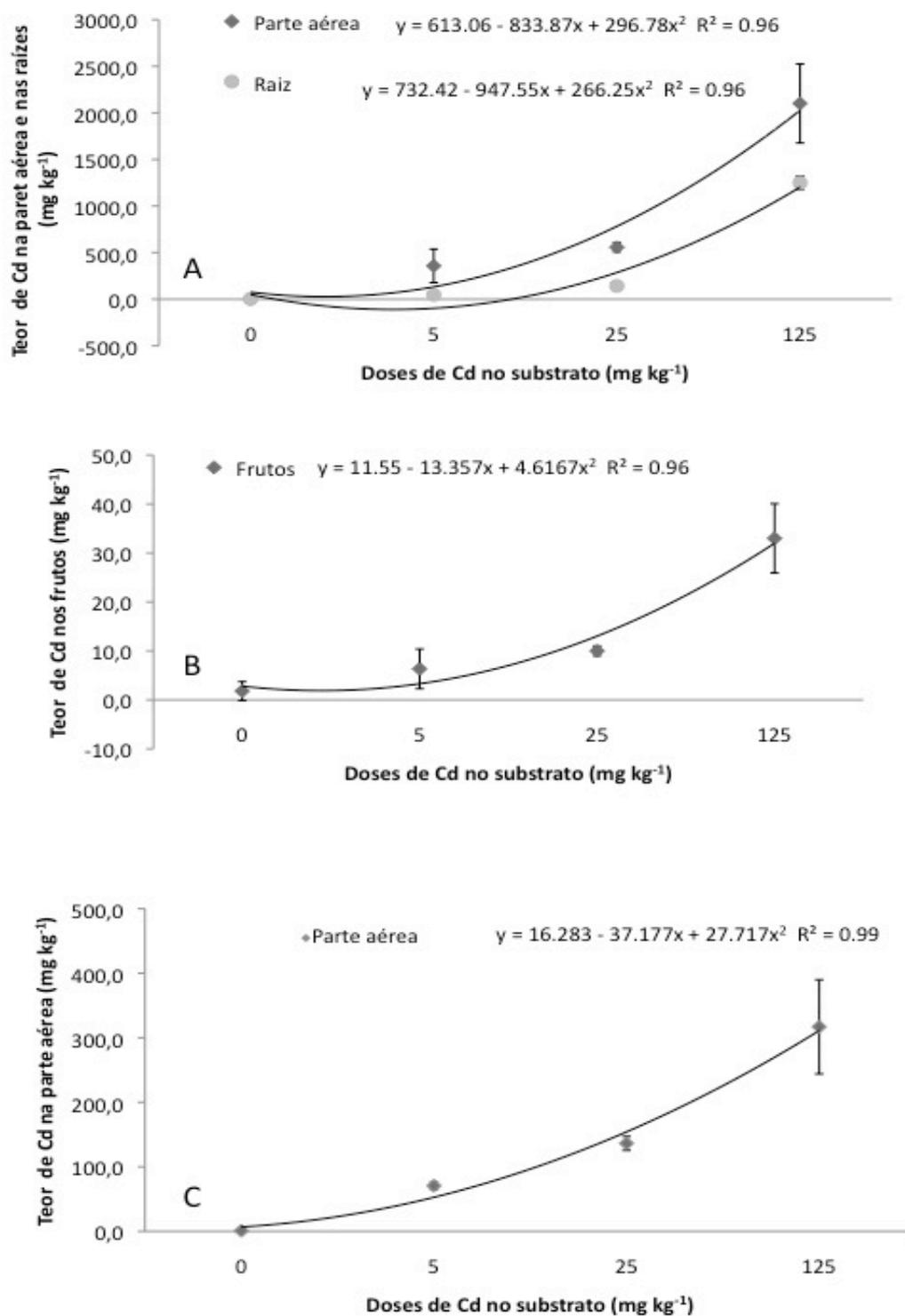


FIGURA 4. Teor de cádmio (Cd) na parte aérea, nas raízes (A) e nos frutos (B) em *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom, e na parte aérea da cv. Gaúcho (C) em função de doses de Cd no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.

4.2.3 Perfil ionômico de plantas de tomate, cv. Micro-Tom

Para estabelecer a curva de acúmulo de cádmio nas plantas de tomate, cv. Micro-Tom, ao longo de seu ciclo, determinou-se o perfil ionômico da planta em seis estádios de desenvolvimento. Com aplicação de 50 mg kg^{-1} de Cd no substrato, a absorção de Cd pelas raízes e pela parte aérea aumentou de forma quadrática ao longo de seu ciclo (Figura 5). Nas raízes, este aumento ocorreu até à décima segunda semana após a emergência, quando os frutos já estavam maduros. Já na parte aérea, este aumento foi observado até à quinta semana, correspondendo à fase de início de frutificação. Nos tratamentos sem aplicação de Cd no meio os teores deste metal nas raízes e na parte aérea foram próximos a zero (dados não mostrados).

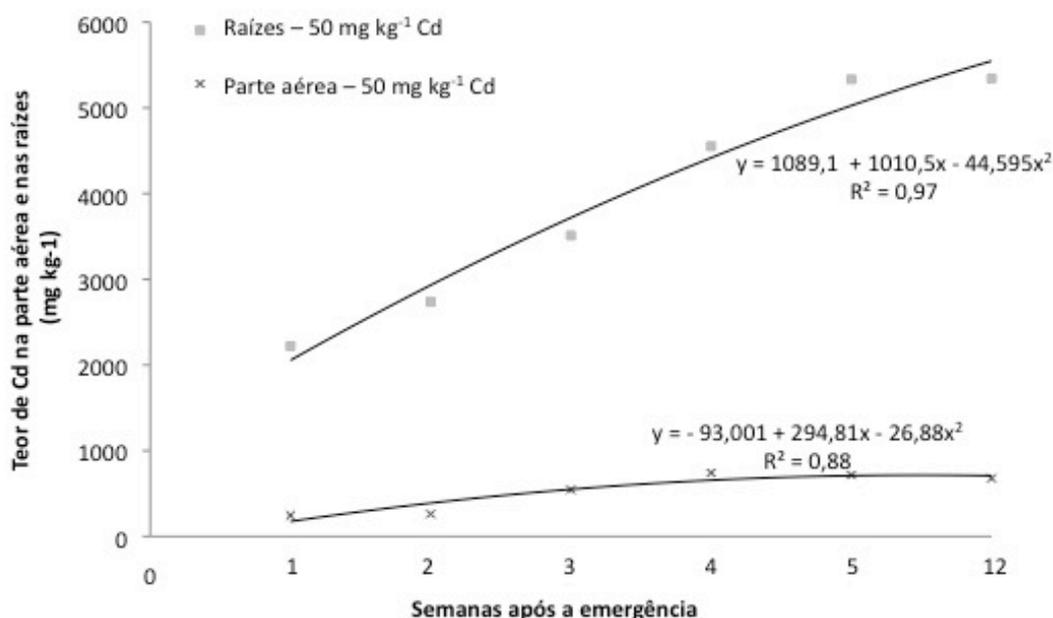


FIGURA 5. Evolução do teor de cádmio (Cd) nas raízes e na parte aérea de *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom, ao longo de seu ciclo de desenvolvimento, cultivado sem e com aplicação de 50 mg kg^{-1} de Cd no substrato. West Lafayette, EUA, 2009.

A análise ionômica realizada com presença e ausência de Cd no substrato indicou que, na média de seis épocas de amostragens, os teores dos elementos Li, S e

Rb (nas raízes) Li, Na, Mg, P, S e Mo (na parte aérea) e Na, P, S e K (nos frutos) aumentaram com aplicação de 50 mg ha⁻¹ de Cd no substrato em relação ao tratamento sem Cd (Tabela 3). Por outro lado, observou-se menores teores de Mn e Co (nas raízes), de K, Ca e Zn (na parte aérea) e de Zn (nos frutos) na presença de Cd em relação à testemunha sem Cd.

TABELA 3. Teores de 20 elementos nas raízes, na parte aérea e nos frutos de tomate, cv. Micro-Tom, sem e com aplicação de 50 mg kg⁻¹ de cádmio (Cd) no substrato, na média de seis épocas de coleta de material. West Lafayette, EUA, 2009.

Elementos	Parte da planta					
	Raízes		Parte aérea		Frutos	
	Dose de Cd (mg kg ⁻¹)		Dose de Cd (mg kg ⁻¹)		Dose de Cd (mg kg ⁻¹)	
	0	50	0	50	0	50
Li	3.5 b ¹	15.3 a	7.2 b	70.2 a	0.5 a	1.9 a
B	73.3 a	70.6 a	48.3 a	71.6 a	16.0 a	17.4 a
Na	3951 a	7311 a	5770 b	21229 a	779 b	1514 a
Mg	20084 a	18339 a	9672 b	13412 a	197 b	2913 b
P	4988 a	4252 a	6534 b	8509 a	3625 b	5352 a
S	3910 b	8037 a	6775 b	13816 a	2110 b	2666 a
K	39427 a	42244 a	53968 a	27384 b	32896 b	43129 a
Ca	8451 a	6449 a	22309 a	16515 b	1852 a	2327 a
Mn	547 a	201 b	120 a	128 a	13.3 a	21.1 a
Fe	2124 a	2594 a	270 a	322 a	29.6 a	28.0 a
Co	11.6 a	8.7 b	1.2 a	1.0 a	0.1 a	0.2 a
Ni	43.4 a	43.8 a	8.7 a	6.4 a	0.4 a	0.4 a
Cu	493 a	371 a	52.3 a	35.0 a	19.7 a	17.4 a
Zn	113 a	78.6 a	61.6 a	31.6 b	21.9 a	13.7 b
As	4.7 a	4.9 a	0.1 a	0.1 a	0.0 a	0.0 a
Se	2.5 a	1.4 a	0.7 a	0.9 a	0.4 a	0.3 a
Rb	31.2 b	49.3 a	11.1 a	15.1 a	6.4 a	12.3 a
Sr	68.0 a	52.7 a	165 a	115 a	6.1 a	9.0 a
Mo	7.9 a	7.2 a	5.3 b	7.1 a	2.2 b	3.2 a
Cd	2.4 b	3949 a	0.5 b	531 a	0.7 b	39.9 a

¹Médias seguidas pela mesma letra (comparação entre doses de Cd dentro de cada parte da planta para cada elemento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.4 Fatores de translocação e de bioacumulação e taxa de extração de cádmio em *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom

Esses três parâmetros reduziram-se linearmente com incremento da dose de Cd no substrato de 5 para 125 mg kg⁻¹ (Figura 6A, B e C). Houve redução de 6,1 para 2,2 para o fator de translocação, de 55,6 para 22,4 para o fator de bioacumulação e de 54,3 para 13,8 para a taxa de extração de metal.

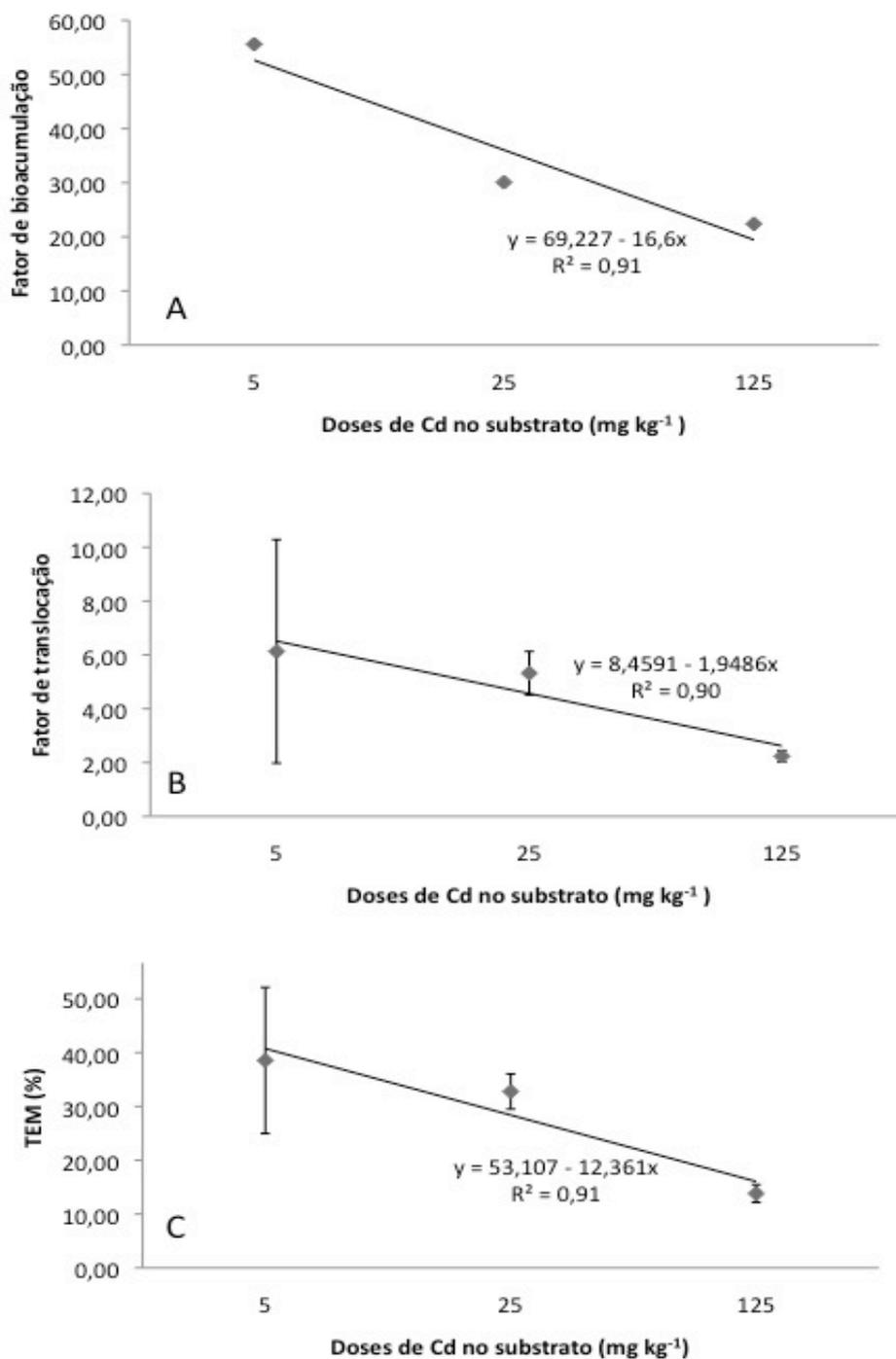


FIGURA 6. Fatores de translocação (A) e de bioacumulação (B) e taxa de extração de metal (TEM) (C) em *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom, em função de doses de Cd no substrato. Porto Alegre-RS, 2008.

4.2.5 Identificação de genes ortólogos e análise de expressão dos genes

HMA2 e *HMA3* em tomate, cv. Micro-Tom

Neste estudo, o objetivo foi identificar genes relacionados a tolerância de plantas ao Cd ortólogos aos previamente descritos em *A.thaliana*, em tomate cv. Micro-Tom. Assim, foram identificados em tomate, cv. Micro-Tom, os genes ortólogos aos genes IRT1, GSH1, HMA1, *HMA2*, *HMA3*, *HMA4*, PCS1, PDS e SAT de *A.thaliana* (Figura 7). Após amplificação, os fragmentos gênicos foram purificados e sequenciados. Ao se comparar as sequências àquelas previamente descritas para estes genes em *A.thaliana*, observou-se identidade em nucleotídeos superior a 98% (Tabela 4).

TABELA 4. Identidade em nucleotídeos dos fragmentos de genes selecionados para identificação de genes ortólogos aos de *A.thaliana* em tomate cv. Micro-Tom. West Lafayette, EUA, 2009.

Gene	Identidade em nucleotídeos (%)	Tamanho dos fragmentos (PB)
<i>IRT1</i> (Transportador de metal regulado por Ferro)	99	160
<i>GSH1</i> (Glutathiona sintetase)	98	150
<i>HMA1</i> (Transportadores de metal pesado do tipo ATPase)	99	140
<i>HMA2</i> (Transportadores de metal pesado do tipo ATPase)	99	110
<i>HMA3</i> (Transportadores de metal pesado do tipo ATPase)	99	130
<i>HMA4</i> (Transportadores de metal pesado do tipo ATPase)	99	190
<i>PCSI</i> (Fitoquelatina sintetase)	99	110
<i>PDS</i> (Fitoeno desaturase)	98	120
<i>SAT</i> (Serina acetiltransferase)	99	150
<i>UBI</i> (Ubiquitina)	98	200

Dentre esses genes descritos anteriormente, foram selecionados os genes *HMA2* e *HMA3*, com base em dados de literatura e nos resultados descritos no item 4.3 para análise de expressão em tomate, cv. Micro-Tom, na presença e na ausência

de Cd no substrato. A partir deste resultado, foram avaliadas as expressões relativas dos genes *HMA2* e *HMA3* em tomate, cv. Micro-Tom, na presença e na ausência de Cd no substrato.

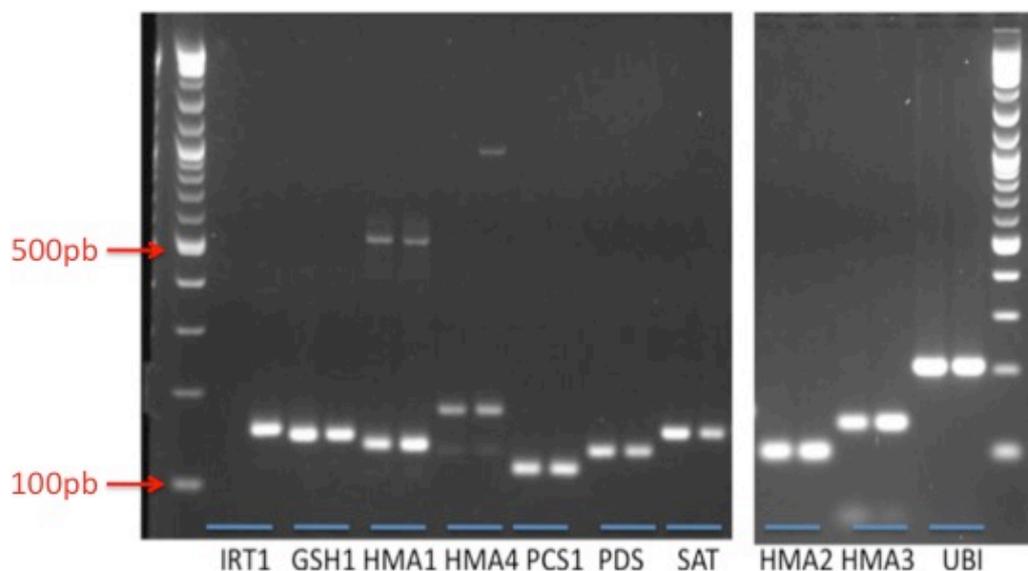


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose com fragmentos amplificados dos genes de tomate, cv. Micro-Tom, ortólogos aos de *Arabidopsis thaliana*. Marcador de peso molecular, DNA, 1Kb. West Lafayette, EUA, 2009.

Nas raízes, a presença de Cd (50 mg kg^{-1}) no substrato reduziu a expressão de *HMA2* em relação ao tratamento sem Cd (Figura 8A). Embora esta redução tenha sido significativa, os valores absolutos mostram que a mesma foi de apenas 0,4 vez. Já na parte aérea, a expressão do gene *HMA2* aumentou 160 vezes na presença de Cd no substrato em relação ao tratamento sem Cd (Figura 8B).

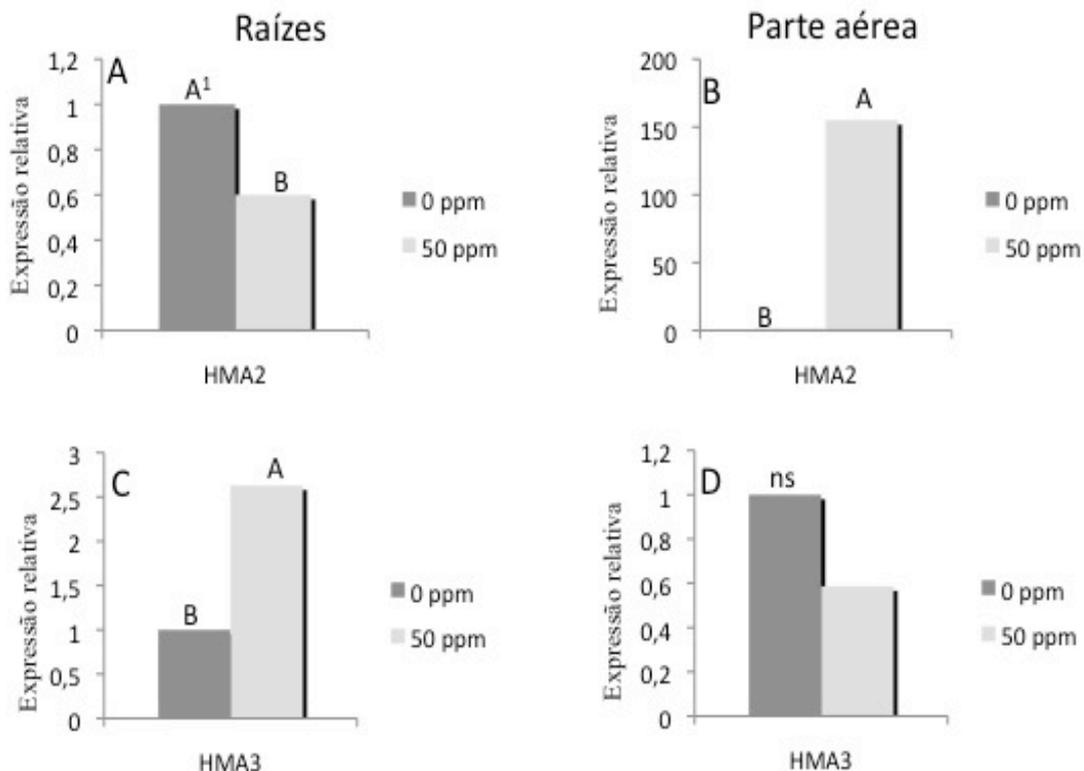


FIGURA 8. Expressão relativa do gene *HMA2* nas raízes (A) e na parte aérea (B) e do gene *HMA3* nas raízes (C) e na parte aérea (D) de plantas de tomate, cv. Micro-Tom, crescidas na ausência e na presença (50 mg kg⁻¹) de cádmio (Cd) no substrato. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos dos Cts do controle endógeno (Gapdh). Os valores representam o número de vezes que a expressão aumentou ou diminuiu em relação ao calibrador na ausência de Cd. ¹Tukey P # 0,05.

Nas raízes houve aumento de 1,5 vezes na expressão do gene *HMA3* (Figura 8C), enquanto na parte aérea da planta, a sua expressão não foi alterada pela presença de Cd no substrato (Figura 8D).

A expressão do gene *HMA2* foi em torno de 50 vezes superior nas raízes quando comparada à parte aérea no tratamento sem Cd (dados não mostrados). Já na presença do metal pesado, a expressão na parte aérea foi cinco vezes superior à das raízes. A expressão do gene *HMA3* nas raízes foi em torno de 1000 vezes superior nas raízes quando comparada à da parte aérea tanto na presença quanto na ausência de Cd no meio (dados não mostrados).

4.3 Prospecção de genes relacionados à absorção, à translocação e ao acúmulo de Cd em *Arabidopsis thaliana*

Inicialmente, serão apresentados os resultados referentes à seleção do acesso de *A. thaliana* a ser utilizado, aos cruzamentos realizados e à análise da população gerada. A seguir, serão apresentados os resultados relativos ao mapeamento de genes envolvidos no fenótipo baixo Cd e à expressão dos genes identificados. Finalmente, serão apresentados os resultados obtidos pela enxertia realizada em *A. thaliana*.

4.3.1 Seleção do acesso de *Arabidopsis thaliana* em função de teor de Cd na parte aérea

Foi realizada uma busca dentre todos os 360 acessos de *A. thaliana* para identificar os que apresentassem teor de Cd diferenciado em relação ao controle Col-0. Verificou-se ampla variabilidade entre acessos quanto à capacidade de acumular Cd na parte aérea. Os teores de Cd na parte aérea dos acessos estudados variaram de 0,6 a 1,5 mg kg⁻¹, enquanto no acesso Col-0 o valor foi de 1,2 mg kg⁻¹. O acesso selecionado CS28181 foi o que apresentou menor teor de Cd na parte aérea (0,6 mg kg⁻¹), metade do observado no controle Col-0 (Figura 9).

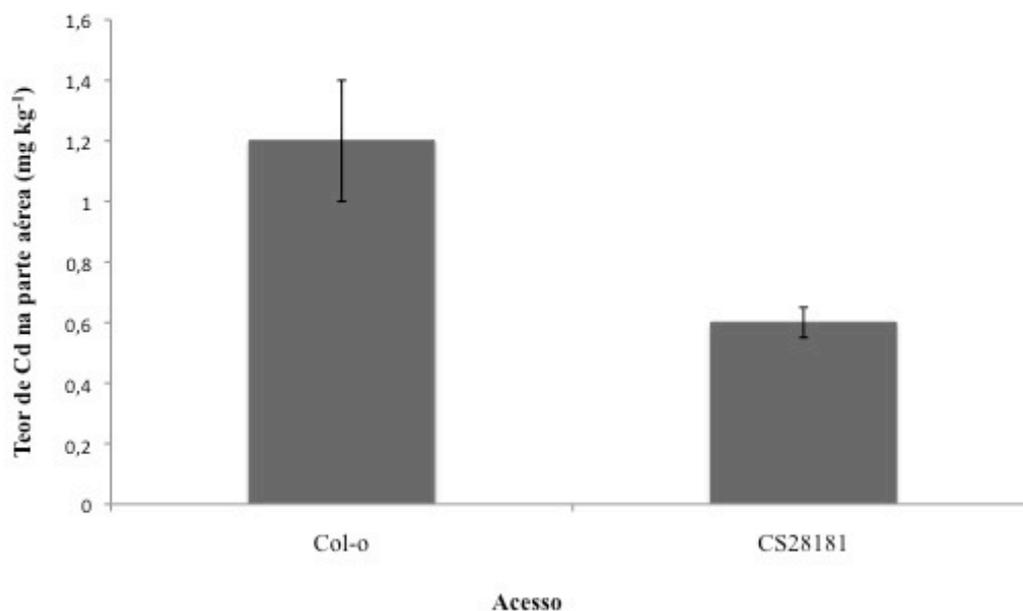


FIGURA 9. Distribuição de 70 acessos de *Arabidopsis thaliana* em função de sua capacidade de acumular cádmio (Cd) na parte aérea. Em destaque, o acesso selecionado CS28181, com fenótipo com baixo teor de Cd e o Col-0, utilizado como controle. West Lafayette, EUA, 2009.

4.3.2 Mapeamento de genes relacionados ao fenótipo com baixo teor de Cd no acesso de *Arabidopsis thaliana* CS28181

Após seleção do acesso, realizou-se cruzamento entre CS28181 (feminino) e Col-0 (masculino). A análise da progênie demonstrou distribuição normal, em que 72 de 300 indivíduos analisados apresentaram baixo teor de Cd na parte aérea, similar ao do acesso CS28181 (Figura 10).

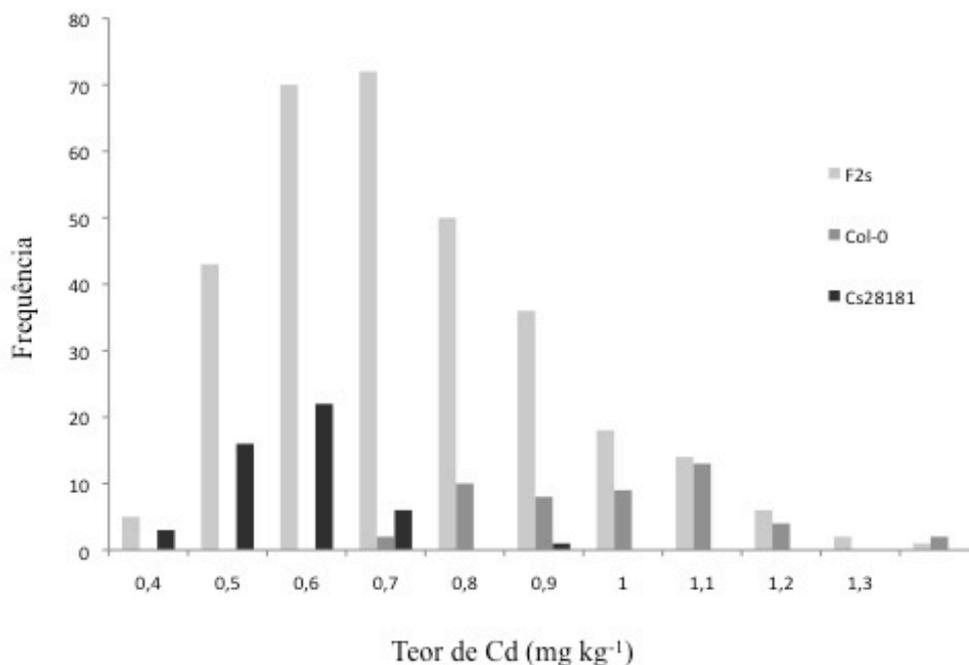


FIGURA 10. Histograma do teor de cádmio (Cd) na parte aérea nos acessos de *Arabidopsis thaliana* CS28181 Col-0 e na população F2 resultante desse cruzamento. As plantas foram crescidas em substrato por cinco semanas e analisadas por ICP-MS. West Lafayette, EUA, 2009.

Para se ter a localização aproximada no genoma do locus responsável pelo baixo teor de Cd no acesso CS28181, foi realizada análise via BSA (Bulked Segregant Analysis), com detecção baseada em microarray de marcadores moleculares, utilizando-se plantas F2 do cruzamento Col-0 x CS28181. Plantas apresentando baixo ($n=40$) (fenótipo similar ao acesso CS28181) e alto ($n=40$) (fenótipo similar ao acesso Col-0) teores de Cd na parte aérea foram coletadas separadamente e o DNA genômico de cada *pool* foi hibridizado ao chip de microarray de DNA de *A.thaliana* ATH1 (Affymetrics). Usando as sondas de oligonucleotídeos no chip de microarray de DNA, o qual mostra a hibridização diferencial entre os acessos de *A.thaliana* CS28181 e Col-0 como marcadores genéticos Single Feature Polymorphisms (SFP), mapeou-se o locus responsável pelo

baixo teor de Cd na parte aérea do acesso CS28181 na área centrada ao redor de 14Mb no cromossomo 4 (Figura 11).

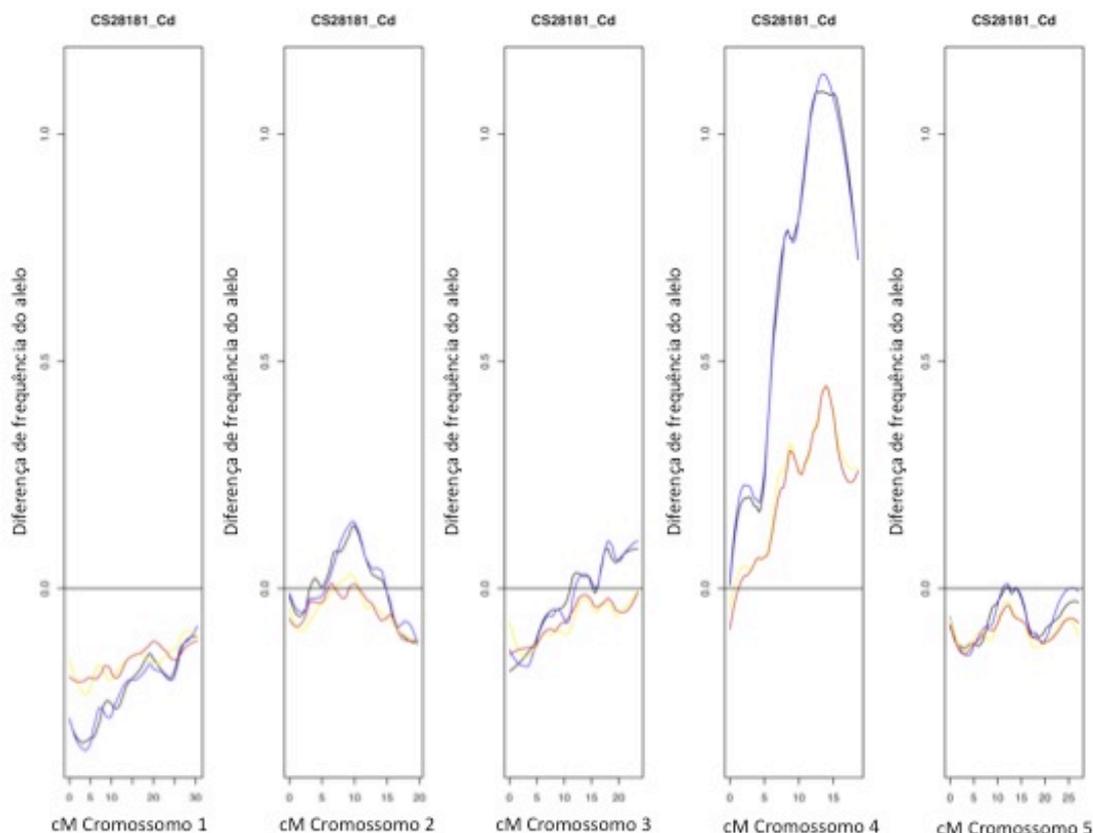


FIGURA 11. Bulk segregant analysis para o fenótipo com baixo teor de Cd na parte aérea das plantas na população F2, oriunda do cruzamento entre os acessos de *Arabidopsis thaliana* Col-0 e CS28181. Os dados apresentados representam a diferença na hibridização entre os dois *pools* de DNA, com baixo (CS28181) e alto (Col-0) teores de Cd na parte aérea. Assim, o valor do eixo Y para puro Col-0 seria -1,0 e o do eixo Y para puro CS28181 seria 1,0. West Lafayette, EUA, 2009.

A partir destes resultados, procurou-se identificar *in silico* genes previamente descritos nessa região do cromossomo 4 que estivessem de alguma forma relacionados ao fenótipo com baixo teor de Cd na parte aérea. Foram encontrados e selecionados dois genes (*HMA2* e *HMA3*) que se distribuem em sequência (tandem) no genoma de *A.thaliana* (Figura 12).

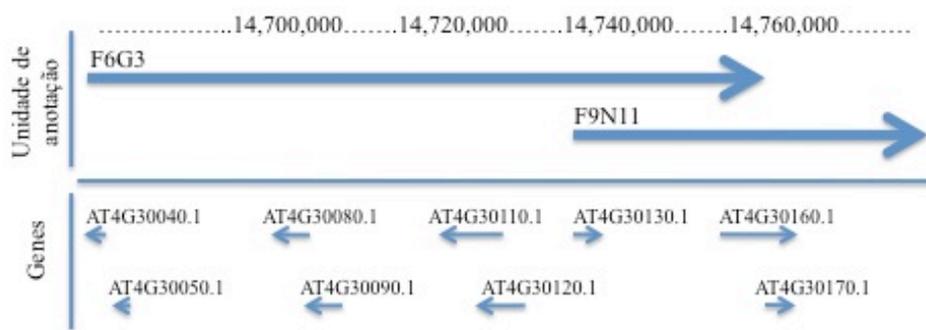


FIGURA 12. Mapa do cromossomo 4 de *Arabidopsis thaliana* mostrando os genes *HMA2* (AT4G30110.1) e *HMA3* (AT4G30120.1) distribuídos em sequência no genoma. Figura obtida no site www.arabidopsis.org.

4.3.3 Sequenciamento e análise de expressão dos genes *HMA2* e *HMA3* de *Arabidopsis thaliana*

Após análise destes resultados, foram utilizadas duas estratégias diferentes, mas complementares. A primeira consistiu no sequenciamento dos *HMA2* e *HMA3* no acesso CS28181 para compará-lo ao verificado no acesso Col-0. O objetivo foi identificar alterações significativas nas duas sequências que possam estar regulando a diferença fenotípica observada entre os dois acessos quanto à capacidade de acumular Cd na parte aérea. A segunda estratégia foi o desenho de primers para estes dois genes, para realizar análise de sua expressão relativa nos acessos CS28181 e Col-0.

Quanto à primeira estratégia, foi possível observar algumas diferenças significativas entre as sequências de CS28181 e Col-0. A primeira foi em relação ao gene *HMA3*. Trabalhos anteriores descrevem este gene como não funcional no acesso Col-0, pois há deleção de uma timina, que determina a presença de um stop códon na posição L543. Porém, no presente estudo, foram encontrados três SNPs (single nucleotide polymorphism) que contribuem para que o gene *HMA3* seja funcional no acesso CS28181. Neste acesso, a timina está presente, o que determina a

funcionalidade desse gene. Além disso, outros dois SNPs foram encontrados no gene *HMA3* alterando, na posição 426, uma tirosina para asparagina e, na posição 448, uma arginina para isoleucina. Foi observado também um SNP no gene *HMA2*, que altera a sequência de aminoácidos na posição 131, de uma alanina para treonina.

Na segunda estratégia analisou-se as expressões relativas dos genes *HMA2* e *HMA3* nos acessos Col-0 e CS28181. Nas raízes, não houve diferença significativa entre os dois acessos na expressão destes dois genes (Figura 13A). Já na parte aérea, a expressão dos genes *HMA2* e *HMA3* do acesso CS28181 foi superior à observada no acesso Col-0 (Figura 13B). Este aumento foi de duas vezes para *HMA2* e de 0,5 vez para *HMA3*.

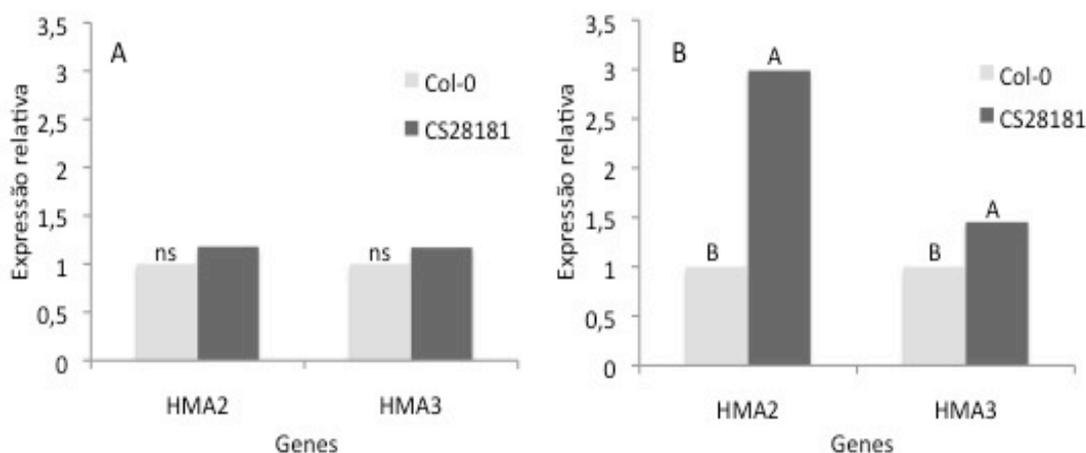


FIGURA 13. Expressão relativa dos genes *HMA2* e *HMA3* nas raízes (A) e na parte aérea (B) no controle Col-0 e no acesso CS28181 de *Arabidopsis thaliana*, em plantas com três semanas após a emergência. Todos os valores de Cts foram normalizados em relação aos Cts do controle endógeno (Gapdh). Os valores da expressão representam o número de vezes que a expressão aumenta ou diminui em relação ao calibrador O ppm de Cd.¹ Tukey P # 0,05.

4.3.4 Enxertia de *Arabidopsis thaliana*

Foi realizado um experimento de enxertia com objetivo de determinar se o fenótipo com baixo teor de Cd na parte aérea no acesso CS28181 é determinado pelas raízes ou pela parte aérea. Raízes e parte aérea de plântulas de *A. thaliana*, aos

cinco dias após a germinação, foram enxertadas reciprocamente entre os dois acessos estudados, Col-0 e CS28181. As plântulas enxertadas foram crescidas em solo durante quatro semanas. Plantas com raízes de CS28181 apresentaram menor teor de Cd na parte aérea do que plantas com raízes de Col-0, independentemente se a parte aérea era de CS28181 ou de Col-0 (Figura 14). Esses resultados evidenciaram que o genótipo da parte aérea do acesso não influenciou o teor de Cd na parte aérea. Assim, o baixo teor de Cd observado na parte aérea do acesso CS28181 foi devido a algum mecanismo presente nas raízes.

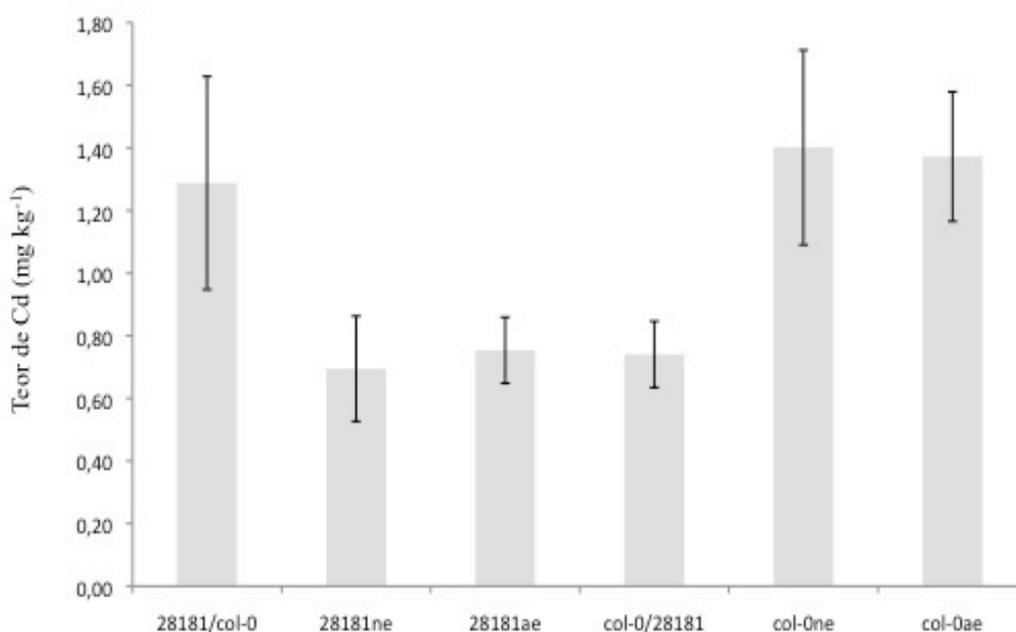


FIGURA 14. Teor de cádmio (Cd) na parte aérea de plântulas de *A.thaliana*. As plântulas foram enxertadas aos cinco dias após emergência, transferidas para solo e analisadas após quatro semanas de crescimento. As barras mostram o teor de Cd na parte aérea de plantas com parte aérea CS28181 e raízes Col-0 (28181/Col-0) e com parte aérea Col-0 e raízes CS28181 (Col-0/28181) e de plântulas não enxertadas (ne) ou auto-enxertadas (ae). West Lafayette, EUA, 2009.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente serão discutidos os resultados obtidos na caracterização da resposta das espécies *Solanum americanum* e *Solanum lycopersicum* (tomate), cultivares Micro-Tom e Gaúcho, em função do incremento da dose de cádmio no substrato. Após, serão abordados os aspectos relacionados à seleção e à prospecção de genes relacionados à tolerância de plantas a Cd em *Arabidopsis thaliana* e, por fim, será discutida a identificação de genes ortólogos e a análise de suas expressões em *Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom.

Para caracterizar a resposta das espécies *S. americanum* e *S. lycopersicum*, cv. Micro-Tom, ao incremento da dose de Cd no substrato foram avaliados os seguintes parâmetros: teor relativo de clorofila na folha, massa seca da parte aérea e das raízes, teor de Cd na parte aérea e nas raízes, fatores de bioacumulação e de translocação e taxa de extração de Cd. Já para *S. lycopersicum* cv. Gaúcho, foi avaliado apenas o teor de Cd na parte aérea.

Entre os efeitos fitotóxicos que o Cd causa às plantas, pode-se citar a indução de estresse oxidativo, via peroxidação de lipídios, que influencia também o ciclo do nitrogênio e todas as biomoléculas dependentes desse nutriente. Com isso, um dos sintomas visuais de toxidez de Cd é o amarelecimento de folhas devido à redução do teor de clorofila. Este efeito pode ser medido com o uso de um clorofilômetro. O uso desse equipamento fundamenta-se na correlação positiva existente entre teor de

clorofila na folha e teor de N na planta (Waskom et al., 1996; Argenta et al., 2004), que, por sua vez, está associado à taxa da atividade fotossintética (Ma et al., 1996). Devido a isso, o uso do clorofilômetro é uma boa ferramenta para avaliação do fenótipo de uma planta quando a característica a ser identificada está relacionada à coloração de folhas (intensidade da cor verde), que substitui a avaliação visual que é imprecisa.

Nas duas espécies analisadas, *Solanum americanum* e tomate cv. Micro-Tom, o teor relativo de clorofila na folha não variou com a aplicação de baixas doses (até 16 e 25 mg kg⁻¹) de Cd no substrato, mas diminuiu com aplicação de doses mais elevadas, 32 e 125 mg kg⁻¹, respectivamente para *S. americanum* (Figura 1A) e tomate cv. Micro-Tom (Figura 3A). Estes resultados são similares aos observados por Sun et al. (2007), que não verificaram sintomas visuais de toxidez por Cd até a dose de 50 mg kg⁻¹ em *Solanum nigrum*, que é considerada uma espécie muito similar a *S. americanum* (Schilling et al., 1992).

Em *S. americanum*, embora tenha sido observado amarelecimento de folhas apenas com a aplicação da dose mais elevada de Cd (32 mg kg⁻¹), verificou-se redução linear da massa seca da parte aérea com incremento da dose desse metal no substrato (Figura 1B). Essa resposta da parte aérea em função de doses de Cd diferiu da apresentada pelas raízes, que apresentaram resposta quadrática ao incremento da dose de Cd no substrato. A dose que propiciou a maior massa seca das raízes foi a de 8 mg kg⁻¹. Em função dessas respostas diferenciais, a relação massa seca das raízes/massa seca da parte aérea alterou-se, principalmente com aplicação das menores doses de Cd no substrato (até 16 mg kg⁻¹). A alteração nessa relação pode se constituir em uma estratégia de escape da planta à presença desse metal, alocando preferencialmente fotoassimilados para rápido crescimento e desenvolvimento de

raízes em detrimento da parte aérea, para atingir camadas mais profundas de solo, que não estejam contaminadas pelo metal. A locação prioritária de recursos para desenvolvimento de raízes pode ser uma característica desejável em espécies de plantas hiperacumuladoras de metal pesado, pois aumenta a área de solo explorada pelas raízes e, conseqüentemente, o potencial fitorremediador das plantas. Essa característica também pode ser observada na resposta de plantas à disponibilidade de nutrientes no solo. Com maior desenvolvimento de raízes a planta explora áreas de solo com maior concentração de determinados nutrientes (fósforo, por exemplo), com objetivo de potencializar seu desenvolvimento (Silva & Delatorre, 2009). Segundo estes mesmo autores, no caso do nitrogênio as plantas se comportam de uma maneira diferente, estendendo as raízes principais com o objetivo de encontrar regiões mais profundas devido a grande mobilidade deste nutriente no solo.

Especificamente em relação a fósforo, foi verificado que plantas de trigo aumentam significativamente a massa seca de raízes em resposta à sua limitação no solo (Rosa & Camargo, 1990, Silva & Delatorre, 2009). Isso se deve ao fato da limitação de P ser percebida por dois tipos de sensores, um local no sistema radicular, que avalia o meio externo, e outro “sistêmico”, que avalia o status de P da planta como um todo (Delatorre et al., 2004; Abel et al., 2002). Um mecanismo similar a este pode estar atuando em *Solanum americanum*, fazendo com que sensores avaliem o teor de Cd na planta e aloquem mais ou menos recursos para desenvolvimento de raízes ou parte aérea, visando o maior desenvolvimento possível da planta. Este pode ser um dos mecanismos responsáveis pela maior tolerância de espécies de plantas hiperacumuladoras de metais pesados em áreas contaminadas.

Em tomate, cv. Micro-Tom, sintomas visuais de amarelecimento de folhas (Figura 3A) e redução do peso fresco de frutos (Figura 3C) foram observados apenas

na dose mais elevada de Cd no substrato (125 mg kg^{-1}). Para essa espécie, o incremento da dose de Cd no substrato até 125 mg kg^{-1} não reduziu significativamente a massa seca de raízes e parte aérea (Figura 3B). Em *S. nigrum*, uma espécie de solanácea silvestre hiperacumuladora de Cd, foram observadas reduções na massa seca de parte aérea e raízes já a partir da aplicação da dose de 16 mg kg^{-1} (Sun et al., 2007). Nessa espécie, Schilling et al. (1992) observaram efeitos fitotóxicos de Cd, expressos em termos de redução da massa seca de parte aérea e raízes e de aparecimento de clorose nas folhas, somente com a aplicação da dose mais alta de Cd (50 mg kg^{-1}).

Os resultados obtidos no presente estudo com tomate, cv. Micro-Tom, sugerem que essa espécie possivelmente apresente mecanismos diferenciados envolvidos na detoxificação deste metal, que fazem com que as plantas acumulem e tolerem altas quantidades de Cd em seus tecidos, sem comprometer o seu crescimento e desenvolvimento. Desta forma, ao se cultivar tomate em uma área contaminada com Cd, dificilmente deverão ser observados sintomas de excesso desse metal nas plantas. Assim, pode-se concluir que essa espécie não é boa indicadora de áreas contaminadas com Cd. Por outro lado, tratando-se de uma espécie comercial e comestível, outro ponto importante a ser observado é o grande acúmulo desse metal pesado na parte aérea da planta (Figura 3C) e, principalmente, nos frutos (Tabela 3), que por ingestão podem ser tóxicos especialmente à saúde humana.

Os teores de Cd acumulados na parte aérea em função de doses de Cd no substrato foram avaliados em *S. americanum* e em duas cultivares de tomate. Tanto a espécie *S. americanum* (Figura 2C) quanto as cultivares de tomate Gaúcho e Micro-Tom (Figura 4 A e 4C) apresentaram concentrações de Cd em seus tecidos superiores

ao limite de 100 mg kg^{-1} , que é fixado para que uma espécie seja considerada hiperacumuladora de Cd (Baker, 1981; Brooks, 1998). As concentrações máximas observadas para *S. americanum* (Figura 2C) e para tomate, cv. Gaúcho (Figura 4C), situaram-se em torno de 300 mg kg^{-1} de Cd. Já para tomate, cv. Micro-Tom, o teor de Cd na parte aérea foi muito alto, sendo superior a 2100 mg kg^{-1} de substrato (Figura 4A).

Embora as duas cultivares de tomate tenham apresentado comportamento similar quanto ao teor de Cd na parte aérea, a taxa de absorção desse metal é menor na cv. Gaúcho por possuir ciclo mais longo do que o da cv. Micro-Tom, uma vez que a coleta do material foi realizada aos 60 dias em ambas as cultivares, portanto em estádios de desenvolvimento diferentes. Enquanto a cv. Micro-Tom estava no final da fase de frutificação, as plantas da cv. Gaúcho ainda se encontravam na fase vegetativa, o que pode explicar essas diferenças no teor de Cd entre as duas cultivares. Essa alta concentração de Cd verificada na parte aérea na cultivar de tomate Micro-Tom é similar às observadas em outras espécies hiperacumuladoras de Cd, como *Thlaspi caerulescens*, que podem tolerar teores de Cd no tecido de até 2700 mg kg^{-1} (Brooks, 1998; Sun et al., 2007). Desta forma, a cultivar de tomate Micro-Tom tem a capacidade de acumular altas quantidades de Cd em seus tecidos, fato este ainda não descrito na literatura até o momento. Essas quantidades são superiores inclusive à maioria das espécies já descritas como hiperacumuladoras de Cd, já que elas possuem a capacidade de acumular teores de Cd em seus tecidos próximos a 400 mg kg^{-1} como, por exemplo, *Solanum nigrum* (Sun et al., 2007).

Muitos trabalhos estão sendo realizados com objetivo de identificar características de plantas para se definir o potencial de uma espécie de planta em ser hiperacumuladora de metal ou para ser utilizada diretamente na fitorremediação de

áreas degradadas (Wei et al., 2005; Sun et al., 2007). Algumas características são imprescindíveis, como a elevada produção de biomassa, mesmo sob condições de alta concentração de metal no meio de crescimento. Além disso, a planta deve manter o desenvolvimento da parte aérea até pelo menos um ponto crítico, a partir do qual ocorre grande redução na produção de biomassa, devido aos efeitos fitotóxicos do metal (Wei & Zhou, 2004; Zhou & Song, 2004). Os dados obtidos no presente trabalho indicam que plantas da cultivar de tomate Micro-Tom apresentam essas duas características (Figura 3B), demonstrando potencial para desenvolvimento de estudos relacionados à tolerância a metais pesados. Porém, por ser uma espécie com frutos comestíveis, é fundamental que se conheça o potencial de translocação do Cd absorvido pela planta para os frutos.

O Cd é absorvido pelo corpo humano por ingestão, inalação ou pela pele (WHO, 1992). No entanto, a absorção pela pele ocorre em taxa muito pequena, sendo praticamente insignificante (Lauwerys, 1986). Estudos mostram que, aproximadamente, 2 a 6% do Cd que entra no corpo humano é efetivamente absorvido (WHO, 1992), sendo que 95% deste metal entra no corpo por ingestão de alimentos contaminados (Van Assche, 1998). A maior parte (98%) do Cd ingerido por seres humanos é oriundo de espécies de plantas terrestres ou da carne proveniente de animais que se alimentaram destas plantas, enquanto apenas 1% provém de espécies aquáticas usadas como alimentos, como peixes, e 1% é ingerido pelo consumo de água contaminada (Van Assche, 1998; Fan et al., 2009). Esta situação torna-se mais grave se for levado em consideração que a principal fonte de acúmulo de Cd no solo provém da aplicação de adubos fosfatados utilizados intensivamente em lavouras, sendo que 41,3% da deposição de Cd nos solos no mundo decorre da utilização dessa prática agrícola (Van Assche, 1998).

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, ao se comer um único fruto de tomate contaminado pode-se ingerir mais de 2,0 mg de Cd, levando-se em consideração o teor de Cd observado nos frutos e que, aproximadamente, 90% do conteúdo do fruto é água. Este valor é 200 vezes superior ao limite crítico aceitável de ingestão diária de Cd por um ser humano. Muitos estudos mostram que a média diária de ingestão desse metal por seres humanos em áreas não contaminadas é de 10 a 25 μg (OECD, 1994). A Organização Mundial da Saúde estabeleceu que o limite semanal tolerável de ingestão de Cd é de 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal. Assim, um homem de 70 kg poderia ingerir semanalmente cerca de 70 μg de Cd, valores superiores a estes podem causar sérios riscos à saúde humana. Assim, ensaios com o objetivo de se caracterizar outras cultivares de tomate são importantes para verificar se este comportamento observado na cv. Micro-Tom se mantém e, assim, evitar o cultivo de tomate em áreas contaminadas por Cd.

Além dos teores de Cd na planta, outros fatores são considerados para se definir uma espécie como hiperacumuladora de metal pesado. Dentre esses, pode-se destacar os fatores de bioacumulação e de translocação e a taxa de extração do metal.

O fator de translocação, que é a relação entre os teores de metal na parte aérea e nas raízes, estima a capacidade da planta em translocar um metal das raízes para a parte aérea. Já o fator de bioacumulação é definido pela relação entre o teor do metal na planta e a sua concentração no solo. Para que uma planta possa ser denominada hiperacumuladora de um determinado metal, estes dois valores devem ser superiores a 1,0 (Sun et al., 2007; Cluis, 2004). No presente trabalho, estes dois fatores apresentaram comportamento similar nas espécies *S. americanum* (Figura 2A, B e C) e tomate, cv. Micro-Tom (Figura 6A, B e C), reduzindo-se linearmente com o incremento da dose de Cd no substrato. Os valores obtidos para estes dois fatores

foram superiores ao valor mínimo de 1,0. Os fatores de translocação foram de 1,8 e 19,3, respectivamente para *S. americanum* e tomate, cv. Micro-Tom, enquanto os fatores de bioacumulação foram de 6,1 e 55,6, respectivamente para *S. americanum* e tomate, cv. Micro-Tom (Figuras 2A e B e 6A e B). Estes valores foram superiores aos observados em *Solanum nigrum*, que apresentou valores de 1,6 e 8,3 para os fatores de translocação e bioacumulação, respectivamente (Sun et al., 2007). Outra espécie de planta, *Prosopis laevigata*, recentemente descoberta como hiperacumuladora de Cd, apresentou fator de bioacumulação superior a 100, sendo que plântulas crescidas em meio Murashige–Skoog acumularam altos teores de Cd nos tecidos, com valores superiores a 8000 mg kg⁻¹ (Buendía-González et al., 2010).

Outro fator que vem sendo utilizado para caracterização de espécies de plantas como hiperacumuladoras de metal é a taxa de extração de metal (Mertens et al., 2005). Este fator leva em consideração o teor de Cd e a massa seca da parte aérea da planta, o teor de Cd no solo e o volume de solo explorado pelas raízes. No presente estudo, as taxas máximas de extração do metal calculadas foram de 9,3 e 54,3%, respectivamente para *S. americanum* (Figura 2C) e tomate, cv. Micro-Tom (Figura 6C). Estes valores são muito altos, quando comparados aos observados em *S. nigrum* (1,1%), espécie definida como hiperacumuladora de Cd (Sun et al., 2007), e indicam também que tanto a espécie *S. americanum* quanto o tomate, cv. Micro-Tom, apresentam alta capacidade de absorver e acumular Cd.

Os valores obtidos para esses três fatores reforçam a hipótese de *Solanum americanum* e tomate, cv. Micro-Tom, serem espécies hiperacumuladoras de Cd, por apresentarem valores altos para teor desse metal na parte aérea, para taxa de translocação das raízes para a parte aérea, para o fator de bioacumulação e para a taxa de extração de metal. Estas características são essenciais para uso de espécies de

plantas na fitorremediação de áreas degradadas (Baker, 1981; Zhang et al., 2002; Fayiga & Ma, 2006). Segundo Fayiga & Ma (2005), para que uma planta apresente alto potencial como fitorremediadora é necessário que haja acumulação de grande quantidade do metal poluente na parte aérea. A retirada da parte aérea da planta crescida em áreas contaminadas pode auxiliar na fitorremediação destas áreas, de uma maneira ecologicamente correta, sem causar grande impacto ao ambiente, como outras técnicas de remediação atualmente utilizadas (Fayiga & Ma, 2005). Por outro lado, é preocupante o fato de uma espécie hiperacumuladora de Cd ser muito utilizada *in natura* na alimentação humana, como é o caso da cultivar de tomate Micro-Tom.

As estratégias utilizadas pelas plantas hiperacumuladoras em tolerarem altos teores de metal em seus tecidos estão sendo estudadas. Alguns trabalhos estão sendo realizados para elucidar como as enzimas antioxidantes agem nas plantas destas espécies hiperacumuladoras, como o tomate, cv. Micro-Tom. Com esse objetivo, alguns trabalhos foram realizados recentemente (Gratão et al., 2008). Um dos principais efeito fitotóxicos que o Cd causa às plantas é o estresse oxidativo, que produz espécies reativas de oxigênio, que são extremamente danosas a todos seres vivos, inclusive às plantas. Uma das formas de defesa das plantas à toxidez causada por Cd é aumentar a produção de enzimas antioxidantes que evitam a formação de espécies reativas de oxigênio. Os aumentos observados nas atividades das enzimas glutathione reductase (GR), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPOX) com incremento da dose de Cd no substrato foram suficientes para evitar o estresse oxidativo em plantas de tomate, cv. Micro-Tom (Gratão et al., 2008).

A caracterização de espécies de plantas como hiperacumuladoras de metais pesados, particularmente de Cd, é importante por permitir identificar aquelas mais

promissoras para um futuro estudo de mecanismos envolvidos na maior capacidade de absorver, translocar e acumular esse metal nos tecidos. Atualmente, são disponíveis algumas estratégias moleculares de identificação de genes que possam estar envolvidos nestes processos. No presente estudo, buscou-se identificar esses genes pelo uso de duas estratégias. A primeira baseou-se na identificação de genes ortólogos em tomate, cv. Micro-Tom, a genes previamente descritos na literatura em outras espécies como estando relacionados ao processo de maior tolerância de plantas a altos teores de Cd nos tecidos. A segunda estratégia utilizada visou identificar genes importantes em uma população silvestre de *A.thaliana*, onde alguns dos acessos foram identificados pela capacidade diferenciada de acumular Cd na parte aérea, para posterior aplicação deste conhecimento em espécies previamente descritas neste trabalho como hiperacumuladoras.

Muitos dos genes previamente descritos como relacionados ao acúmulo de Cd em espécies de plantas foram inicialmente descritos como transportadores de elementos essenciais, como Zn e Cu, por exemplo. Assim, o estudo do efeito de Cd na absorção e no acúmulo de elementos essenciais pode, de uma maneira geral, fornecer evidências importantes sobre os tipos de transportadores que esse metal pode utilizar. Os resultados deste tipo de trabalho podem indicar mecanismos pelos quais o Cd está sendo absorvido, translocado e acumulado nas plantas de espécies hiperacumuladoras.

O Cd é um metal pesado com propriedades muito similares às do elemento Zn, por exemplo, podendo se utilizar de seus transportadores para entrar e para ser translocado e acumulado nas plantas (Eren & Argüello, 2004). Exemplos destes transportadores que poderiam ser utilizados por Cd, são os da família HMA (transportadores de metal do tipo ATPase). Desta família de transportadores,

destacam-se o *HMA4*, o *HMA2* e o *HMA3*. O gene *HMA4*, que já é muito estudado, foi primeiro identificado como transportador de Zn e, posteriormente, verificou-se sua capacidade de também transportar Cd. A superexpressão de *HMA4* em *A. thaliana* aumenta tanto a translocação de Cd e Zn das raízes para a parte aérea quanto a tolerância da planta a estes metais (Verret et al., 2004). Esses mesmos autores também observaram que as plantas que superexpressam o *HMA4* na presença de Cd no meio apresentaram desenvolvimento de raízes primária e secundárias duas vezes maior do que as das plantas não transformadas. Assim, eles concluem que o gene *HMA4* e, provavelmente o *HMA2*, poderiam constituir-se em ferramentas biotecnológicas importantes para fitorremediação, já que o que se busca é justamente grande translocação de metal das raízes para a parte aérea.

No presente trabalho, tanto *S. americanum* quanto o tomate, cv. Micro-Tom, não alteraram a produção de massa seca de raízes em resposta ao incremento de doses de Cd no substrato, respectivamente até a dose de 16 mg kg⁻¹ de substrato (Figura 1B), e de 125 mg kg⁻¹ (Figura 3B). Esta pode ser uma estratégia de espécies de plantas hiperacumuladoras para manter o crescimento e desenvolvimento, mesmo sob altas doses desse metal. Em função dos resultados obtidos, os genes pertencentes à família HMA podem estar envolvidos neste processo nas duas espécies estudadas.

Outro gene importante descrito na literatura por estar relacionado à translocação de Cd é o *HMA2*. Segundo Eren & Argüello (2004), esse gene também é um transportador de Zn, que dirige seu efluxo para o compartimento extracelular, já que o mutante de *A. thaliana* não funcional para este gene aumenta os teores de Zn na planta em relação ao tipo silvestre. Como o gene *HMA2* possui alta especificidade

por metais e grande espectro de ação, ele pode estar controlando também os teores de metais pesados não essenciais, como por exemplo o Cd (Eren & Argüello, 2004).

O gene *HMA3*, que pertence à mesma família gênica do *HMA2*, apresenta papel importante na tolerância de plantas a metais pesados. Segundo Morel et al. (2009), este gene codifica uma proteína transmembrana vacuolar, que transloca metal pesado tóxico para dentro do vacúolo. Assim, estes autores verificaram que plantas mutantes de *A.thaliana* não funcionais para o gene *HMA3*, possuem maior sensibilidade ao Zn e ao Cd, assim como a sua superexpressão aumenta a tolerância e o acúmulo de metais nos tecidos. Estes trabalhos citados envolvendo transportadores da família HMA demonstram a importância das relações de absorção e acúmulo de íons nas plantas sob diferentes exposições a metais pesados, para se definir estratégias de estudos com objetivo de identificar genes relacionados à absorção, à translocação e ao acúmulo de metais pesados em plantas.

Além do estudo de dados encontrados na literatura, buscou-se também neste trabalho identificar novos genes relacionados ao maior acúmulo de Cd em plantas. Para tanto, utilizou-se uma população silvestre de *A. thaliana* coletada em diversos locais do mundo. Pela análise do ionoma dos diferentes acessos, foram identificados os que apresentavam comportamento diferenciado quanto ao teor de Cd na parte aérea. Após seleção desse acesso, buscou-se o mapeamento do gene que estaria determinando este fenótipo. A análise da progênie obtida pelo cruzamento entre o acesso de *A.thaliana* CS28181 (baixo Cd) e o Col-0 (alto Cd) demonstrou distribuição normal da população (Figura 10), que é consistente com a hipótese de que o fenótipo com baixo teor de Cd no acesso CS28181 é controlado só por um locus ou por vários *loci* muito próximos, com forte ligação entre si ($p < 0,01$, teste de Shapiro para normalidade). O mapeamento dos genes revelou que o fenótipo baixo

Cd é determinado por uma região do genoma no cromossomo 4, onde se encontram situados, em sequência, os genes *HMA2* e *HMA3* (Figuras 11 e 12). Este resultado salienta ainda mais a importância destes dois genes no acúmulo de Cd em plantas. Assim, baseado neste resultado e nos previamente descritos na literatura, foram selecionados os genes *HMA2* e *HMA3* para estudos mais aprofundados em tomate, cv. Micro-Tom.

Após mapeamento da região do genoma que estaria determinando o fenótipo de baixo Cd na parte aérea no acesso de *A.thaliana* CS28181, outras análises foram realizadas para comprovar a funcionalidade dos genes *HMA2* e *HMA3* nas espécies *A. thaliana* e tomate, cv. Micro-Tom. Em *A.thaliana* houve maior expressão do gene *HMA2* na parte aérea do acesso que apresenta fenótipo com baixo teor de Cd do que no acesso controle Col-0 (Figura 14B). Já em tomate, cv Micro-Tom, a expressão desse gene na parte aérea da planta aumentou na presença de Cd. (Figura 8B). Estes resultados indicam que o *HMA2* pode estar relacionado, pelo mesmo mecanismo, tanto a menor acumulação de Cd em *A. thaliana* quanto a alta tolerância a esse metal da cultivar de tomate Micro-Tom. Segundo Eren & Argüello (2004), a maior expressão do gene *HMA2* reduz a toxidez de Cd nas plantas, pelo seu envolvimento no processo de efluxo desse metal para o compartimento extracelular e para o floema, distribuindo e diluindo a sua concentração na planta. Assim, havendo maior expressão de *HMA2*, a planta reduz o teor de Cd nas células, com consequente diminuição de seu efeito fitotóxico.

Com relação ao gene *HMA3*, a sua expressão aumentou tanto em raízes (Figura 8C) do acesso de *A.thaliana* CS28181 (baixo Cd) quanto na parte aérea (Figura 14B) de tomate, cv. Micro-Tom, na presença de Cd. Esse gene está relacionado à detoxificação de células, pelo transporte de metais pesados para o

vacúolo (Morel et al., 2009). Esse fato foi comprovado pela superexpressão de *HMA3* em *A.thaliana*, que aumenta a tolerância e o teor de Cd nos tecidos da planta (Morel et al., 2009). Assim, este pode ser outro mecanismo que as plantas dessa espécie estejam potencialmente utilizando para tolerar altas doses de Cd nos tecidos e manter seu crescimento e desenvolvimento.

Desta forma, o estudo de acúmulo de metais pesados em plantas, em especial do Cd, é extremamente importante para poder identificar quais espécies possuem maior capacidade de absorção, translocação e acúmulo deste metal nos tecidos. Essas espécies poderiam ser utilizadas diretamente na fitoextração do metal contaminante do solo ou como modelo para estudos para elucidação de mecanismos envolvidos neste processo. Outro ponto importante do estudo de espécies hiperacumuladoras de metais pesados é que, a partir de sua identificação e do entendimento dos mecanismos pelos quais as plantas acumulam altos teores de metal, poder-se-ia evitar a entrada de metais pesados na cadeia alimentar.

Assim, neste trabalho foram identificadas duas espécies hiperacumuladoras de Cd. Baseado nos resultados obtidos, a espécie de solanácea silvestre *S. americanum* pode ser considerada uma planta hiperacumuladora de Cd e pode ser utilizada tanto diretamente na fitorremediação, como em estudos para elucidação de mecanismos envolvidos nos processos de absorção, translocação e acúmulo de metais pesados em plantas. Porém, outros fatores devem ser analisados antes de se indicar uma espécie para fitorremediação de áreas contaminadas com Cd. Inicialmente, deve-se realizar estudos sobre o consumo de suas plantas por animais herbívoros, por exemplo, como estratégia para evitar a sua entrada na cadeia alimentar.

A segunda espécie identificada, o tomate cv. Micro-Tom, apresenta um ponto importante e diferenciado que é o fato de acumular altos teores de Cd na parte aérea e

de translocá-lo para os frutos, muito consumidos e apreciados em todo o mundo. Assim, o cultivo dessa cultivar de tomate não é recomendado para fitoextração em áreas contaminadas, mas pode ser uma espécie modelo para estudos para elucidar os mecanismos envolvidos. Segundo Meissner et al. (1997), a cultivar de tomate Micro-Tom apresenta grande potencial como espécie modelo, devido à reduzida estatura de planta, à produção de sementes viáveis e ao rápido ciclo de desenvolvimento. Sendo hiperacumuladora de Cd, essa cultivar constitui-se em excelente objeto de estudo para esclarecimento de como estas espécies capazes de acumular altos teores de metais pesados em seus tecidos minimizam seus efeitos fitotóxicos.

Desta forma, o tomate, cv. Micro-Tom apresenta grande potencial para estudo de mecanismos envolvidos na absorção, na translocação, no acúmulo e na detoxificação de Cd em plantas. Isso se deve a vários fatores avaliados nesta pesquisa como: a) tolerância a altas doses do metal, sem alterar significativamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas; b) alta capacidade de absorver, translocar e acumular Cd nos tecidos das plantas, podendo ser definida como uma espécie hiperacumuladora de Cd; c) o tomate é considerado uma espécie modelo para estudos genéticos e moleculares, especialmente a cv. Micro-Tom, utilizada neste trabalho e d) presença de mecanismos potenciais de detoxificação do metal, como por exemplo indução da expressão dos genes *HMA2* e *HMA3*.

Assim, um mecanismo de tolerância que o tomate, cv. Micro-Tom, pode estar utilizando para tolerar altos teores de Cd é, possivelmente, a maior expressão dos genes *HMA2* (na parte aérea) e *HMA3* (nas raízes) na presença desse metal pesado. Um estudo de análise funcional desses dois genes que foram identificados em tomate, cv. Micro-Tom, seria importante para se comprovar a sua importância nos processos de detoxificação e acúmulo de Cd nos tecidos.

6 CONCLUSÕES

As espécies de plantas *Solanum americanum* e *Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom podem ser classificadas como hiperacumuladoras de cádmio, por apresentarem a) teores desse metal pesado na parte aérea da planta superiores ao limite mínimo de 100 mg kg⁻¹, b) fatores de bioacumulação e de translocação superiores a 1,0 e c) alta taxa de extração desse metal.

O cultivo de tomate, cv. Micro-Tom absorvem e translocam alta quantidade deste metal pesado para a parte aérea e, especialmente para os frutos.

O baixo teor de Cd no tecido observado no acesso de *Arabidopsis thaliana* CS28181 em relação ao controle Col-0 deve-se, possivelmente, à diferença de expressão dos genes *HMA2* e *HMA3* ocasionada, provavelmente, por alterações em suas estruturas.

Os genes *HMA2* e *HMA3*, inicialmente identificados em *Arabidopsis thaliana*, também estão presentes em tomate, cv. Micro-Tom, e podem estar envolvidos nos processos de maior tolerância e acúmulo de cádmio nessa espécie.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, S.; TICCONI, C.A.; DELATORRE, C.A. Phosphate sensing in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.115, n.1, p.1-8, 2002.
- ANDRES-COLAS, N., et al. The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. **The Plant Journal**, Oxford, v.45, n.2, p.225–236, 2006.
- ARGENTA, G., et al. Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.13, n.2, p.158-167, 2001.
- ARGÜELLO J.M. Identification of ion selectivity determinants in heavy metal transport P1B-type ATPases. **The Journal of Membrane Biology**, Nova Iorque, v.195, n.2, p.93–108, 2003.
- ARRIVAUULT, S.; SENGER, T.; KRAMER, U. The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. **The Plant Journal**, Oxford, v.46, n.5, p.861–879, 2006.
- BAKER, A.J.M. & BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, Nova Iorque, v.1, n.2, p.81–126, 1989.
- BAKER, A.J.M.. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, Nova Iorque, v.3, n.4, p.643–654, 1981.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, Nova Iorque, v.13, n.1, p.1-37, 1990.
- BECHER, M., et al. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **The Plant Journal**, Oxford, v.37, n.2, p.251–268, 2004.
- BROOKS, R.R., et al. Phytomining. **Trends in Plant Science**, Nova Iorque, v.3, n.9, p.359-362, 1998.
- BUENDÍA-GONZÁLEZ, L., et al. *Prosopis laevigata* a potential chromium (VI) and cadmium (II) hyperaccumulator desert plant. **Bioresource Technology**, Nova Iorque, v.101, n.15, p.5862-5867, 2010.
- CLEMENS, S.; PALMGREN, M.G.; KRÄMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, Nova Iorque, v.7, n.7, p.309–315, 2002.

- CLUIS, C. Junk-greedy greens: phytoremediation as a new option for soil decontamination. **BioTeach Journal**, Vancouver, v.2, n.1, p., 60–67, 2004.
- COBBETT, C.S.; WONG, C.K. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, Oxford, v.181, n.,1 p.71–78, 2009.
- 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, n.2, p.1052–1065, 2007.
- D'ARCY, W.G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; NEE, M; ESTRADA, N. (Eds.) **Solanaceae III: Taxonomy, Chemistry, Evolution**. Kew: The Royal Botanic Gardens/London: The Linnean Society of London. p.75-137, 1991.
- DELATORRE, C.A.. et al. *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. **The Plant Journal**, Oxford, v.37, n.1, p.801-814, 2004.
- DESBROSSES-FONROUGE, A.G., et al. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.579, n.19, p.4165, 2005.
- EBBS, S.D.; SANKARAN, R.P. Transport of Cd and Zn to seeds of Indian mustard (*Brassica juncea*) during specific stages of plant growth and development. **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v.132, n.1, p.69–78, 2008.
- ECKHARDT, U.; MAS, M.A.; BUCKHOUT, T.J. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.45, n.4, p.437–448, 2001.
- 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 USA**, Washington, v.93, n.11, p.5624–5628, 1996.
- ELLIS, D.R., et al. Production of S methyl selenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. **BioMed Center Plant Biology**, v.4, n.1, p.1-11, 2004.
- EREN, E.; ARGÜELLO J.M. *Arabidopsis HMA2*, a Divalent Heavy Metal-Transporting P IB-Type ATPase, Is Involved in Cytoplasmic Zn²⁺ Homeostasis1. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, n.3, p.3712–3723, 2004.
- ERNST, W.H.O. Phytoextraction of mine wastes e options and impossibilities. **Chemie der Erde**, v.65, n.1, p.29-42, 2005.
- FAN, J., et al. Excessive sulfur supply reduces cadmium accumulation in brown rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental Pollution**, London, v.158, n.2, p.409-441, 2009.
- FAYIGA, A.O.; MA, L.Q. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, Norwell, v.168, n.4, p.71–89, 2005.
- FAYIGA, A.Q.; MA, L.Q. Using phosphate rock to immobilize metals in soils and increase arsenic uptake in *Pteris vittata*. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.359, n.3, p.17–25, 2006.

- FIEHN, O., et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature Biotechnology**, London, v.18, n.1, p.1157–1161, 2000.
- GAITHER, L.A.; EIDE, D.J. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, n.8, p.5560–5564, 2000.
- GRASS, G., ET al. ZupT is a Zn(II) uptake system in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.184, n.3, p.864–866, 2002.
- GRATÃO, P.L. **Resposta de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) ao cádmio**. 2008. 115f. : Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2008.
- GROTZ, N., et al. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.95, n.12, p.7220–7224, 1998.
- GUARANHA, J.R.M. Estudos preliminares sobre o gênero *Cestrum* L. (Solanaceae). **Loefgrenia**, Porto Alegre, v.73, n.1, p.1-15, 1981.
- GUARANHA, J.R.M. Solanaceae no Rio Grande do Sul – *Acnistus* Schott. **Roessléria**, Porto Alegre, v.6, n.1, p.405-412, 1984.
- GUERINOT, M.L. The ZIP family of metal transporters. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1465, n.2, p.190–198, 2000.
- GULLNER, G.; KÖMIVES, T.; RENNENBERG, H. Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.358, p. 971–979, 2001.
- HALL, J.L.; WILLIAMS, L.E. Transition metal transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.393, p.2601–2613, 2003.
- HANIKENNE, M., et al. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. **Nature**, London, v.453, n.7193, p.391–395, 2008.
- HIRAYAMA, T., et al. RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v.97, n.3, p.383–393, 1999.
- HUNZIKER, A.T. South American Solanaceae: a synoptiic survey. In: HAWKES, J.G.; LESTER, R.N.; SKELDING, A.D. (Eds.) **The Biology and taxonomy of the Solanaceae**. London: Academic Press. (linnean Society Symposium Series, 7). p.49–85, 1979.
- HUSSAIN, D., et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v.16, n.5, p.1327–1339, 2004.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton, CRC Press Inc., 2001.
- KOLLER, A., et al. Proteomic survey of metabolic pathways in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.99, n.1, p.11969–11974, 2002.

- KORENKOV, V., et al. Enhanced Cd²⁺-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing Arabidopsis cation exchangers. **Planta**, Berlin, v.225, n.2, p.403–411, 2007.
- 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**, Berlin, v.226, n.6, p.1379–1387, 2007.
- 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.
- KRAMER, U.; CHARDONNENS, A.N. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.55, n.6, p.661-672, 2001.
- LAHNER, B., et al. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Biotechnology**, London, v.21, .10, p.1215–1221, 2003.
- LASAT, M. M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazardous Substance Research**, Manhattan, v.2, n.1, p.1-25, 2000.
- LAUWERYS, R. R. Health Maintenance of Workers Exposed to Cadmium, The Cadmium Council, Inc., New York, NY, 1986.
- LEDUC, D.L.; TARUN, A.S.; MONTES-BAYON, M. Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation. **Plant Physiology**, Rockville, v.135, n. 1, p.377–383, 2004.
- LEITA, L. et al. Transpiration dynamics in cadmium-treated soybean (*Glycine max* L.) plants. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Singapura, v.175, n.3, p.153-156, 1995.
- LEONHARDT, T.N., et al. Microarray expression analysis of *Arabidopsis* guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. **The Plant Cell**, Stanford, v.16, n.3, p.596–615, 2004.
- MA, B. L.; MORRISON, M. J.; DWYER, L. M. Canopy light reflectance and field greenness to assess nitrogen fertilization and yield in New York. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 88, n. 6, p. 915-920, 1996.
- MACDIARMID, C.W.; GAITHER, L.A.; EIDE, D.J. Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, London, v.19, n.12, p.2845–2855, 2000.
- MACNICOL, R.D.; BECKETT, P.H.T. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. **Plant and Soil**, Melbourne, v.85, n.1, p.107-129, 1985.
- Martzivanou, M.; Hampp, M. Hyper-gravity effects on the *Arabidopsis* transcriptome. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.118, n.2, p. 221–231, 2003.
- MCGRATH, S. P.; ZHAO, F.J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion of Biotechnology**, London, v.14, n.3, p.277-282, 2003.

- MCGRATH, S.P., et al. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. **Environmental Pollution**, London, v.141, n.1, p.115-125, 2006.
- MEISSNER, R., et al. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**, Oxford, v.12, n., p.1465–1472, 1997.
- MENTZ, L.A. **O gênero Solanum (Solanaceae) na região sul do Brasil**. 1999. 818f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.
- MENTZ, L.A.; OLIVEIRA, P.L. O gênero *Solanum* na Região Sul do Brasil. **Pesquisas**, Sér. Botânica, São Leopoldo, v.54, p.1-327, 2004.
- MERTENS, J.; LUYSSAERT, S.; VERHEYEN, K. Use and abuse of trace metal concentrations in plants tissue for biomonitoring and phytoextraction. **Environmental Pollution**, London, v.138, n.4, 2005.
- MILLS, R.F. et al. The plant P1B-type ATPase *AtHMA4* transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.579, n.3, p.783–791, 2005.
- MILLS, R.F., et al. Functional expression of *AtHMA4*, a P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. **The Plant Journal**, Oxford, v.35, n.2, p.164–176, 2003.
- 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 Ca²⁺/heavy metal pump. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.283, n.15, p.9633–9641, 2008.
- NIEBOER, E.; RICHARDSON, D. H. S. The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. **Environmental Pollution**, London, v.13, n.1, p.3-26, 1980.
- NRIAGU, J.O. Production and uses of mercury. In **The Biogeochemistry of Mercury in the Environment**, NRIAGU, J.O. (Eds.) Elsevier, Amsterdam, p. 23-40, 1979.
- NRIAGU, J.O.; PACYNA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. **Nature**, London, v. 33, n.6169, p. 134-139,1988.
- OBERLUNDER, H.E.;ROTH, K. Oberlunder and Roth In: SHEILA M. ROSS, (Eds.) **Toxic Metals in Soil–Plant Systems**. 1994, John Wiley and Sons, New York, 1978.
- OUTTEN, C.E.; O’HALLORAN, T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. **Science**, Washington, v. 292, n.1, 2488–2492, 2001.
- 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 USA**, Washington, v.97, n.9, p.4956–4960, 2000.
- PETERSON, P.; ALLOWAY, B. J. Cadmium in soils and vegetation. In WEBB, M. B. (Eds.), **The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium**, p.45-92, Elsevier/North-Holland and Biomedical Press, Amsterdam, 1979.
- PEUKE, A.D.; RENNENBERG, H. Phytoremediation. **EMBO Reports**, Oxford,

v.6, n. 6, p.497–501, 2005.

PILON-SMITS, E.; PILON, M. Phytoremediation of metals using transgenic plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.21, n.5, p.439-456, 2002.

PURDIE, R. W.; SYMON, D. E.; HAEGI, L. *Solanaceae*. **Flora of Australia**, Melbourne, v.29, n.1, p.1-208, 1982.

RAMBO, B. Solanaceae Riograndenses. **Pesquisas**, Série Botânica, São Leopoldo, v.5, n.11, p.1-67, 1961.

RASKIN, I. Plant genetic engineering may help with environmental cleanup. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.93, n.8, p.3164-3166, 1996.

ROBINSON, B.; FERNANDEZ, J.E.; MADEJÓN, T.; MURILLO, J.M.; GREEN, S.; CLOTHIER, B. Phytoextraction, an assessment of biogeochemical and economic viability. **Plant and Soil**, Melbourne, v.249, n.1, p. 117–125, 2003.

ROBINSON, B.H., et al. Phytoremediation for the management of metal flux in contaminated sites. **Forest Snow and Landscape Research**, Zurich, v.80, n.2, p.221-234, 2006.

ROGERS, E.E.; EIDE, D.; GUERINOT, M.L. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.97, n.22, p.12356–12360, 2000.

ROSA, O.S. & CAMARGO, C.E.O. **Wheat breeding for better efficiency in phosphorus use**. In: SAUNDERS, D.A., ed. Wheat for the nontraditional warm areas: a proceeding of the international conference. Foz do Iguaçu, United Nations Development Programme International Maize and Wheat Improvement Center, 1990. p.333-351.

SALT, D.E. Update on Plant Ionomics. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, n.1, p. 2451–2456, 2004.

SALT, D.E., et al. Natural Variants of AtHKT1 Enhance Na(+) Accumulation in Two Wild Populations of *Arabidopsis*. **PLoS Genetics**, San Francisco, v.2, n.12, p.e210, 2006

SALT, D.E.; BAXTER, I.; LAHNER, B. Ionomics and the Study of the Plant Ionome. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.59, n.1, p.709–33, 2008.

SALT, D.E.; KRAMER, U. **Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants**. In: Raskin I, Ensley BD (Eds.) Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Wiley, Nova Iorque, p. 231–245, 2000.

SCHILLING, E.E.; MA, Q.S.; ANDERSON, R.N. Common names and species identification in black nightshades, *Solanum* sect. *Solanum* (Solanaceae). **Economy Botany**, Nova Iorque, v.46, n.1, p.223-225, 1992.

SEIGNEURIN-BERNY, D., et al. HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.281, n.5, p.2882–2892, 2006.

SENDTNER, O. Solanaceae. In *Flora Brasiliensis* (C.F.P. von Martius, ed.). F. FLEISCHER, **Lipsiae**. v.10, 1846.

- SENESI, G.S., et al. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. **Chemosphere**, Oxford, v.39, n.2, p.343–377, 1999.
- SILVA, A. A. ; DELATORRE, Carla Andréa . Fósforo e nitrogênio: diferentes mobilidades no solo, diferentes estratégias das plantas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.8, n.1, p. 10-20, 2009.
- STEHMANN, J.R. **Estudos taxonômicos na tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave e Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehman e Semir**. 1999. 242f. Tese (Doutorado) - Unicamp, Campinas, 1999.
- STEHMANN, J.R. **Revisão taxonômica do gênero *Petunia* Juss. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 1989. 139f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.
- SUN, R.; ZHOU, Q.; JIN, C. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. **Plant and Soil**, Melbourne, v. 285, n.2, p.125–134, 2006.
- SUN, Y.; ZHOU, Q.; DIAO, C. Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Bioresource Technology**, Nova Iorque, v.99, n.5, p.1103–1110, 2008.
- SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.378, n.1, p.54–56, 2004.
- 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 United States of America**, Washington, v.97, n.9, p.4991–4996, 2000.
- 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** , Stuttgart, v.20, n.3, p.181-9, 2006.
- VAN ASSCHE, F. J. A Stepwise Model to Quantify the Relative Contribution of Different Environmental Sources to Human Cadmium Exposure, NiCad '98, Praga, República Checa, September 21-22, 1998.
- VAN HUYSEN, T.; TERRY, N.; PILON-SMITS, E.A. Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic Indian mustard overexpressing ATP sulfurylase or cystathione gamma synthase. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton v.6, n.1, p.111–118, 2004.
- VASSILEV, A., et al. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. **Science World**, Washington, v.4, n.4, p. 9–34, 2004.
- VASSILEV, A.; TSONEV, T.; YORDANOV, I. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. **Environment Pollution**, London, v.103, n.2, p.287–293, 1998.
- 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.306–312, 2004.
- 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, n.6, p.1515–1522, 2005.

VERT, G.; BRIAT, J.F.; CURIE, C. Arabidopsis *IRT2* gene encodes a root-periphery iron transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v.26, n.2, p.181–189, 2001.

VIGNOLI-SILVA, M. **Os gêneros *Nicotiana* L., *Bouchetia* Dunal e *Nierembergia* Ruiz & Pav. (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2004. 148f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

VIGNOLI-SILVA, M.; MENTZ, L.A. O gênero *Bouchetia* Dunal (Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, Porto Alegre, v.54, p.75-106, 2005.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, A.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, Nova Iorque, v.57, n.5, p.701–710, 2001.

VOSKOBOINIK, I., et al. The regulation of catalytic activity of the menkes copper-translocating P-type ATPase. Role of high affinity copper-binding sites. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.276, n.30, p.28620–28627, 2001.

WASKOM, R.M., et al. Monitoring nitrogen status of corn with a portable chlorophyllmeter. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Nova Iorque, v.27, n.3, p.545-560, 1996.

WEI, S.H., et al. A newly-found Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v.49, n.1, p.2568–2573, 2004.

WILLIAMS, L.E.; PITTMAN, J.K.; HALL, J.L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1465, n.1, p.104–126, 2000.

WILLIAMS, R.J.P. Chemical selection of elements by cells. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v.216-217, n.1, p.583–595, 2001.

ZHANG, W.H., et al. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.300, n.3, p.167–177, 2002.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.93, n.6, p.2454–2458, 1996.

ZHAO, H.; EIDE, D. The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.271, n.38, p.23203–23210, 1996.

ZHOU, Q.X., SONG, Y.F. **Principles and Methods of Contaminated Soil Remediation.** Beijing, Science Press, 2004

8 VITA

Adriano Alves da Silva, filho de Paulo Regis Ferreira da Silva e Sueli Alves da Silva, nasceu em Porto Alegre, estado do Rio Grande do Sul em 04 de julho de 1980.

Cursou o primeiro e segundo graus no Colégio Champagnat, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. No ano de 2000 ingressou no Curso de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, onde se graduou como Engenheiro Agrônomo em 11 de janeiro de 2005. Em março de 2005 ingressou no Curso de Mestrado em Fitotecnia, do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul obtendo o título de Mestre em Fitotecnia em março de 2007. Ainda em março de 2007, ingressou no Curso de Doutorado, no mesmo Programa de Pós-Graduação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal, no Departamento de Fitossanidade. Realizou no período de março de 2009 a março de 2010, o estágio de doutoramento na Purdue University, localizada no estado de Indiana, nos Estados Unidos.