

NAYARA NOLASCO MADEIRA

**TOXICIDADE DE CADMIO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA E DE
TABACO EXPRESSANDO OS GENES BIP E ALDEÍDO DESIDROGENASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M181t
2014
Madeira, Nayara Nolasco, 1986-
Toxicidade de cádmio em plantas transgênicas de soja e de
tabaco expressando os genes BIP e aldeído desidrogenase /
Nayara Nolasco Madeira. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Renildes Lúcio Ferreira Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.45-52.

1. Plantas transgênicas. 2. Toxicidade - Cádmio.
3. Aldeído desidrogenase. 4. Metais pesados. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Solos. Programa de
Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas. II. Título.

CDD 22. ed. 631.5233

NAYARA NOLASCO MADEIRA

**TOXICIDADE DE CADMIO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA E DE
TABACO EXPRESSANDO OS GENES BIP E ALDEÍDO DESIDROGENASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de Novembro de 2014.

Leonardus Vergütz

Anésia Aparecida dos Santos

Júlio César Lima Neves
(Coorientador)

Renildes Lúcio Ferreira Fontes
(Orientador)

Aos meus queridos e amados pais, Marlene e José Madeira, pelo imenso esforço, apoio e confiança em mim depositados, e principalmente pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Vinícius, pelo carinho e cumplicidade.

À minha filha, Maria Eduarda, razão da minha vida.

Com todo amor e carinho,

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Marlene e Madeira, pelo apoio e dedicação em minha formação e pela educação recebida em todos os momentos de minha vida. Ao meu irmão, Vinícius, pela amizade e carinho e a toda minha família que rezou e torceu por mim durante esse período.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao professor Renildes Lúcio Ferreira Fontes, pela orientação, confiança, dedicação, compreensão e incentivo durante todos os momentos deste trabalho.

Aos professores Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Júlio Cesar Lima Neves, pela coorientação, confiança, atenção e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Victor Hugo Alvarez V., pelas valiosas sugestões e esclarecimentos e pelo grande exemplo de cientista que é.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela boa convivência e aprendizado.

A todos os colegas do Departamento de Solos (DPS), pela convivência harmoniosa, pela ajuda na condução dos experimentos e pela felicidade proporcionada a cada dia de trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP), pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pela paciência e amizade. Especialmente ao Pedro, pelo carinho, compreensão, companheirismo e pelo auxílio nas análises laboratoriais, imprescindíveis à realização desse trabalho.

Aos funcionários do DPS e do LBMP, sempre dispostos a ajudar. Em especial ao Júlio e ao Geovane pela presteza e auxílio na montagem e condução dos experimentos na casa de vegetação; ao Carlos e ao Lula, pelo auxílio nas análises laboratoriais; à Luciana, ao Virgílio, ao Adriano, à Marlene e à Glaucia pelo apoio.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

Sumário

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Toxicidade de cádmio às plantas	2
2.2. Binding Protein (BiP)	5
2.3. Aldeído desidrogenase (ALDH7)	6
CAPÍTULO I	8
TOXICIDADE DE CÁDMIO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA EXPRESSANDO O GENE BIP.....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1. Material Vegetal.....	10
2.1.1. Obtenção das mudas de soja	10
2.1.2. Extração do DNA genômico dos possíveis transformantes de soja	10
2.1.3. Reação de PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)	11
2.2. Escolha das doses de Cd aplicadas nos tratamentos	11
2.3. Condução do ensaio	12
2.4. Determinação do teor de Cd nas plantas.....	12
2.5. Cálculos da redução relativa de matéria seca (RRMS) e do índice de translocação (IT)	13
2.6. Análises estatísticas	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Obtenção e análise molecular das plantas transgênicas	14
3.2. Sintomas visuais.....	15
3.3. Efeito do cádmio sobre a produção de matéria seca	19
3.4. Absorção e distribuição de cádmio nas plantas.....	21
CAPÍTULO II.....	25
TOXICIDADE DE CÁDMIO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO EXPRESSANDO O GENE ALDH7	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Material Vegetal.....	27
2.1.1. Obtenção das mudas de tabaco	27

2.1.2. Extração do DNA genômico dos possíveis transformantes de tabaco	28
2.1.3. Reação de PCR (Polimerase Chain Reaction)	28
2.2. Condução do ensaio	28
2.3. Determinação do teor de Cd nas plantas	30
2.4. Determinação do conteúdo de Cd nas plantas	30
2.5 Cálculos da redução relativa de matéria seca (RRMS) e do índice de translocação (IT) .	30
2.6. Análises estatísticas	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.1. Obtenção e análise molecular das plantas transgênicas	31
3.2. Sintomas visuais.....	32
3.3. Efeito do cádmio sobre a produção de matéria seca	36
3.4. Absorção e distribuição de cádmio nas plantas.....	38
RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS	43
REFERÊNCIAS	45

RESUMO

MADEIRA, Nayara Nolasco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Novembro de 2014. **Toxicidade de cádmio em plantas transgênicas de soja e de tabaco expressando os genes BiP e aldeído desidrogenase.** Orientador: Renildes Lúcio Ferreira Fontes. Coorientadores: Elizabeth Pacheco Batista Fontes e Júlio César Lima Neves.

A contaminação do solo e da água com metais pesados é um crescente problema ambiental em todo o mundo. Dentre os metais pesados está o cádmio (Cd), que é altamente tóxico para humanos, animais e plantas. A toxicidade desse metal causa estresse oxidativo nas plantas, afetando de maneira negativa seu crescimento e metabolismo, desencadeando alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares que limitam a produtividade das culturas. A expressão de alguns genes confere às plantas maior capacidade de enfrentar os estresses, aumentando sua tolerância a condições adversas do ambiente. Trabalhos desenvolvidos com plantas transgênicas mostraram que a expressão ectópica dos genes *BiP* e *ALDH7* confere tolerância aos estresses hídrico e salino nas plantas. Estas observações levaram à hipótese de que as vantagens adquiridas com a expressão ectópica de *BiP* e *ALDH7* nas plantas poderiam também ser efetivas contra toxicidade por metais pesados. Os objetivos deste trabalho foram estudar a toxicidade de Cd em plantas de soja e de tabaco, avaliando seu efeito no crescimento da planta e caracterizando os sintomas de toxidez; e avaliar se plantas transgênicas de soja superexpressando *BiP* e plantas transgênicas de tabaco expressando *ALDH7* apresentam tolerância ao estresse causado por excesso de Cd. As linhagens de soja transformadas utilizadas neste trabalho foram 35S:BIP-2 e 35S:BIP-4, e para o tratamento controle, foram utilizadas linhagens não-transformadas (“wild type”) (WT). As plantas de soja foram cultivadas durante oito dias em solução nutritiva contendo Cd nas doses 0; 0,5; 1,5; 3,0 mg L⁻¹. As linhagens de tabaco transformadas utilizadas foram TP55-S3 (senso) e TP55anti-4 (anti-senso), e para o tratamento controle, foram utilizadas linhagens não-transformadas (“wild type”). As plantas de tabaco foram cultivadas durante quatro dias em solução nutritiva contendo Cd nas doses 0; 5,5 e 22,5 mg L⁻¹. A produção de matéria seca nas plantas das três linhagens de soja estudadas diminuiu com o incremento das doses de Cd na solução nutritiva, no entanto, a linhagem WT apresentou sensibilidade ao Cd significativamente maior do que as linhagens transgênicas, em termos de redução relativa de matéria seca. O teor e o conteúdo de Cd aumentaram tanto na raiz como na parte aérea das plantas das três

linhagens de soja, entretanto, as linhagens transgênicas apresentaram maior capacidade de absorver o Cd e transportá-lo para a parte aérea, em comparação com a linhagem WT. Com o incremento das doses de Cd na solução nutritiva, a retenção de Cd aumentou no sistema radicular da soja, nas três linhagens. Os sintomas de toxidez de Cd se caracterizaram pelo aparecimento de manchas avermelhadas nos caules, pecíolos e nervuras das folhas, folhas cloróticas, encarquilhadas, murchas e secas, liberação de exsudados avermelhados nos caules e redução do crescimento. Nas plantas expostas à maior dose de Cd, esses sintomas foram mais brandos nas linhagens transgênicas, superexpressando BiP em comparação às plantas controle. Isso sugere a possibilidade dessas plantas apresentarem mecanismo de tolerância ao Cd. Nas três linhagens de tabaco estudadas, a produção de matéria seca das plantas diminuiu com o incremento das doses de Cd na solução nutritiva, no entanto, a linhagem anti-senso apresentou sensibilidade ao Cd significativamente maior do que as linhagens senso e WT, em termos de redução relativa de matéria seca. O incremento nas doses de Cd na solução nutritiva resultou em aumento do teor de Cd tanto nas raízes como na parte aérea das plantas das três linhagens, apresentando pequena variação entre estas. Houve maior absorção de Cd pelas plantas senso e WT, sendo que essa diminuiu com o aumento das doses de Cd na solução nutritiva. A linhagem anti-senso apresentou menor absorção de Cd devido à maior intensidade de danos no sistema radicular, em consequência da sua maior sensibilidade à toxidez do Cd. Houve maior acúmulo de Cd na parte aérea do que na raiz das três linhagens. As plantas apresentaram danos severos no sistema radicular, murcha acentuada, manchas avermelhadas nas nervuras das folhas, encarquilhamento das folhas novas, clorose internerval e redução do crescimento, sendo esses sintomas mais severos nas plantas anti-senso. Não se observou nenhuma vantagem adquirida com a expressão da proteína ALDH7A nas plantas de tabaco. Entretanto, os resultados sugerem que a expressão do ALDH7A em tabaco pode ser importante para ativar mecanismos de resposta ao estresse oxidativo causado pelo Cd nas plantas uma vez que, mesmo não tendo sido observada tolerância diferencial das plantas senso em relação às plantas WT, a supressão da expressão desse gene nas plantas anti-senso levou a maiores danos causados pelo Cd.

ABSTRACT

MADEIRA, Nayara Nolasco, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2014. **Cadmium toxicity in BiP and ALDH7 expressing plants.** Adviser: Renildes Lúcio Ferreira Fontes. Co-advisers: Elizabeth Pacheco Batista Fontes and Júlio César Lima Neves.

The contamination of the soil and water with heavy metals is one of the biggest problem in the environment in the world. Cadmium (Cd) is a heavy metal highly toxic to humans, animals and plants. Cd toxicity causes oxidative stress in plants, which affects the growing and metabolism in a negative way. Moreover, in Cd contaminated areas, it promotes biochemical and physiological changes, which are associated with lower productivity in the crops around the world. It is known that some genes are able to help the plants to cope with different kind of stresses, in such a way that there is an increase in the plant tolerance to adverse environmental conditions. Transgenic plants, which overexpress BiP and ALDH7 genes, have shown tolerance to hydric and salinity stresses. This kind of occurrence has led to the hypotheses that those genes could confer tolerance to heavy metal toxicity. In this work, the focus was the study of the effects of Cd toxicity in soybean and tobacco in plants expressing BiP and ALDH7, respectively. It was evaluated the plant growth under Cd exposure, it was characterized the symptoms of Cd toxicity in those plants and evaluated if the transgenic lines are more tolerant to Cd stress. In the soybean experimental work, it was used two different transgenic lines of BiP (35S-BiP2 and 35S-BiP4) and a non-transgenic line (wild type) (WT) as a control. Soybean plants were grown in hydroponic conditions in Cd enriched nutrient solutions during eight days, to evaluate the effect of different Cd concentrations 0; 0,5; 1,5; 3,0 mg L⁻¹ in transgenic and non-transgenic plant growth. Dry matter weight decreased in all soybean lines as a result of increased Cd concentration in the nutrient solution. However, the WT line showed higher relative reduction of dry weight compared to the soybean transgenic lines, which suggests a higher sensibility of the WT to Cd toxicity. Cadmium concentrations and contents increased in roots and shoots of soybean as the Cd in nutrient solution was increased and, although the transgenic lines had higher efficiency to transport Cd to the leaves, Cd retention was higher in roots than shoots, for the three lines. Cadmium toxicity symptoms in soybean were characterized by red spots on the stem and petioles, redness in leaf nervures, chlorosis, wrinkled leaves, release of red exudates in the stem and decrease in growth. In plants grown exposed to the highest Cd concentration, these symptoms were less apparent in the

transgenic lines plants as compared to the control plants. The results found for the soybean BiP overexpressing lines indicate the possibility that those plants have a mechanism that helps the plant to cope with Cd toxicity and make them more tolerant than the WT plants. The experiment with tobacco was performed with plants that express the ALDH7 in sense orientation (TP55-S3) and antisense orientation (TP55anti-4) and non-transgenic plants (wild type) as control. The tobacco plants were grown in nutrient solutions that received Cd at the concentrations 0; 5.5 e 22.5 mg L⁻¹, by four days. The three tobacco lines showed a decrease in dry weight production when Cd concentration was raised in nutrient solution. The line TP55anti-4 presented a higher sensibility to Cd compared to WT and TP55-S3 lines, when the data of relative decrease in dry matter yield were compared. Cadmium concentrations in roots and shoots increased as a result of the raise in the Cd concentrations in the nutrient solutions, for the three lines, with low variation among them. Cadmium absorption was higher in WT and TP55-S3 plants and decreased when the solution Cd concentration was raised. The lower Cd absorption in TP55anti-4 was due to more severe damage that occurred in its root system, which is related to the higher sensibility of those plants to Cd toxicity. Cadmium accumulation was higher in shoots than in roots for the three tobacco lines. It was observed severe damage in the root system, along with loss of cell turgor, red spots in the leaves nervures, wrinkled leaves, chlorophyll loss and decrease in growth. All these symptoms were more severe in the TP55anti-4 line. Even though no acquired advantage had been observed in the tobacco plants expressing ALDH7A as compared to the WT plants, the results indicate that the expression of the ALDH7A in tobacco may be important to activate a tolerance mechanism to cope the oxidative stress caused by Cd. This is based on the observation that although no differential tolerance had been observed for the sense plants as compared to the WT plants, the suppression of this gene in the TP55anti-4 plants has led to more severe damage caused by Cd toxicity in those plants.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas constantemente são submetidas a condições de estresses bióticos e abióticos, em especial aqueles causados por metais pesados, que afetam de maneira negativa seu crescimento e metabolismo, desencadeando alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares que limitam a produtividade agrícola.

O uso de fertilizantes, a queima de combustíveis fósseis, o intemperismo e a deposição atmosférica são exemplos de processos que podem introduzir metais pesados no ambiente. O cádmio é um desses metais. Em ecossistemas agrícolas, o acúmulo desse metal pode prejudicar a produtividade das culturas e, dependendo da sua concentração nas plantas, pode causar danos à saúde humana (Wagner, 1993). Mesmo quando presente em baixas concentrações, o Cd pode causar estresse oxidativo e desnaturação de proteínas, resultando em redução na atividade enzimática e na fotossíntese, danos às membranas, clorose, dentre várias outras mudanças metabólicas, assim como alteração do balanço nutricional das plantas (Kurdiziel *et al.*, 2004; Lösch, 2004).

O desenvolvimento de novos genótipos de plantas mais tolerantes a estresses bióticos e abióticos tem se tornado essencial para que a agricultura continue produzindo alimentos para a crescente população mundial, assim como gerando empregos e movimentando a economia.

BiP (“binding protein”) é uma proteína multifuncional envolvida na regulação de diversos processos celulares associados ao retículo endoplasmático e ALDH7 é uma enzima pertencente ao grupo das aldeído desidrogenases envolvida em mecanismos de detoxificação de aldeídos gerados em condições de estresses oxidativos. A expressão de alguns genes confere às plantas maior capacidade de enfrentar os estresses, aumentando sua tolerância a condições adversas do ambiente. Trabalhos desenvolvidos com plantas transgênicas expressando os genes que codificam BiP (Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011) e ALDH7 (Rodrigues *et al.*, 2006) mostraram que essas plantas apresentaram tolerância aos estresses hídrico e de salinidade. Estas observações levaram à hipótese de que as vantagens adquiridas com a expressão ectópica de BiP e ALDH7 nas plantas, conferindo tolerância aos estresses hídrico e de salinidade, poderiam, também, ser efetivas contra toxicidade por metais pesados.

Os objetivos deste trabalho foram: estudar a toxicidade de Cd em plantas de soja e tabaco, avaliando seu efeito no crescimento da planta e caracterizando os sintomas de toxidez; e avaliar se plantas transgênicas de soja superexpressando BiP e plantas transgênicas de tabaco expressando ALDH7 apresentam tolerância ao estresse causado por excesso de Cd.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxicidade de cádmio às plantas

O cádmio (Cd) é um metal pesado que afeta negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Hasan *et al.*, 2009). É um elemento tóxico, mesmo quando presente em baixas concentrações (Guimarães *et al.*, 2008). Os efeitos da toxicidade desse elemento podem ser observados desde a germinação, pois sua presença em níveis altos no ambiente onde as sementes são postas a germinar reduz a atividade das α e β amilases, comprometendo a respiração (Chugh e Sawhney, 1996) e resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (Kabata-Pendias e Pendias, 2000; Shaw *et al.*, 2004).

O Cd é facilmente absorvido pelas raízes das plantas e, uma vez acumulado em níveis tóxicos, pode interferir em um número de processos metabólicos, incluindo a fotossíntese e a respiração (Hasan *et al.*, 2009). A quantidade de Cd que se acumula nas raízes ou transloca para as folhas e a intensidade dos seus efeitos sobre as plantas variam consideravelmente entre as espécies e são dependentes de vários fatores, incluindo a concentração e duração da exposição ao metal (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006). Normalmente, o Cd é retido nas raízes e apenas pequenas quantidades são transportadas para as folhas (Cataldo *et al.*, 1983). A translocação do Cd de folhas para frutos é baixa e o conteúdo em grãos de cereais oriundos de solos altamente contaminados não excede 1 mg kg^{-1} (Mengel e Kirkby, 1982).

Níveis tóxicos de Cd podem levar a desnaturação de proteínas e ao estresse oxidativo, resultando em danos as membranas, redução na atividade enzimática e fotossíntese, clorose, dentre várias outras mudanças metabólicas (Guimarães *et al.*, 2008). O alvo potencial da ação de metais como o Cd são enzimas e proteínas que contem grupos sulfidril (SH) ligados entre si por ligações dissulfeto (Kurdziel *et al.*,

2004; Lösch, 2004). O Cd causa a oxidação destes grupos, destruindo as ligações dissulfeto ao reagir com o enxofre, resultando na desnaturação da proteína e na redução da atividade enzimática. Aparentemente, a acumulação de metal em excesso pode inibir as enzimas através da ligação a grupos catalíticos ativos ou causar a desnaturação de proteínas (Das *et al.*, 1997). Existem vários relatos sobre a inibição da atividade fotossintética causada pelo Cd (Kurdiziel *et al.*, 2004; Lösch, 2004; Küpper *et al.*, 2007). Estes distúrbios no metabolismo do cloroplasto ocorrem devido à inibição da biossíntese de clorofila e redução da atividade de enzimas envolvidas na fixação de CO₂ (Stobart *et al.*, 1985; DE Filippis e Ziegler, 1993). Nos tilacóides, o fotossistema II tem sido identificado como o principal alvo de atuação do Cd, sendo que o tratamento de *Thlaspi caerulescens* com 10 µmol L⁻¹ de Cd por quatro semanas reduziu a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (Kupper *et al.*, 2007).

A exposição das plantas a níveis tóxicos de Cd pode induzir estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, por sua vez, podem levar ao desencadeamento da apoptose (Romero-Puertas *et al.*, 2007). Espécies reativas de oxigênio são consideradas inevitáveis subprodutos do metabolismo aeróbico normal; no entanto, muitos estresses podem perturbar a homeostase celular, aumentando assim a produção de EROs (Mittler, 2002). O aumento dos níveis de radicais oxidantes está associado à peroxidação de lipídeos da membrana induzida pelo Cd (Devi e Prasad, 2004; Romero-Puertas *et al.*, 2006) e pode causar alteração na permeabilidade da membrana celular (Kabata-Pendias e Pendias, 2000), na fluidez e na conformação estrutural de enzimas ligadas a membrana, bem como as suas atividades (Devi e Prasad, 2004). Vestana *et al.* (2011) observaram que houve fortes aumentos na concentração de H₂O₂ e O₂⁻, aumentando a peroxidação lipídica, em plantas aquáticas (jacinto e salvínia) devido ao estresse induzido por Cd.

Além das enzimas antioxidativas, as plantas contam com antioxidantes de baixo peso molecular, tais como a glutatona-reduzida e ácido ascórbico, que complexam diferentes tipos de oxigênio reativo intermediários, protegendo as células contra lesões e danos potenciais (Mittler, 2002). Algumas enzimas da via metabólica da glutatona também podem estar envolvidas na tolerância das plantas ao estresse oxidativo induzido por metais, como a glutatona S-transferase (Davis e Swanson, 2001), e a glutatona-reductase (Pereira *et al.*, 2002). O estresse oxidativo parece estar envolvido na toxicidade de Cd em diferentes espécies de plantas (Romero-Puertas *et al.*, 2007). A resposta das enzimas ao estresse oxidativo induzido por metais, no entanto, é dependente do tipo de

metal e das condições experimentais, tais como a concentração de metal, o tempo de exposição e as espécies de plantas (Hegedus *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002).

A maioria das plantas tem baixa tolerância ao Cd. Algumas espécies podem apresentar mecanismos envolvidos na tolerância à toxicidade causada pelo Cd, que permitem o adequado funcionamento das vias metabólicas e rápido reparo dos danos causados às estruturas celulares. Esses mecanismos incluem associação micorrizica, absorção e acumulação de metais através de ligação a exsudados extracelulares e parede celular, precipitação por exsudados extracelulares, redução da absorção na membrana plasmática, complexação de íons dentro da célula por várias substâncias, como ácidos orgânicos, fitoquelatinas, aminoácidos, ferritinas e metalotioneínas, respostas de defesas bioquímicas gerais como a indução de enzimas antioxidativas e a ativação ou modificação do metabolismo da planta, e compartimentalização dos metais no vacúolo (Verkleij e Schat, 1990; Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999; Gonzalez-Mendoza e Zapata-Perez, 2008).

Sintomas visíveis de toxicidade variam para cada espécie e até mesmo para as plantas individuais, mas os mais comuns e inespecíficos sintomas de intoxicação por metais pesados são pontos cloróticos ou marrons nas folhas e margens das folhas, e raízes marrons e atrofiadas (Kabata-Pendias, 2011). A clorose foliar é um dos sintomas típicos visíveis da toxicidade do Cd (Jiang *et al.*, 2005; Kupper *et al.*, 2007). Esse sintoma pode ocorrer devido a uma competição do Cd com o Fe por sítios de absorção na membrana plasmática (Kabata-Pendias e Pendias, 2000) ou com Mg (Kurdziel *et al.*, 2004), podendo, neste caso, afetar potencialmente a estabilidade das clorofilas. A clorose também pode ser provocada pela deficiência de Fe ou pela redução no transporte de Mn causadas pela presença de Cd (Godbold e Hutterman, 1985).

Nas plantas, a absorção, o transporte e o uso de macronutrientes como Ca, P, K (Das *et al.*, 1997) e S (Jiang *et al.*, 2005), bem como absorção de água (Das *et al.*, 1997) podem ser afetados pela presença de Cd. Em milho, Nocito *et al.* (2002) verificaram um decréscimo na absorção de K pelo sistema radicular. A presença de Cd também pode afetar o metabolismo do Fe, Mn e Mg (Kabata-Pendias e Pendias, 2000) e reduzir a absorção de nitrato e o seu transporte das raízes para a parte aérea através da inibição da nitrato redutase nas folhas (Hernandez *et al.*, 1996). Os metais também podem agir induzindo a deficiência ou a substituição de íons essenciais em metaloproteínas (Van Assche e Clijsters, 1990).

Plantas transgênicas têm sido produzidas com o objetivo de aumentar a tolerância ao Cd (Guimarães *et al.*, 2008); por exemplo, plantas transgênicas de *Brassica juncea* superexpressando a sintetase da GSH ou a sintetase da γ -glutamilcisteína mostraram ser mais tolerantes ao estresse provocado pelo Cd (Zhu *et al.*, 1999; Wawrzynski *et al.*, 2006).

2.2. Binding Protein (BiP)

A proteína BiP (*binding protein*) constitui o chaperone molecular mais bem caracterizado do retículo endoplasmático (Denecke, 1996). BiP contribui para a translocação de proteínas recém sintetizadas, através da membrana do retículo endoplasmático, bem como exerce importante papel no enovelamento das cadeias polipeptídicas nascentes (Gething, 1999).

O retículo endoplasmático (RE) é um compartimento sub-celular onde proteínas e lipídios são sintetizados. Condições de estresse podem atuar diretamente sobre a homeostase do retículo, resultando em acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas, promovendo uma situação de estresse que altera o controle de qualidade da célula (Trombetta e Parodi, 2003). Esse estresse ativa a via de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response*, UPR), desencadeando degradação das proteínas anormais e indução de chaperones moleculares e enzimas que contribuem para o reestabelecimento da homeostase. Como resultado primário da ativação dessa via, ocorre a regulação positiva e coordenada de um conjunto de genes, dentre eles o gene que codifica a proteína BiP (Fink, 1999; Gething e Schroder *et al.*, 2005; Ron *et al.*, 2007).

Uma vez que as proteínas induzidas pela UPR estão envolvidas no enovelamento proteico, acredita-se que estas possuam função protetora no RE evitando a agregação das proteínas. Em geral, o aumento da atividade secretora das células e exposição a agentes que resultam em acúmulo de proteínas mal-dobradas no RE, causam indução de BiP em plantas (Boston *et al.*, 1996). A expressão de BiP em plantas é induzida também por uma variedade de condições de estresses bióticos e abióticos, como estresse hídrico, infestação de fungos, ataque de insetos, estresse nutricional e aclimação ao frio (Figueiredo *et al.*, 1997).

O chaperone molecular BiP parece atuar em vários mecanismos de estresse, respondendo tanto a injúrias a nível abiótico quanto biótico. Porém, os mecanismos pelos quais a proteína BiP promove maior adaptação das plantas a condições adversas

do meio ambiente permanecem para serem elucidados. Sabe-se, entretanto, que a função protetora de BiP está associada à sua capacidade de modular eventos de morte celular induzidos por estresses (Reis *et al.*, 2012).

Diversas evidências na literatura têm demonstrado o papel de BiP na manutenção da homeostase celular. O grupo de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, demonstrou que a superexpressão de BiP em soja e em tabaco mantém o turgor da folha em condições de seca resultando na maior tolerância ao estresse hídrico (Figueiredo *et al.*, 1997; Cascardo *et al.*, 2000; Alvim *et al.*, 2001; Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011; Carvalho, 2013), bem como retardo na senescência foliar durante a seca. Além disso, foi demonstrado que os genes de resposta à seca foram menos ativados em linhagens transgênicas submetidas a estresse hídrico indicando que a superexpressão desse chaperone ameniza o estresse no RE (Valente *et al.*, 2009).

Especialmente em soja, Valente (2008), estudando o efeito da função protetora exercida pela proteína BiP contra o déficit hídrico, observou que a superexpressão de BiP atenuou o fenômeno de morte celular induzida pelo estresse osmótico e seca, conferindo às plantas transgênicas melhor desempenho em condições de desidratação. As plantas transformadas apresentaram maior tolerância à seca, com menor peroxidação de lipídeos, indução do processo de senescência retardado, capacidade fotossintética e condutância estomática significativamente superior às plantas não transformadas. Em trabalho mais recente, Reis *et al.* (2011), mostraram que a superexpressão de BiP atenuou a morte celular mediada por estresse osmótico, atenuou a necrose em folhas e manteve o turgor das plantas.

2.3. Aldeído desidrogenase (ALDH7)

Aldeído desidrogenases (ALDH) são enzimas que catalisam a oxidação de aldeídos a seus ácidos carboxílicos correspondentes, requerendo NAD(P)^+ como cofator (Perozich *et al.*, 1999a). As moléculas que contêm grupos aldeídos são intermediárias em diversas vias bioquímicas fundamentais, sendo geradas durante o metabolismo de carboidratos, vitaminas, esteroides, aminoácidos e lipídeos (Yoshida *et al.*, 1998; Vasiliou *et al.*, 2000). Essas moléculas também podem ser sintetizadas em resposta a estresses ambientais que perturbam o metabolismo, incluindo salinidade, desidratação, dessecação, frio e temperaturas altas (Barclay *et al.*, 1994; Bartels, 2001).

As enzimas aldeído desidrogenases constituem uma diversa superfamília de proteínas com importantes funções biológicas encontradas em vários organismos. Uma classificação da superfamília, baseada na sequência de identidade dessas proteínas, identificou 21 famílias de proteínas ALDH em organismos eucarióticos (Perozich *et al.*, 1999a e 1999b; Sophos *et al.*, 2001). Onze destas famílias estão representadas nas plantas (ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH19, ALDH21) (Wood e Krayesky, 2002; Bray, 2004).

O cDNA da soja, denominado *GmTP-55* (*Glycine max* Turgor Protein 55 kDa), codifica para uma proteína pertencente a superfamília de enzimas conhecidas como aldeído desidrogenases que é acumulada principalmente nas células caulinares durante estresse hídrico (Rodrigues *et al.*, 2006). A análise comparativa entre sequências de aminoácidos com membros da superfamília de aldeído desidrogenases demonstrou que o gene *GmTP-55* é provavelmente um membro da família ALDH7A1 que contém os homólogos da antiquitina em vários organismos como mamíferos, peixes e plantas (Rodrigues *et al.*, 2006). Evidências indicam que as proteínas ALDH7A estão envolvidas na osmorregulação de células vegetais durante o déficit hídrico (Wood e Krayesky, 2002; Bray, 2004).

Os homólogos da TP-55 descritos na literatura atuam nos processos de regulação osmótica, como por exemplo, a Aldh2a uma desidrogenase de arroz que tem sua expressão aumentada em condições anaeróbicas, sugerindo que o estresse provocado devido à reduzida concentração de oxigênio é regulado pela elevação dos níveis de Ca²⁺ citosólico (Nakazono *et al.*, 2000). A proteína 26g de ervilha (*P. sativum*) tem sua expressão aumentada em consequência do desequilíbrio osmótico ocasionado por déficit hídrico (Guerrero *et al.*, 1990); enquanto que a proteína antiquitina de humanos é encontrada principalmente nos rins e no ouvido, os quais são órgão relacionados com a osmorregulação (Vasiliou *et al.*, 2000).

Plantas transgênicas de tabaco e *arabidopsis* expressando constitutivamente o cDNA de *GmTP-55* foram submetidas a diversas condições de estresses abióticos e a expressão ectópica do gene *GmTP-55*, tanto em *arabidopsis* quanto em tabaco, conferiu às plantas tolerância a estresse salino durante a germinação e a déficit hídrico durante o desenvolvimento (Rodrigues *et al.*, 2006). Esses autores observaram também que as plantas transgênicas exibiram uma maior tolerância a estresses oxidativos induzidos por meio de tratamentos com H₂O₂ e paraquat.

CAPÍTULO I

TOXICIDADE DE CÁDMIO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE SOJA EXPRESSANDO O GENE BIP

1. INTRODUÇÃO

A agricultura exerce um papel de destaque na economia mundial e a soja é hoje uma das principais culturas geneticamente modificadas que possui grande importância socioeconômica. A produtividade agrícola constantemente é afetada pelas condições adversas do meio ambiente, em especial aquelas causadas por metais pesados. O estresse causado por esses metais é um dos fatores que limita a produção, causando uma série de mudanças fisiológicas, bioquímicas e moleculares nas plantas.

O cádmio (Cd) é um metal pesado tóxico para as plantas, assim como para o homem e os animais (Johri *et al.*, 2010; DalCorso *et al.*, 2010). Os danos causados por Cd em células vegetais inclui, principalmente, produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, distúrbios na fotossíntese, distúrbio na sinalização de cálcio e indução de morte celular programada (PCD) (Chaffei *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Rodriguez-Serrano *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010).

Condições de estresse podem atuar diretamente sobre a homeostase do retículo endoplasmático (RE). Esta organela é um compartimento celular essencial para a síntese e a maturação de proteínas secretórias, e funciona como reservatório de cálcio. Alterações das funções do retículo endoplasmático podem resultar em acúmulo de proteínas incorretamente enoveladas, alterando a homeostase dessa organela e promovendo o estresse no RE. Este estresse geralmente é causado por uma sobrecarga de proteínas mal dobradas no RE, que ativa a transdução do sinal da via de resposta a proteínas incorretamente enoveladas (UPR) (Zhang e Kaufman, 2004; Ron e Walter, 2007). Se o estresse do RE não for aliviado, vias apoptóticas são ativadas. Sob condições de estresse, a superexpressão de chaperones é essencial para a sobrevivência celular por facilitar o correto enovelamento de proteínas do retículo e prevenir sua agregação.

BiP é uma chaperone envolvida na regulação de diversos processos celulares associados ao retículo endoplasmático (Pilon e Schekman, 1999). Proteínas anormais e incapazes de adquirir a conformação nativa e funcional são reconhecidas pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático e endereçadas para a degradação, prevenindo seu acúmulo no lúmen da organela e evitando, assim, a formação de agregados insolúveis que podem tornar-se tóxicos para a célula. BiP está diretamente envolvida nesse mecanismo de ciclagem, auxiliando a degradação e endereçamento desses

substratos para a degradação (Molinari *et al.*, 2002), além de funcionar como um modulador da via de resposta a proteínas mal-dobradas (UPR) (Liu e Kaufman, 2003).

Trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO-UFV) com plantas transgênicas superexpressando BiP mostraram que essas plantas apresentaram tolerância a estresse hídrico e salinidade (Alvim *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011). Foi demonstrado que a superexpressão de BiP atenuou o fenômeno de morte celular induzida pelo estresse osmótico, conferindo melhor desempenho às plantas transgênicas em condições de desidratação. Estas observações levaram a hipótese de que essas vantagens adquiridas com a expressão ectópica de BiP poderiam também exercer um efeito protetor contra toxicidade por metais pesados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em plantas transgênicas de soja superexpressando BiP, o efeito da expressão constitutiva de BiP na proteção contra a toxicidade de Cd.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

2.1.1. Obtenção das mudas de soja

Para determinar a resposta de plantas transgênicas ao estresse por Cd, foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* var “Conquista”) superexpressando o gene *soyBiPD*. As sementes das plantas foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV). As linhagens de soja transformadas utilizadas neste trabalho foram 35S-BIP2 e 35S-BIP4. Para o tratamento controle, foram utilizadas linhagens não-transformadas (“wild type”). Os níveis da proteína BiP observados nessas linhagens superexpressando BiP selecionadas são superiores aos das plantas não-transformadas (Valente, 2008).

As mudas de soja foram obtidas pela semeadura em bandeja contendo substrato. Logo após a emergência do primeiro folíolo, foi retirado um fragmento (disco foliar) para confirmação da transformação das plantas transgênicas através de extração de DNA e PCR.

2.1.2. Extração do DNA genômico dos possíveis transformantes de soja

Para a extração do DNA das plantas de soja pelo método Dellaporta (Dellaporta, 1983), com algumas modificações, amostras de 100 mg de tecidos vegetais foram

maceradas em nitrogênio líquido usando almofariz de porcelana e pistilo. Os macerados foram homogeneizados com tampão de extração (Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 8, NaCl 500 mmol L⁻¹, EDTA 50 mmol L⁻¹ e β-mercaptoetanol 10 mmol L⁻¹) e agitados por 5 s em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado à mistura 33 µL de SDS 20 % (p/v) e manteve agitação por 2 min em vortex. Após este período, foram adicionados 160 µL de acetato de potássio 5 mol L⁻¹ e a mistura agitada por 2 min em vortex. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 16 000 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi precipitado com isopropanol 50 % (v/v) por 30 min em banho de gelo e centrifugado a 13 500 g por 10 min. O pellet foi lavado utilizando etanol 70 % (v/v), seco durante 5 min em SpeedVac e ressuspendido em 30 µL de água estéril. A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8 % (p/v) em TBE 1X, corado com brometo de etídeo 0,1 µg mL⁻¹.

2.1.3. Reação de PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Os DNAs das plantas de soja foram analisados por PCR usando oligonucleotídeos específicos (SoyBiPD-F e NOS2009-R). Na reação de PCR foram utilizados aproximadamente 20 ng de DNA genômico da planta, 10 pmoles dos oligonucleotídeos correspondentes, dNTPs 0,25 mmol L⁻¹ cada, 1 U de Taq Polimerase e tampão (MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, Tris-HCl 2 mmol L⁻¹ pH 8,4, KCl 50 mmol L⁻¹) para um volume final de 50 µL. As condições de reação adotadas consistiram de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos (45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C e 1 min a 72 °C), seguindo 10 min a 72 °C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1 % (p/v) e corados com brometo de etídeo 0,1 µg mL⁻¹.

2.2. Escolha das doses de Cd aplicadas nos tratamentos

As doses de Cd utilizadas no experimento de toxicidade em plantas transgênicas de soja superexpressando o gene *BiP* foram definidas a partir de ensaio preliminar em que foram usadas doses selecionadas com base em dados da literatura. Foram testadas as doses 0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,5 e 3,0 mg L⁻¹ de Cd, utilizando-se solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) para crescimento de plantas das três linhagens de soja utilizadas no estudo. O ensaio preliminar foi conduzido durante 15 d em casa de vegetação, com duas repetições, utilizando-se condições de crescimento das plantas idênticas às utilizadas no ensaio final, apresentadas a seguir.

2.3. Condução do ensaio

Quinze dias após a germinação, as plantas confirmadas das linhagens transgênicas e “wild type” foram transferidas para vasos (duas por vaso) contendo 4 L de solução nutritiva (Clark, 1975) a $\frac{1}{4}$ da força iônica original. As plantas foram aclimatadas durante o período de um mês em casa de vegetação, aumentando-se gradativamente a força iônica da solução nutritiva a cada troca, que era realizada semanalmente, até atingir a concentração original. O pH foi mantido em $5,5 \pm 0,1$ e as soluções foram continuamente aeradas para manter uma boa oxigenação do sistema radicular, durante todo o período de condução do experimento.

Após o período de aclimação, as plantas foram cultivadas durante oito dias em solução nutritiva na concentração original (Clark, 1975) contendo doses crescentes de Cd, sendo os tratamentos definidos pela adição de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ à solução nas concentrações 0; 0,5; 1,5; 3,0 mg L^{-1} de Cd, determinadas com base no ensaio preliminar.

O ensaio foi desenvolvido em esquema fatorial 3×4 (2 linhagens transgênicas e 1 “wild”, cultivadas em 3 concentrações de Cd e um controle) com 3 repetições, no delineamento em blocos casualizados, totalizando 36 parcelas experimentais. As coletas do material para análises foram realizadas oito dias após a aplicação de Cd à solução nutritiva.

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da UFV, em Viçosa, MG, sob condições naturais de luz e temperatura, no período de março a maio de 2014. Durante o ciclo de vida das plantas foram feitas avaliações das características fenotípicas das mesmas.

2.4. Determinação do teor de Cd nas plantas

Cada planta coletada foi dividida em raiz e parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente por 1 min, em solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por 1 min e, em seguida, enxaguadas por 1 min em água desmineralizada e secas em papel-toalha.

Para a determinação dos teores de Cd no material vegetal, as amostras foram secas em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem peso constante. A massa de matéria seca da parte aérea e da raiz de cada amostra foi determinada. As amostras foram trituradas em moinho tipo Willey e, posteriormente, foi feita a digestão das amostras adicionando-se 10 mL de uma mistura de ácido nítrico e perclórico, na proporção 3,5:1 (v/v) em

aproximadamente 0,5 g de material vegetal (Malavolta *et al.*, 2007). A determinação do teor de Cd nos extratos foi feita por Espectrofotometria de Absorção Atômica.

2.5. Cálculos da redução relativa de matéria seca (RRMS) e do índice de translocação (IT)

A redução relativa de matéria seca (RRMS) foi calculada com o objetivo de se avaliar a produção de matéria seca das plantas expostas a cada dose de Cd 0,5; 1,5 e 3 mg L⁻¹ em relação ao tratamento controle (ausência de Cd), para cada uma das linhagens, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$RRMS = \frac{(Controle - Tratamento)}{Controle} 100$$

RRMS – Redução relativa de matéria seca (%);

Controle – Produção de matéria seca das plantas cultivadas na ausência de Cd;

Tratamento – Produção de matéria seca das plantas cultivadas nas doses 0,5; 1,5 e 3 mg L⁻¹ de Cd.

O índice de translocação (IT), que se refere ao movimento ou à transferência de Cd da raiz para a parte aérea da planta, foi calculado a partir do conteúdo de Cd na parte aérea e no sistema radicular de acordo com Abichequer e Bohnen (1998), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IT = \frac{CPA}{CR + CPA} 100$$

IT – Índice de translocação de Cd da raiz para a parte aérea (%);

CPA – Conteúdo de Cd na parte aérea (µg);

CR – Conteúdo de Cd na raiz (µg).

2.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, com desdobramento dos graus de liberdade da interação genótipo vs dose Cd. As médias foram testadas a 5 % de probabilidade, pelo teste Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção e análise molecular das plantas transgênicas

As sementes de soja (*Glycine max* variedade “Conquista”) utilizadas neste experimento foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV). Foram utilizadas duas linhagens transgênicas que superexpressam o gene *BiP* (35S-BIP2 e 35S-BIP4) e uma linhagem não transformada denominada selvagem (“wild type”) usada como controle.

As mudas de soja foram obtidas pela semeadura em bandeja contendo substrato. Logo após a emergência do primeiro folíolo, foi retirado um fragmento (disco foliar) para confirmação da transformação das plantas transgênicas através de extração de DNA e PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

O diagnóstico da incorporação do transgene *BiP* foi determinado por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos (SoyBiPD-F e NOS2009-R) que amplificaram um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 1800 pb, a partir de DNA dos transformantes, mas não de plantas controle (WT) (Figura 1).

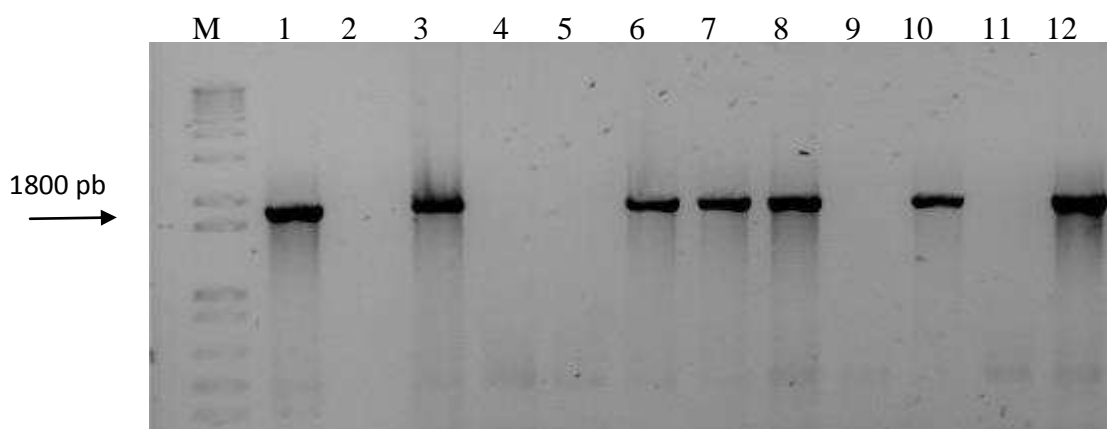


Figura 1. Gel de agarose corado com brometo de etídeo mostrando a confirmação dos transformantes de soja, por “PCR”, utilizando os primers (SoyBiPD-F e NOS2009-R) específicos para uma região interna do cDNA da *BiP*. M: marcador molecular. 1: controle positivo. 2: controle negativo. 3, 6, 7, 8, 10 e 12: amostras confirmadas. 4, 5, 9 e 11: amostras não confirmadas.

As mudas confirmadas das linhagens transgênicas, assim como a “wild type”, foram transferidas da sementeira para a solução nutritiva para a realização do experimento.

3.2. Sintomas visuais

Os primeiros sintomas visuais de toxidez devido ao Cd foram observados na linhagem WT, no terceiro dia após a aplicação das soluções contendo Cd nas concentrações referentes aos tratamentos. As plantas WT submetidas às doses 1,5 e 3 mg L⁻¹ de Cd apresentaram pequenas manchas avermelhadas, principalmente na região dos nós onde se inserem os pecíolos das folhas (Figura 2). Nesta ocasião, as plantas WT submetidas à dose 0,5 mg L⁻¹ de Cd, ainda não haviam apresentado sintomas visuais.

As linhagens transgênicas apresentaram os primeiros sintomas no quarto dia de exposição ao Cd. Assim como ocorreu na linhagem WT, os sintomas visuais nas linhagens transgênicas também começaram com o aparecimento de manchas avermelhadas na região dos nós. Esses sintomas foram observados tanto na linhagem BiP-2 quanto na BiP-4 sob 1,5 mg L⁻¹ de Cd, enquanto que as plantas transgênicas sob as doses 0,5 e 3 mg L⁻¹ de Cd ainda não evidenciavam sintomas visuais.

No quarto dia, as plantas WT sob 0,5 mg L⁻¹ de Cd apresentavam poucos sintomas. No entanto, os sintomas das plantas sob 1,5 e 3 mg L⁻¹ de Cd evoluíram, com as plantas apresentando manchas avermelhadas nas nervuras e clorose internerval em algumas folhas mais jovens, que se somaram às manchas no caule e no pecíolo (Figura 2). Essas manchas avermelhadas ocorrem em consequência do acúmulo de antocianinas (Oliveira *et al.*, 2001). A clorose foliar é um dos sintomas típicos visíveis da toxicidade ao Cd (Jiang *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2007) e pode ser devida a vários fatores, como competição do Cd com o Fe por sítios de absorção na membrana plasmática (Kabata-Pendias e Pendias, 2000) ou com Mg (Kurdiziel *et al.*, 2004), à deficiência de P e à redução no transporte de Mn (Godbold e Hutterman, 1985).

Os sintomas foram evoluindo, agravando-se com o tempo e com o incremento nas doses de Cd, tornando-se evidentes em várias partes da planta. Após oito dias de exposição ao Cd, as folhas do ápice das plantas mais estressadas apresentaram sintomas de encarquilhamento e de murcha que evoluíram para a secagem das folhas (Figura 2). Esses sintomas foram observados, principalmente, nas plantas não-transformadas (WT) (Figuras 4 e 5). A intensidade das manchas avermelhadas aumentou no caule, nos pecíolos e nas nervuras das folhas e observou-se a presença de exsudados avermelhados nos caules de algumas plantas (Figura 2). Houve acentuada redução no crescimento das plantas mais suscetíveis.

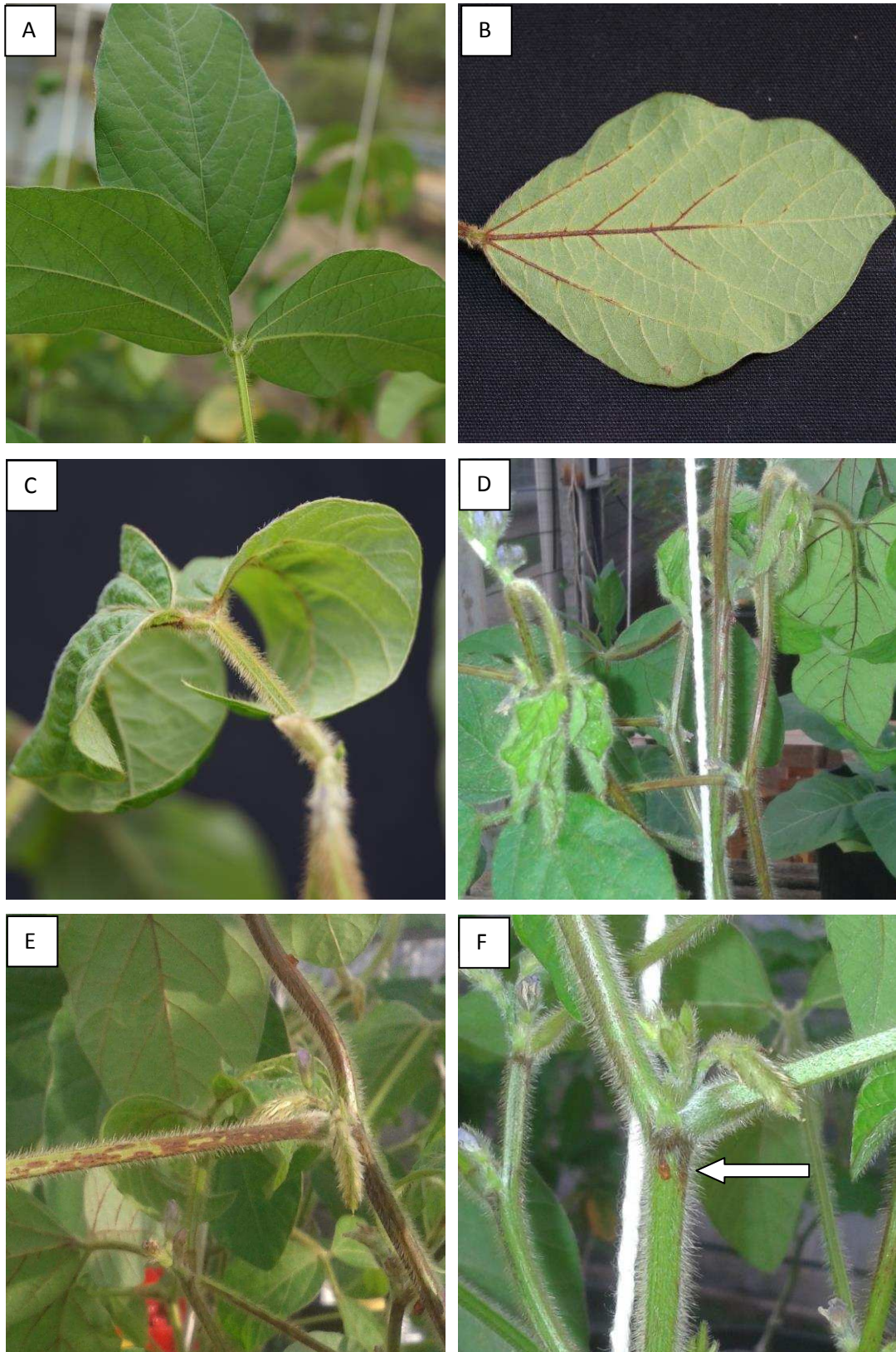


Figura 2. Sintomas de toxicidade de Cd em plantas de soja. A: planta controle cultivada na ausência de Cd. B: manchas avermelhadas nas nervuras das folhas. C: encarquilhamento. D: murcha. E: manchas acentuadas nos caules e pecíolos. F: exsudados.

As raízes apresentavam-se levemente escuras, tornando-se pardo-escuras com o aumento nas doses de Cd e tempo de exposição das plantas, principalmente nas mais suscetíveis. A exposição a altas concentrações de Cd também afetou o desenvolvimento do sistema radicular (Figura 3), levando à inibição do crescimento das raízes, assim como foi observado em salvinia (Oliveira *et al.*, 2001). Esses sintomas possivelmente decorrem de alterações em nível de ultra-estrutura, caracterizadas por rompimento da membrana plasmática, que afeta seu papel como barreira regulatória para o transporte de moléculas vitais, sendo este o primeiro alvo de fitotoxicidade do Cd (Gupta e Devi, 1992). No entanto, os danos do estresse foram mais evidentes nas estruturas da parte aérea que nas raízes, provavelmente pela alta potencialidade das raízes de armazenar Cd na forma complexada e pela mobilidade do Cd nas plantas (Kabata-Pendias, 2011).

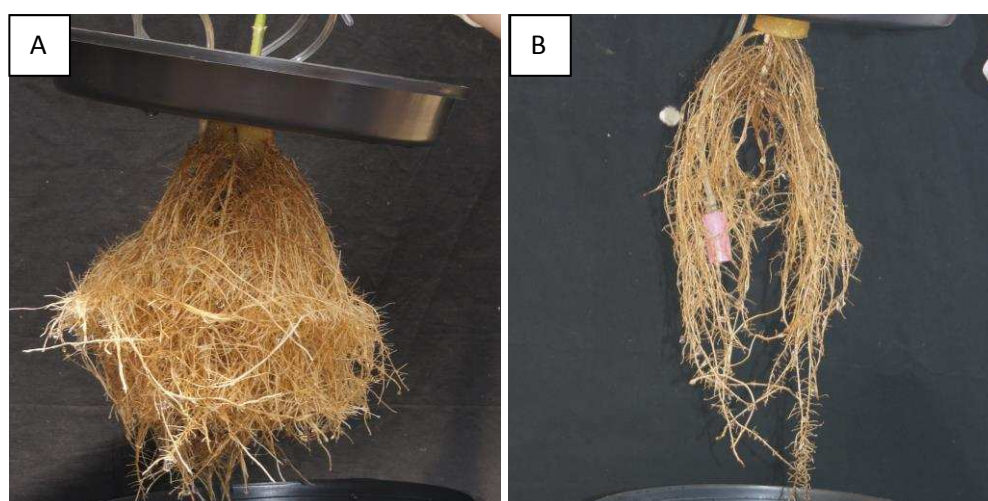


Figura 3. Sintomas de toxicidade de Cd em raízes de plantas de soja. A: raiz de planta cultivada na ausência de Cd. B: raiz de planta tratada com 3 mg L⁻¹ de Cd.

Uma evidência da possível tolerância das plantas de soja superexpressando BiP ao estresse causado pelo Cd foi observada nas plantas transgênicas submetidas à maior dose (3 mg L⁻¹ de Cd) (Figuras 4 e 5). Após oito dias de exposição a esta dose, foram observados sintomas mais brandos de toxicidade nas plantas das linhagens transgênicas em relação às plantas controle (WT). Nesta condição de estresse, as plantas transgênicas apresentaram melhor desempenho, com folhas mais turgidas e verdes, retardo no processo de senescência foliar, menor limitação ao crescimento e, principalmente, menor índice de manchas avermelhadas nas nervuras foliares, pecíolos e caules. As

plantas controle apresentaram um alto índice de manchas avermelhadas no caule, pecíolos e nervuras, exsudados nos caules, encarquilhamento e secagem das folhas do ápice e redução pronunciada do crescimento nessas mesmas condições.

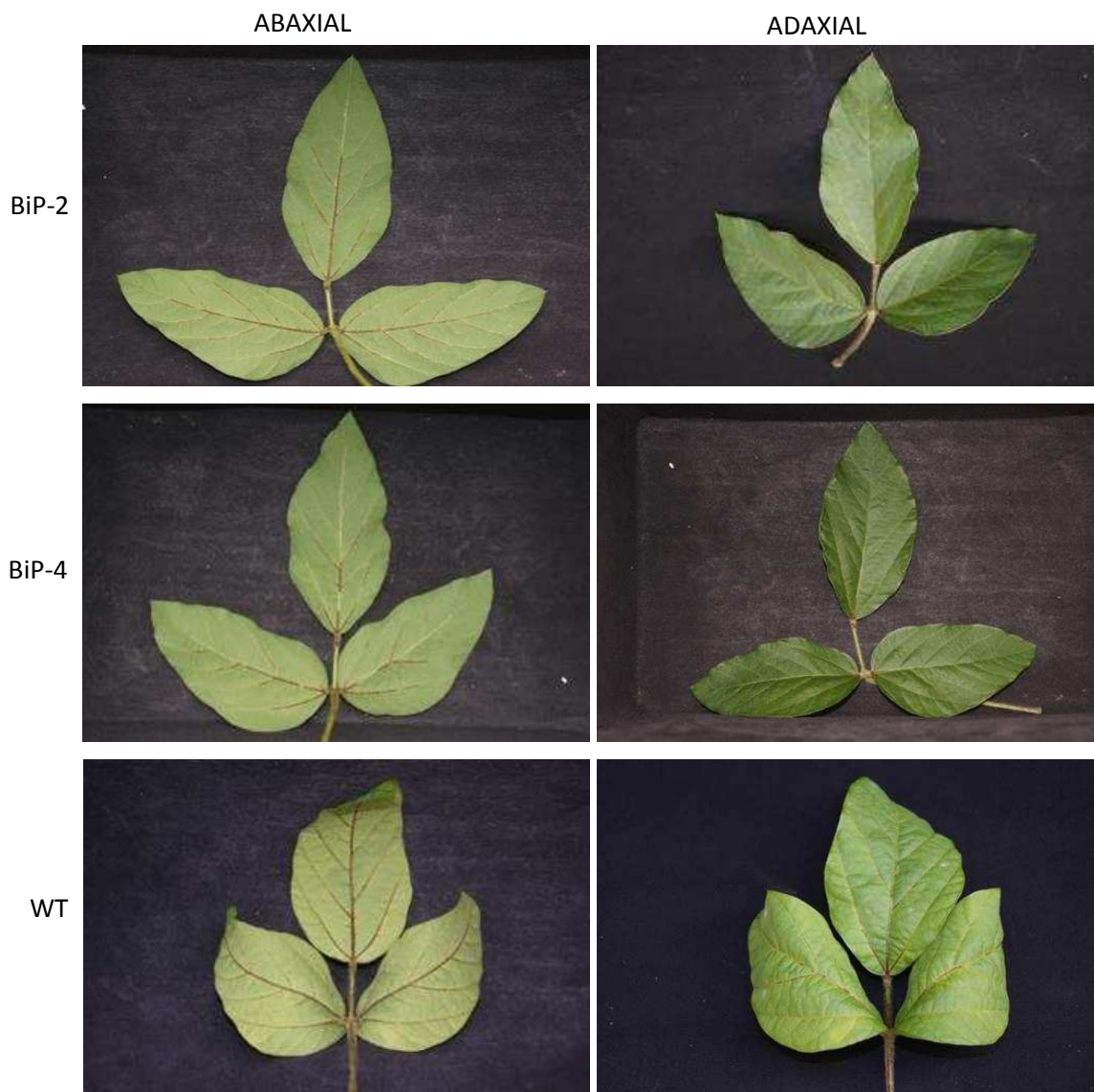


Figura 4. Faces abaxial e adaxial de folhas de plantas de soja, transgênicas (BiP-2 e BiP-4) e não transgênicas (WT), crescidas na solução contendo 3 mg L^{-1} de Cd. Nesta condição de estresse, as folhas das plantas transgênicas apresentaram-se mais turgidas e verdes e menor índice de manchas avermelhadas nas nervuras e pecíolos. As folhas das plantas WT apresentaram um alto índice de manchas avermelhadas nos pecíolos, nas nervuras, encarquilhamento e secagem das folhas do ápice.



Figura 5. Toxicidade de Cd em plantas de soja tratadas com 3 mg L^{-1} de Cd por oito dias, evidenciando sintomas mais brandos de toxidez nas plantas das linhagens transgênicas (BiP-2 e BiP-4) em relação às plantas controle (WT). Nesta condição de estresse, as plantas transgênicas apresentaram melhor desempenho, com folhas mais turgidas e verdes, retardo no processo de senescência foliar, menor limitação ao crescimento e, principalmente, menor índice de manchas avermelhadas nas nervuras foliares, pecíolos e caules.

3.3. Efeito do cádmio sobre a produção de matéria seca

A produção de matéria seca nas plantas das três linhagens de soja estudadas diminuiu com o incremento das doses de Cd na solução nutritiva, tornando evidentes os efeitos tóxicos do metal sobre o metabolismo vegetal (Tabela 1). A inibição do crescimento devido à exposição a níveis tóxicos de Cd é comum em estudos com diferentes espécies de plantas. A exposição a este metal pode levar à desnaturação de proteínas e ao estresse oxidativo, resultando em danos às membranas, redução na atividade enzimática e fotossíntese, dentre várias outras mudanças metabólicas que afetam o crescimento normal das plantas (Guimarães *et al.*, 2008). A presença de Cd também afeta o balanço e equilíbrio nutricional, afetando a absorção, o transporte e o uso de nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Kabata-Pendias, 2011).

Tabela 1. Produção média de massa de matéria seca (g) da parte aérea, raiz e total das linhagens BiP-2, BiP-4 e WT de soja, submetidas a doses de Cd em solução nutritiva.

Doses de Cd	Raiz			PA			Total		
	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT
mg L ⁻¹	g								
0,0	2,67 Aa	2,60 Aa	2,61 Aa	7,01 Aab	6,84 Ab	7,14 Aa	9,68 Aa	9,44 Aa	9,74 Aa
0,5	2,30 Ba	2,26 Ba	1,88 Bb	6,43 Ba	6,24 Ba	5,26 Bb	8,73 Ba	8,50 Ba	7,14 Bb
1,5	2,12 BCa	2,15 BCa	1,66 BCb	5,94 Ca	6,00 BCa	4,80 Cb	8,06 Ca	8,15 BCa	6,46 Cb
3,0	1,94 Ca	1,95 Ca	1,42 Cb	5,80 Ca	5,89 Ca	4,38 Db	7,74 Ca	7,85 Ca	5,80 Db

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A linhagem WT apresentou sensibilidade ao Cd significativamente maior do que as linhagens transgênicas, em termos de redução relativa de matéria seca, tanto na raiz quanto na parte aérea (Tabela 2). Nos tratamentos com 3 mg L⁻¹ de Cd, a redução relativa de matéria seca foi de 27,42 % nas raízes e 17,22 % na parte aérea das plantas BiP-2, de 24,78 % nas raízes e 13,89 % na parte aérea das plantas BiP-4, enquanto as plantas WT atingiram reduções de 45,41 % nas raízes e 38,62 % na parte aérea, evidenciando melhor desempenho das linhagens transgênicas expostas ao Cd.

Tabela 2. Redução relativa de matéria seca (%) da parte aérea, raiz e total das linhagens BiP-2, BiP-4 e WT de soja, submetidas a doses de Cd em solução nutritiva.

Doses de Cd	Raiz			PA			Total		
	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT
mg L ⁻¹	%								
0,5	13,90 b	12,95 b	28,01 a	8,25 b	8,76 b	26,26 a	9,80 b	9,95 b	26,73 a
1,5	20,79 b	17,17 b	36,12 a	15,24 b	12,38 b	32,79 a	16,76 b	13,69 b	34,69 a
3,0	27,42 b	24,78 b	45,41 a	17,22 b	13,89 b	38,62 a	20,04 b	16,89 b	39,39 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Nas três linhagens de soja, a produção de matéria seca das raízes sofreu maior interferência devido ao Cd, apresentando maiores taxas de redução relativa de matéria seca que a parte aérea, possivelmente por constituir a parte da planta que está em

contato direto como metal. Este resultado corrobora os encontrados por Nascimento e Pereira (1997), que também observaram que em feijoeiro, os efeitos deletérios do Cd sobre a produção de matéria seca foram mais pronunciados nas raízes que na parte aérea. Soares *et al.* (2005) observaram efeito negativo do aumento das doses de Cd na solução nutritiva sobre o crescimento de eucalipto, no entanto, as raízes e a parte aérea foram igualmente afetadas pelo metal.

3.4. Absorção e distribuição de cádmio nas plantas

Oito dias após a aplicação dos tratamentos, o teor de Cd aumentou tanto na raiz como na parte aérea das plantas das três linhagens, em função do incremento nas doses de Cd na solução nutritiva (Tabela 3). Esse aumento foi especialmente maior nas raízes, provavelmente devido à maior capacidade de plantas de soja em acumular o metal nessa parte da planta (Tabela 4) e ao contato direto das raízes com o Cd na solução nutritiva. Observou-se médias do teor de Cd nas raízes de até sete vezes superior à parte aérea, em plantas WT sob 3 mg L⁻¹ de Cd.

Tabela 3. Teor de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$) na parte aérea e raiz das linhagens BiP-2, BiP-4 e WT de soja, em função das doses de Cd em solução nutritiva.

Doses de Cd	Raiz			PA		
	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT
mg L ⁻¹ $\mu\text{g g}^{-1}$					
0	5,06 a	4,95 a	5,06 a	12,04 a	11,97 a	12,17 a
0,5	58,12 a	65,00 a	59,44 a	38,12 ab	36,98 b	39,85 a
1,5	162,50 a	130,83 c	148,53 b	47,19 b	40,60 c	53,64 a
3,0	260,49 b	190,50 c	455,18 a	57,24 b	55,01 c	63,94 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Nos tratamentos com 3 mg L⁻¹ de Cd, o teor médio desse elemento nas raízes foi de 260,49 $\mu\text{g g}^{-1}$ na linhagem BiP-2, 190,50 $\mu\text{g g}^{-1}$ na BiP-4, enquanto a linhagem WT atingiu teores médios de 455,18 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cd. Nesses tratamentos também se observou que a redução relativa de matéria seca das raízes na linhagem WT foi significativamente

maior que nas linhagens transgênicas (Tabela 2), o que pode ter sido causado pelo maior teor de Cd nessa estrutura da planta WT.

O acúmulo de Cd nas plantas aumentou com o incremento das doses desse elemento na solução nutritiva, tanto na parte aérea como nas raízes das três linhagens estudadas (Tabela 4). Aumento no conteúdo de Cd em função do incremento na dose desse elemento também foi observado em plantas de feijoeiro (Nascimento e Pereira, 2001) e soja (Oliveira *et al.*, 1994). Decréscimo no acúmulo de Cd foi observado por Oliveira *et al.* (2001) em plantas de aguapé e salvinia em função do tempo de exposição das plantas a esse elemento, e atribuíram essa diminuição à redução nas taxas metabólicas do vegetal resultantes da toxidez do Cd.

Tabela 4. Conteúdo de Cd (μg) na parte aérea, raiz e total das linhagens BiP-2, BiP-4 e WT de soja, em função das doses de Cd em solução de nutritiva.

Doses de Cd	Raiz			PA			Total		
	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT
mg L^{-1} μg								
0,0	13,5 a	12,8 a	13,18 a	84,39 a	81,95 a	86,87 a	97,91 a	94,82 a	100,06 a
0,5	133,7 a	146,8 a	111,6 a	245,22 a	230,88 a	209,73 b	378,93 a	377,68 a	321,41 a
1,5	343,7 a	281,5 b	247,2 b	280,25 a	243,43 b	257,26 b	623,9 a	525,0 b	504,48 b
3,0	446,6 b	372,4 c	648,7 a	332,26 a	324,07 a	280,03 b	778,8 b	696,5 c	928,77 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Em comparação com a linhagem WT, as linhagens transgênicas apresentaram maior capacidade de absorver o Cd da solução nutritiva e transportá-lo para a parte aérea, observando-se maiores acúmulos desse metal pesado em ambas as partes das plantas BiP-2 e BiP-4 na maioria dos tratamentos. Adicionalmente, as linhagens transgênicas mostraram menor redução na sua produção de matéria seca (Tabela 2), indicando, possivelmente, maior tolerância ao Cd. Entre as linhagens transgênicas, a linhagem BiP-2 apresentou maiores médias de teor e conteúdo de Cd que a BiP-4, tanto na raiz como na parte aérea (Tabelas 3 e 4).

Nos tratamentos com 3 mg L⁻¹ de Cd, o acúmulo desse metal na raiz foi de 446,41 µg na linhagem BiP-2, 372,47 µg na BiP-4, enquanto a linhagem WT acumulou, em média, 648,74 µg (Tabela 4). Uma hipótese que explicaria esse menor acúmulo de Cd nas raízes das plantas transgênicas é que pode ter ocorrido saturação dos sítios de ligação desse metal nas raízes dessas plantas, indicando sua maior capacidade de controlar a absorção de Cd com o objetivo de prevenir níveis tóxicos desse metal no interior das células.

Ao contrário do que se observou na raiz, o acúmulo de Cd na parte aérea das plantas WT sob 3 mg L⁻¹ de Cd foi menor que nas transgênicas (Tabela 4). Porém, o teor de Cd na parte aérea da linhagem WT foi maior que nas transgênicas. Isso indica que o conteúdo de Cd na parte aérea da linhagem WT é menor porque a massa de material vegetal produzida foi menor.

Nas três linhagens, o acúmulo de Cd foi significativamente maior na raiz do que na parte aérea (Tabela 4), sugerindo a atuação de mecanismos responsáveis pela retenção deste metal na raiz. Em diversas espécies vegetais, um dos principais mecanismos de detoxificação de metais pesados consiste na síntese de fitoquelatinas, que podem complexar o metal encontrado em níveis tóxicos e armazená-los nos vacúolos das células das raízes, impedindo seu transporte para a parte aérea (Zenk, 1997). A complexação e compartimentalização do Cd são essenciais para reduzir a sua concentração no citosol e organelas, onde concentram-se as enzimas do metabolismo primário, evitando a desnaturação das mesmas e a redução da atividade enzimática (Ma *et al.*, 2005; Küpper *et al.*, 2007).

A retenção de Cd aumentou no sistema radicular das três linhagens, com o incremento das doses desse metal na solução nutritiva. Nos tratamentos com 0,5 mg L⁻¹ de Cd, cerca de 35 % de todo o Cd absorvido acumulou-se nas raízes das plantas WT. Quando, porém, se aumentou a dose para 3 mg L⁻¹ de Cd na solução nutritiva, o sistema radicular dessa linhagem passou a acumular quase 70 % de todo o Cd absorvido (Tabela 5).

Tabela 5. Índice de translocação de Cd (%) na parte aérea e na raiz das linhagens BiP-2, BiP-4 e WT de soja, submetidas a doses de Cd em solução nutritiva.

Doses de Cd	Raiz			PA		
	BiP-2	BiP-4	WT	BiP-2	BiP-4	WT
mg L ⁻¹ %.....					
0	13,81 a	13,58 a	13,18 a	86,19 a	86,42 a	86,82 a
0,5	35,30 ab	38,87 a	34,70 b	64,70 ab	61,13 b	65,30 a
1,5	55,05 a	53,63 a	48,95 b	44,95 b	46,37 b	51,05 a
3,0	57,31 b	53,43 c	69,71 a	42,69 b	46,57 a	30,29 c

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Do ponto de vista de toxicidade humana, a retenção de metais pesados nas raízes das plantas é desejável, considerando-se que os grãos da soja são a parte destinada ao consumo humano e animal. A alimentação com produtos agrícolas ou hortícolas é a principal causa de contaminação da população por Cd (Guimarães *et al.*, 2008). A ingestão de alimentos e bebidas contaminados pode levar à bioacumulação do metal no organismo e causar graves doenças, como a Itai-Itai, que ocorreu no Japão devido à contaminação da água de irrigação de plantações de arroz (CETESB, 2012). A Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer tem classificado o Cd como uma substância carcinogênica, causando a proliferação celular e induzindo a apoptose (Waalkes, 2003).

Existem diferenças entre espécies e cultivares de uma mesma espécie de planta nos níveis de acúmulo de Cd na parte aérea, sendo que o melhoramento com o objetivo de se obter plantas com menores níveis de acúmulo deste elemento tóxico tem obtido sucesso (Chaney *et al.*, 1999). Outra estratégia para diminuir o risco de contaminação através da alimentação é a seleção de cultivares que tenham menor capacidade de transportar o metal pesado para o órgão consumido (Yu *et al.*, 2006).

Neste trabalho, os resultados observados nas plantas de soja superexpressando BiP nos tratamentos com exposição ao Cd sugerem a possibilidade dessas plantas apresentarem mecanismo de tolerância ao Cd de forma semelhante ao que ocorre com a tolerância ao déficit hídrico nessas plantas. Experimentos adicionais são necessários para confirmar essa ocorrência em relação ao stress causado pela exposição ao Cd.

CAPÍTULO II

TOXICIDADE DE CÁDMIO EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO EXPRESSANDO O GENE ALDH7

1. INTRODUÇÃO

A contaminação do solo e da água com metais pesados é um crescente problema ambiental em todo o mundo. Dentre os metais pesados está o cádmio (Cd), que é altamente tóxico para humanos, animais e plantas. Esse metal entra para o meio ambiente, principalmente, a partir de processos industriais e de fertilizantes fosfatados, e pode ser acumulado pelas culturas e, finalmente, transferido para a cadeia alimentar (Wagner, 1993; Maier *et al.*, 2003).

A toxicidade de Cd causa estresse oxidativo nas plantas através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo, eventualmente, causar morte celular através de processos oxidativos, tais como a peroxidação lipídica da membrana, oxidação de proteínas, inibição enzimática e danos no DNA (Sandalio *et al.*, 2001; Romero-Puertas *et al.*, 2002; Razinger *et al.*, 2007).

Vários estresses ambientais que perturbam o metabolismo das plantas também podem levar à síntese de aldeídos (Barclay *et al.*, 1994; Bartels, 2001). As moléculas de aldeídos compreendem a principal porção dos produtos da peroxidação de lipídeos e são tóxicos por causa da sua reatividade química. Dado à sua natureza potencialmente tóxica, estratégias celulares são utilizadas para a detoxificação de ambos, EROs e produtos tóxicos. Aldeído desidrogenases constituem uma família de proteínas que catalisam a oxidação de aldeídos a seus ácidos carboxílicos correspondentes (Perozich *et al.*, 1999a), eliminando o efeito tóxico dos aldeídos. Consequentemente, o aumento na atividade das aldeído desidrogenases representa uma defesa estratégica para a detoxificação causada pelos mesmos.

Um gene isolado de soja, designado *GmTP-55*, codifica uma aldeído desidrogenase que é acumulada principalmente nas células caulinares durante o estresse hídrico. Esse gene foi classificado como membro do grupo ALDH7A de aldeído desidrogenases, altamente conservado entre os organismos filogeneticamente distantes. Evidências indicam que as proteínas ALDH7A estão envolvidas na osmorregulação de células vegetais durante o déficit hídrico (Wood e Krayesky, 2002; Bray, 2004).

Rodrigues *et al.* (2006), investigando a função do gene *GmTP-55* em plantas transgênicas de arábido e tabaco, constataram que a expressão ectópica desse gene conferiu às plantas tolerância a estresse salino durante a germinação, déficit hídrico durante o desenvolvimento e maior tolerância a estresses oxidativos induzidos por H₂O₂

e paraquat. Segundo esses autores, esses resultados obtidos sugerem que o gene *TP-55* esteja envolvido em respostas celulares adaptativas relacionadas com a detoxificação de aldeídos, considerando que o denominador comum aos efeitos dos estresses salino, hídrico e oxidativo é a produção de EROs e aldeídos tóxicos derivados.

Sabe-se que a presença de Cd nas plantas favorece o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, a diminuição dos níveis de atividade de enzimas antioxidativas e da disponibilidade de glutathione, com a ocorrência de morte celular (apoptose) e danos ao DNA (Devi e Prasad, 2004). Uma hipótese a ser investigada é se as vantagens adquiridas para combater os estresses salino, hídrico e oxidativo, devido à expressão ectópica de *ALDH7A* observadas em plantas superexpressando o cDNA *GmTP-55*, poderiam também exercer um efeito protetor contra toxicidade de Cd nas plantas. Portanto, os objetivos deste trabalho foram estudar a toxicidade de Cd em plantas de tabaco, avaliar seu efeito no crescimento da planta caracterizando os sintomas de toxidez; e analisar o possível papel de *ALDH7* em plantas transgênicas de tabaco expressando o gene *GmTP-55* na tolerância ao estresse causado por excesso de Cd.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

2.1.1. Obtenção das mudas de tabaco

Para determinar a resposta de plantas transgênicas crescidas em solução nutritiva que receberam adição de Cd, foram utilizadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* variedade “Havana”) expressando o gene *GmTP-55* (*Glycine max* Turgor Protein 55 kDa). As mudas das plantas foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV). As linhagens de tabaco transformadas utilizadas neste trabalho foram 35S:*GmTP55*-S3 (senso) e 35S:*GmTP55*anti-4 (anti-senso). A construção do gene na orientação anti-senso suprime a indução de *ALDH7* alterando seus níveis basais. Para o tratamento controle, foram utilizadas linhagens não-transformadas (“wild type”).

As mudas de tabaco foram repicadas *in vitro* em meio de cultura contendo solução nutritiva (meia força) de Murashige-Skoog (MS) (1962). Vinte dias após a repicagem, um fragmento de folha (disco foliar) foi retirado para confirmação da transformação das plantas através de extração de DNA e PCR.

As plantas confirmadas das linhagens transgênicas, assim como as “wild type”, foram repicadas novamente em meio MS e mantidas em ambiente controlado de crescimento por trinta dias para obtenção das mudas utilizadas no experimento.

2.1.2. Extração do DNA genômico dos possíveis transformantes de tabaco

Para a extração do DNA das plantas de tabaco pelo método Dellaporta (Dellaporta, 1983), com algumas modificações, amostras de 100 mg de tecidos vegetais foram maceradas em nitrogênio líquido usando almofariz de porcelana e pistilo. Os macerados foram homogeneizados com tampão de extração (Tris-HCl 100 mmol L⁻¹ pH 8, NaCl 500 mmol L⁻¹, EDTA 50 mmol L⁻¹ e β-mercaptoetanol 10 mmol L⁻¹) e agitados por 5 s em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado à mistura 33 µL de SDS 20 % (p/v) e manteve agitação por 2 min em vortex. Após este período, foram adicionados 160 µL de acetato de potássio 5 mol L⁻¹, e a mistura agitada por 2 min em vortex. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 16 000 g durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi precipitado com isopropanol 50 % (v/v) por 30 min em banho de gelo e centrifugado a 13 500 g por 10 min. O pellet foi lavado utilizando etanol 70 % (v/v), seco durante 5 min em SpeedVac e ressuscitado em 30 µL de água estéril. A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8 % (p/v) em TBE 1X, corado com brometo de etídeo 0,1 µg mL⁻¹.

2.1.3. Reação de PCR (Polimerase Chain Reaction)

Os DNAs das plantas de tabaco foram analisados por PCR utilizando os primers 4076F e 4077R, específicos para uma região interna do cDNA *GmTP-55*. Na reação de PCR foram utilizados aproximadamente 20 ηg de DNA genômico da planta, 10 ρmoles dos oligonucleotídeos correspondentes, dNTPs 0,25 mmol L⁻¹ cada, 1 U de Taq Polimerase e tampão (MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, Tris-HCl 2 mmol L⁻¹ pH 8,4, KCl 50 mmol L⁻¹) para um volume final de 50 µL. As condições de reação adotadas consistiram de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos (45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C e 1 min a 72 °C), seguindo 10 min a 72 °C. A reação de amplificação foi conduzida em um termociclador GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems e os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1 % (p/v) e corados com brometo de etídeo 0,1 µg mL⁻¹.

2.2. Condução do ensaio

As mudas foram transferidas (duas por vaso) para vasos contendo 4 L de solução nutritiva (Clark, 1975) a 1/5 da força iônica original (Figura 1). Durante o período de

um mês, as plantas foram aclimatadas aumentando-se gradativamente a força iônica da solução nutritiva a cada troca, que era realizada semanalmente, até atingir a força iônica original. O pH foi mantido em $5,5 \pm 0,1$ e as soluções foram continuamente aeradas durante todo o período de condução do experimento, para manter uma boa oxigenação do sistema radicular.



Figura 1. Foto ilustrativa da condução do ensaio, destacando o cultivo de duas plantas de tabaco por vaso em solução nutritiva.

Após o período de aclimação, as plantas foram cultivadas durante quatro dias em solução nutritiva na concentração original (Clark, 1975) contendo doses crescentes de Cd, sendo os tratamentos definidos pela adição de solução de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ à solução nutritiva nas doses 0; 5,5 e 22,5 mg L^{-1} de Cd. Essas doses foram definidas com base em trabalhos encontrados na literatura realizados com estresse de Cd em plantas de tabaco.

O ensaio foi montado no esquema fatorial 3×3 [3 linhagens de tabaco, 2 transgênicas e 1 “wild”; 3 doses de Cd (0; 5,5 e 22,5 mg L^{-1})] com 4 repetições, no delineamento em blocos casualizados, totalizando 36 parcelas experimentais. A coleta do material para análises foi realizada quatro dias após a aplicação de Cd à solução nutritiva.

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da UFV, em Viçosa, MG, sob condições naturais de luz e temperatura, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2014. Durante o ciclo de vida das plantas foram feitas avaliações das características fenotípicas das mesmas.

2.3. Determinação do teor de Cd nas plantas

Cada planta coletada foi dividida em raiz e parte aérea. As raízes foram lavadas em água corrente por 1 min, em solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ por 1 min e, em seguida, enxaguadas por 1 min em água desmineralizada.

Para a determinação dos teores de Cd no material vegetal, as amostras foram secas em estufa a 65 °C até atingirem peso constante. A massa de matéria seca da parte aérea e da raiz de cada amostra foi determinada. As amostras foram trituradas em moinho tipo Willey e, posteriormente, foi feita a digestão das amostras adicionando-se 10 mL de uma mistura de ácido nítrico e perclórico, na proporção 3,5:1 (v/v) em aproximadamente 0,5 g de material vegetal (Malavolta *et al.*, 2007). A determinação do teor de Cd nos extratos foi feita por Espectrofotometria de Absorção Atômica.

2.4. Determinação do conteúdo de Cd nas plantas

O conteúdo de Cd na raiz ou na parte aérea das plantas, expresso por µg de Cd, foi calculado através do produto entre a produção de matéria seca na raiz ou na parte aérea e o respectivo teor de Cd. O conteúdo total de Cd de cada planta foi calculado através da soma dos conteúdos de Cd encontrados na sua raiz e parte aérea.

2.5 Cálculos da redução relativa de matéria seca (RRMS) e do índice de translocação (IT)

A redução relativa de matéria seca (RRMS) foi calculada com o objetivo de se avaliar a produção de matéria seca das plantas expostas a cada dose de Cd (5,5 e 22,5 mg L⁻¹) em relação ao tratamento controle (ausência de Cd), para cada uma das linhagens, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$RRMS = \frac{(\text{Controle} - \text{Tratamento})}{\text{Controle}} 100$$

RRMS – Redução relativa de matéria seca (%);

Controle – Produção de matéria seca das plantas cultivadas na ausência de Cd;

Tratamento – Produção de matéria seca das plantas cultivadas nas doses 5,5 e 22,5 mg L⁻¹ de Cd.

O índice de translocação (IT), que se refere ao movimento ou à transferência de Cd da raiz para a parte aérea da planta, foi calculado a partir do conteúdo de Cd na parte aérea e no sistema radicular de acordo com Abichequer e Bohnen (1998), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$IT = \frac{CPA}{CR + CPA} 100$$

IT – Índice de translocação de Cd da raiz para a parte aérea (%);

CPA – Conteúdo de Cd na parte aérea (μg);

CR – Conteúdo de Cd na raiz (μg).

2.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, com desdobramento dos graus de liberdade da interação genótipo x dose Cd. As médias foram testadas a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção e análise molecular das plantas transgênicas

As plantas de tabaco (*Nicotiana tabaccum* variedade “Havana”) utilizadas neste experimento foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa (BIOAGRO-UFV).

As linhagens transgênicas utilizadas foram 35S:*GmTP55*-S3 (senso) e 35S:*GmTP55*anti-4 (anti-senso). O cDNA do gene *TP-55*, que codifica a enzima ALDH7A, construído na orientação senso leva à elevada produção da aldeído desidrogenase (ALDH7A) normal. A construção na orientação anti-senso suprime a indução da expressão de ALDH7A, alterando assim seus níveis basais. Estas construções senso e anti-senso, ou seja, superexpressão e a supressão da expressão do gene foram utilizadas na tentativa de se avaliar a possível função protetora da enzima ALDH7A em condições de estresse provocada por Cd. Para o tratamento controle, foram utilizadas linhagens não-transformadas (selvagem ou “wild type”).

O material vegetal foi repicado *in vitro* e, vinte dias depois, um fragmento de folha (disco foliar) foi retirado para confirmação da transformação das plantas através de extração de DNA e PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

O diagnóstico da incorporação do gene *GmTP-55* foi determinado por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos 4076F (CCATGCGCTGTTCTAGGATGG) e 4077R (GCCCAACTAGAGTCCCCTTCTC) que amplificaram um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 500 pb, a partir de DNA dos transformantes, mas não de plantas controle (WT) (Figura 2).

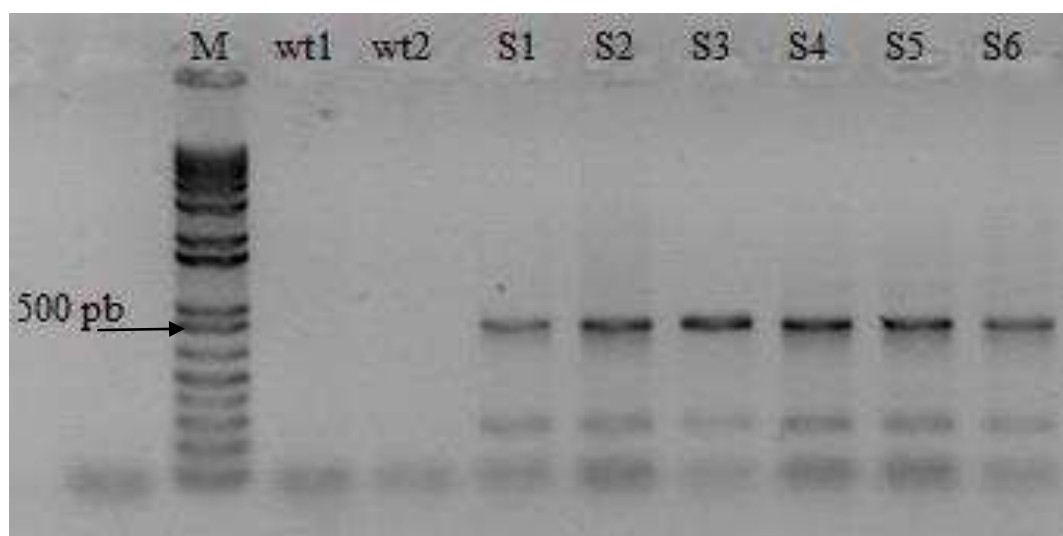


Figura 2. Gel de agarose corado com brometo de etídeo mostrando a confirmação dos transformantes de tabaco, por “PCR”, utilizando os primers 4076F e 4077R específicos para uma região interna do cDNA da *TP-55*. M: marcador molecular. Wt1: planta selvagem 1. Wt2: planta selvagem 2. S1, S2, S3, S4, S5 e S6: plantas de tabaco confirmadas para o transgene.

As plantas confirmadas das linhagens transgênicas, assim como as “wild type”, foram repicadas novamente em meio MS e mantidas em ambiente controlado de crescimento por trinta dias para obtenção das mudas utilizadas no experimento.

3.2. Sintomas visuais

Os sintomas de toxicidade devido ao Cd nas plantas de tabaco começaram a surgir no segundo dia após a aplicação dos tratamentos. Os primeiros sintomas foram observados nas plantas expostas à dose mais elevada de Cd (22,5 mg L⁻¹), nas três

linhagens estudadas, caracterizando-se pela murcha das folhas e aparecimento de manchas avermelhadas em suas nervuras. Durante todo o período de condução do experimento, os sintomas observados foram mais severos na linhagem anti-senso, sendo que as linhagens senso e WT não diferiram entre si quanto ao grau de severidade dos sintomas (Figura 3). Já aos quatro dias de exposição ao Cd, as plantas apresentaram danos severos no sistema radicular, murcha acentuada, manchas avermelhadas nas nervuras das folhas, encarquilhamento das folhas novas, clorose internerval e redução do crescimento. Esses sintomas foram observados nas plantas crescidas nos tratamentos com 5,5 e 22,5 mg L⁻¹, sendo mais intensos na maior dose (Figura 4). Sintomas similares de toxicidade ao Cd também foram relatados em plantas de aguapé por Oliveira *et al.* (2001), cujas plantas apresentaram clorose internerval das folhas, escurecimento acentuado das raízes e acúmulo de antocianinas nos pecíolos e estolões.



Figura 3. Plantas de tabaco, transgênicas (senso e anti-senso) e não transgênicas (WT), crescidas em solução nutritiva contendo 5,5 mg L⁻¹ Cd.

O aparecimento de clorose em plantas crescidas na presença de Cd pode ocorrer pela diminuição na síntese de clorofila e danos estruturais no cloroplasto, causados pelo metal (Huang *et al.*, 1974; Barceló *et al.*, 1988). Reduções no crescimento são respostas gerais da toxicidade dos metais pesados nas plantas (Lepp, 1981), pois esses metais interferem em importantes processos fisiológicos, como transpiração, respiração e fotossíntese (Lee *et al.*, 1976; Van Assche *et al.*, 1988). Quando a concentração de Cd se torna elevada nas plantas, há um declínio metabólico com perda da turgidez foliar e redução da abertura estomática, reduzindo a disponibilidade de carbono para a

fotossíntese acarretando na redução da taxa de crescimento (Barcelo e Poschenrieder, 1990; Soares *et al.*, 2005).

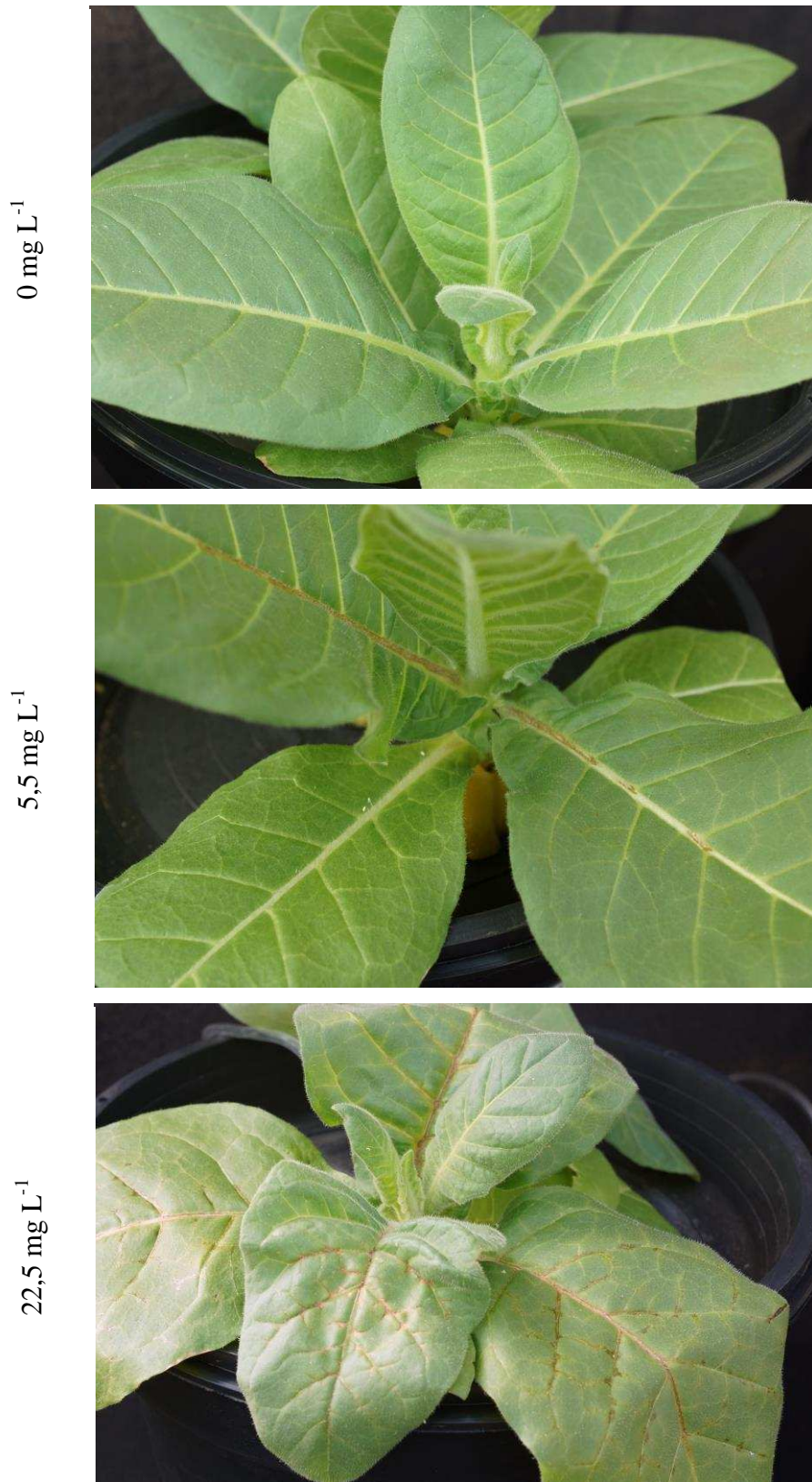


Figura 4. Sintomas de toxidez de Cd em plantas de tabaco crescidas em solução nutritiva contendo 0; 5,5 e 22,5 mg L⁻¹ de Cd.



Figura 5. Raízes das plantas de tabaco (Sensu, Anti-sensu e WT) tratadas com 0; 5,5 e 22,5 mg L⁻¹ de Cd, quatro dias após a aplicação das soluções contendo Cd nas concentrações referentes aos tratamentos.

O sistema radicular foi afetado de forma mais acentuada do que a parte aérea, o que talvez seja explicado pelo contato direto das raízes com o Cd na solução nutritiva e pela potencialidade do tabaco em tolerar altas quantidades de Cd nas folhas (Isaure *et al.*, 2010). Houve visível redução do crescimento do sistema radicular, com diminuição do tamanho e da quantidade das raízes laterais, principalmente nas plantas expostas à maior dose de Cd. As raízes apresentavam-se mais claras nas plantas crescidas nas soluções sem Cd, pardas nas plantas expostas ao Cd, e com coloração mais escura na solução nutritiva contendo a maior dose de Cd (Figura 5). Oliveira *et al.*, (2001) observaram alterações no modo de crescimento, na morfologia e na arquitetura do sistema radicular de *salvília* sob altas doses de Cd, o que levou à inibição do crescimento e ao engrossamento e encurtamento das raízes. Sabe-se que o Cd inibe o crescimento de raízes, danifica os pelos radiculares e as pontas das raízes por modificar a composição lipídica da membrana plasmática, aumentando os níveis de peroxidação de lipídeos (Zuli e Zhonghong, 2010). Investigando os efeitos fitotóxicos de Cd em raízes de tabaco, Zuli e Zhonghong (2010) mostraram que o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumentou com o incremento das doses de Cd na solução nutritiva. As EROs, em concentrações elevadas, podem ser altamente prejudiciais às

plantas, podendo oxidar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, alterar a estrutura celular e provocar mutagênese (Vitória *et al.*, 2001).

3.3. Efeito do cádmio sobre a produção de matéria seca

Nas três linhagens de tabaco estudadas, a produção de matéria seca das plantas diminuiu com o incremento das doses de Cd na solução nutritiva (Tabela 1). A linhagem anti-senso apresentou sensibilidade ao Cd significativamente maior do que as linhagens senso e WT, em termos de redução relativa de matéria seca, tanto na raiz quanto na parte aérea. Nos tratamentos com 5,5 mg L⁻¹ de Cd, a redução do crescimento relativo foi de 25,55 % nas raízes e 1,95 % na parte aérea das plantas senso, de 18,34 % nas raízes e 3,75 % na parte aérea das plantas WT, enquanto a anti-senso atingiu reduções de 60,13 % nas raízes e 33,97 % na parte aérea, evidenciando a maior sensibilidade desta linhagem ao Cd.

A exposição das plantas a níveis tóxicos de Cd resulta em forte interferência sobre o crescimento das plantas. Uma hipótese para isso seria a diminuição da síntese de compostos ricos em grupos tiol, que poderiam complexar e impedir a ação do metal sob tal condição de estresse (Ding *et al.*, 1994). Nessa condição, o Cd poderia provocar danos às membranas, causar distúrbios hormonais, alterar a atividade de várias enzimas e inibir a fotossíntese, resultando em eventual morte das plantas (Barcelo e Poschenrieder, 1990). Outra hipótese para a redução na produção de matéria seca seria os efeitos negativos do Cd sobre a absorção, transporte e uso de nutrientes essenciais ao metabolismo da planta, como P, K, Ca, Mg, S, Mn, Fe, Zn, Mn e nitrato, bem como da água (Hernandez *et al.*, 1996; Das *et al.*, 1997; Kurdziel *et al.*, 2004; Kabata-Pendias, 2011).

Tabela 1. Produção média de massa de matéria seca (g) de raiz, parte aérea e total das linhagens senso, anti-senso e WT de tabaco, submetidas às doses 0; 5,5 e 22,5 mg L⁻¹ de Cd em solução nutritiva.

Linhagem	Raiz			PA			Total		
	D 0	D 5,5	D 22,5	D 0	D 5,5	D 22,5	D 0	D 5,5	D 22,5
 g.....								
Senso	0,6 Aa	0,48 Ba	0,27 Ca	2,02 Aa	1,98 Aa	1,39 Ba	2,67 Aa	2,46 Ba	1,66 Ca
Anti-senso	0,6 Aa	0,25 Bb	0,18 Cb	1,96 Aa	1,29 Bb	1,03 Cb	2,59 Aa	1,54 Bb	1,2 Cb
WT	0,6 Aa	0,5 Ba	0,26 Ca	1,98 Aa	1,90 Aa	1,48 Ba	2,61 Aa	2,42 Ba	1,73 Ca

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Após quatro dias de aplicação dos tratamentos, a produção de matéria seca das raízes foi reduzida em 59, 72 e 60 %, nas linhagens senso, anti-senso e WT, respectivamente, comparando-se as plantas cultivadas na presença de 22,5 mg L⁻¹ de Cd, com as testemunhas (ausência de Cd). Na parte aérea, essa redução foi de 31% na linhagem senso, 48 % na anti-senso e 25 % na WT (Tabela 2). As linhagens senso e WT tratadas com 5,5 mg L⁻¹ de Cd, não apresentaram diferença significativa na produção de matéria seca da parte aérea em relação às plantas cultivadas na ausência de Cd (Tabela 1). Estes resultados mostram que o sistema radicular das plantas de tabaco foi mais sensível aos danos causados pela toxicidade de Cd do que a parte aérea, corroborando com as observações fenotípicas descritas no tópico anterior. A raiz, possivelmente por constituir a parte da planta que está diretamente em contato com o metal pesado, sofreu mais intensamente os efeitos tóxicos do Cd sobre a taxa de crescimento relativo nas três linhagens.

Tabela 2. Redução relativa de matéria seca (%) de raiz, parte aérea e total das linhagens senso, anti-senso e WT de tabaco, submetidas às doses 0; 5,5 e 22,5 mg L⁻¹ de Cd em solução nutritiva.

Linhagem	Raiz		PA		Total	
	D 5,5	D 22,5	D 5,5	D 22,5	D 5,5	D 22,5
 %.....					
Senso	25,55 Bb	58,80 Ba	1,95 Bb	31,29 Ba	7,68 Bb	37,91 Ba
Anti-senso	60,13 Ab	72,10 Aa	33,97 Ab	47,49 Aa	40,32 Ab	53,47 Aa
WT	18,34 Bb	59,88 Ba	3,75 Bb	25,31 Ba	7,33 Bb	33,7 Ba

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

3.4. Absorção e distribuição de cádmio nas plantas

O incremento nas doses de Cd na solução nutritiva resultou em aumento do teor de Cd tanto nas raízes como na parte aérea das plantas das três linhagens (Tabela 3). Esse aumento foi significativamente maior nas raízes do que na parte aérea, provavelmente devido a maior redução relativa de matéria seca nas raízes, resultando em efeito de concentração de Cd nessa estrutura da planta. O contato direto das raízes com o Cd na solução nutritiva também pode ter contribuído para que as raízes apresentassem maior teor desse metal que a parte aérea.

Entre as linhagens, os teores de Cd na parte aérea e nas raízes apresentaram pequena variação, sendo que a linhagem anti-senso apresentou, em média, teores de Cd menores em comparação às outras linhagens.

Houve maior absorção de Cd pelas plantas senso e WT (Tabela 4). Os menores conteúdos médios de Cd, tanto na raiz quanto na parte aérea, foram observados na linhagem anti-senso. Adicionalmente, não houve diferença significativa entre os conteúdos de Cd nas plantas dessa linhagem crescidas nos tratamentos com 5,5 e 22,5 mg L⁻¹. A ocorrência de danos mais severos ao sistema radicular da linhagem anti-senso foi a causa da menor absorção de Cd dessa linhagem quando exposta ao Cd.

Tabela 3. Teor de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$) na parte aérea e raiz das linhagens senso, anti-senso e WT de tabaco, submetidas às doses 0; 5,5 e 22,5 mg L^{-1} de Cd em solução nutritiva.

Linhagem	Raiz			PA		
	D 0	D 5,5	D 22,5	D 0	D 5,5	D 22,5
 $\mu\text{g g}^{-1}$					
Senso	6,53 Ca	2465,67 Ba	3883,78Ab	7,14 a	880,65 Ba	1066,77 Aab
Antti-senso	6,42 Ca	2316,14 Bb	3753,01 Ac	7,55Ca	800,80 Bb	1038,00 Ab
WT	6,40 Ca	2365,86 Bb	4071,80 Aa	7,49 a	865,06 Ba	1101,74 Aa

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Nas linhagens senso e WT, houve uma diminuição do acúmulo de Cd nas plantas com o aumento das doses de Cd na solução nutritiva. Entre os vários fatores que afetam a absorção, está a massa do sistema radicular. Considerando que houve acentuada redução na produção de matéria seca das raízes expostas à maior dose de Cd devido aos danos provocados pela sua fitotoxicidade, isso poderia explicar a menor eficiência na absorção desse elemento pelas raízes das plantas. Oliveira *et al.* (2001) observaram elevado decréscimo na absorção de Cd por plantas de salvinia, à medida que se aumentou o tempo de exposição, evidenciando os efeitos tóxicos do metal sobre o processo de absorção.

O acúmulo de Cd, nas três linhagens, foi significativamente maior na parte aérea do que na raiz (Tabela 4). A parte aérea apresentou maior incremento de massa de matéria seca do que as raízes, podendo, assim, explicar o maior acúmulo do Cd absorvido naquela parte da planta. Clarke e Brennam (1989), investigando o acúmulo e a fitotoxicidade de Cd em 16 diferentes cultivares de tabaco, observaram que o Cd era preferencialmente acumulado nas folhas, seguidas das raízes e do caule. Oliveira *et al.* (2001) atribuiu a distribuição preferencial de Cd na parte aérea de salvinia ao maior crescimento apresentado por essa parte da planta, uma vez que os efeitos tóxicos do Cd foram mais intensos nas raízes.

Tabela 4. Conteúdo de Cd (μg) na parte aérea, raiz e total das linhagens senso, anti-senso e WT de tabaco, submetidas às doses 0; 5,5 e 22,5 mg L^{-1} de Cd em solução nutritiva.

Linhagem	Raiz			PA			Total		
	D 0	D 5,5	D 22,5	D 0	D 5,5	D 22,5	D 0	D 5,5	D 22,5
 μg								
Senso	4,19Ca	1177,7Aa	1029,3Ba	14,4Ca	1746,2Aa	1484,5Bb	18,6Ca	2924,0Aa	2513,9Ba
Anti-senso	4,01Ba	579,21Ab	656,88Ab	14,7Ba	1034,9Ab	1064,9Ac	18,8Ba	1614,1Ab	1721,8Ab
WT	4,06Ca	1223,4Aa	1038,6Ba	14,8Ba	1644,2Aa	1626,1Aa	18,8Ca	2867,7Aa	2664,8Ba

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Várias estratégias de defesa contra metais pesados tóxicos foram desenvolvidas pelas plantas, incluindo complexação e quelação com ligantes fortes, e compartimentação em tecidos específicos, células e organelas celulares (Clemens, 2006). A acumulação de metais dentro de tricomas, células especializadas localizadas na superfície das folhas, foi documentado em várias espécies vegetais (Kupper *et al*, 2000; Zhao *et al*, 2000; Isaure *et al*, 2006; Sarret *et al*, 2009). Os metais pesados podem também ser excretados na parte superior deste apêndice. Isaure *et al* (2010) relataram que, em plantas de tabaco, a eliminação de Cd através da produção de cristais de Ca contendo Cd na parte superior dos tricomas das folhas é um potente mecanismo de desintoxicação. Plantas que translocam e toleram altas quantidades de metais pesados na parte aérea são interessantes para serem usadas como estratégia de fitoextração de metais em ambientes contaminados. Investigando a capacidade de plantas de mamona, girassol, pimenta da Amazônia e tabaco em extrair metais de solo contaminado, Zeitouni *et al* (2007) concluíram que a planta mais eficiente em extrair Cd e Zn do solo enriquecido com metais foi o tabaco.

A translocação de Cd da raiz para a parte aérea não variou muito entre os tratamentos com 5,5 e 22,5 mg L^{-1} , nem entre as linhagens (Tabela 5). O menor índice de translocação observado foi de 57,34 % na linhagem WT e o maior foi de 64,16 % na linhagem anti-senso, ambos nos tratamentos com 5,5 mg L^{-1} de Cd. Nos tratamentos com 22,5 mg L^{-1} de Cd, a translocação desse metal para a parte aérea foi de 59,02 % na

linhagem senso, 61,85 % na anti-senso e 61,04 % na WT. Essas observações evidenciam a maior tendência pelo tabaco em acumular Cd nas folhas.

Esse padrão de translocação é indesejável do ponto de vista de toxicidade humana, quando se leva em consideração que as folhas de tabaco são destinadas à comercialização para a produção de cigarros. O tabagismo é uma das principais fontes de exposição ao cádmio para a população (CETESB, 2012). Esse hábito aumenta a exposição ao Cd já que as folhas de tabaco acumulam naturalmente altas quantidades do metal. Estima-se que fumantes estão expostos a 1,7 µg de Cd por cigarro e cerca de 10 % é inalado quando se fuma (CETESB, 2012). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classifica o Cd e seus compostos como cancerígeno para o ser humano (Grupo 1), com base em evidência de tumores pulmonares em trabalhadores e animais expostos por via inalatória (CETESB, 2012).

Tabela 5. Índice de Translocação de Cd (%) na parte aérea e raiz das linhagens senso, anti-senso e WT de tabaco, submetidas às doses 0; 5,5 e 22,5 mg L⁻¹ de Cd em solução nutritiva.

Linhagem	Raiz			PA		
	D 0	D 5,5	D 22,5	D 0	D 5,5	D 22,5
 %.....					
Senso	22,51 Ab	40,28 Aa	40,98 Aa	77,49 Aa	59,72 Bb	59,02 Ab
Anti-senso	21,40 Ab	35,84 Ba	38,15 Aa	78,60 Aa	64,16 Ab	61,85 Ab
WT	21,53 Ac	42,66 Aa	38,96 Ab	78,47 Aa	57,34 Bc	61,04 Ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Investigando a função do gene *GmTP-55*, que codifica a aldeído desidrogenase ALDH7A, em plantas transgênicas de tabaco e arábida, Rodrigues *et al* (2006) observaram que em condições de estresse salino, hídrico e oxidativo, as plantas transgênicas mostraram melhor desempenho em relação às plantas controle. Segundo esses autores, é plausível sugerir que a expressão do gene *GmTP-55*, que codifica essa proteína, esteja envolvido em respostas celulares adaptativas relacionadas com detoxificação de produtos tóxicos, como os aldeídos.

No presente trabalho, não se observou nenhuma vantagem adquirida com a expressão da proteína ALDH7A nas plantas de tabaco. Os sintomas das plantas

transgênicas transformadas com o gene *GmTP-55* na orientação senso não diferiram das plantas controle (WT). No entanto, as plantas transformadas com o gene na orientação anti-senso, ou seja, que têm a expressão de ALDH7A suprimida, exibiram sintomas mais acentuados de toxicidade devido ao Cd. Esses resultados sugerem que a expressão desse gene possa ser importante para ativar mecanismos de resposta ao estresse oxidativo causado pelo Cd nas plantas, pois, mesmo que não tenha sido observada tolerância diferencial das plantas senso em relação às plantas WT, a supressão da expressão desse gene levou a maiores danos causados pela toxicidade do Cd nas plantas anti-senso.

RESUMO E CONCLUSÕES GERAIS

A exposição a doses crescentes de cádmio (Cd) afetou de maneira negativa o crescimento e o desenvolvimento das três linhagens de soja, tornando evidentes os efeitos tóxicos do metal sobre o metabolismo vegetal. A linhagem WT apresentou sensibilidade ao Cd significativamente maior do que as linhagens transgênicas, em termos de redução relativa de matéria seca. O teor e o conteúdo de Cd aumentaram, tanto na raiz como na parte aérea das plantas das três linhagens, em função do incremento das doses de Cd no meio de cultivo. As linhagens transgênicas apresentaram maior capacidade de absorver o Cd e transportá-lo para a parte aérea, apresentando maiores acúmulos de metal em ambas as partes das plantas, ao mesmo tempo em que mostraram menor redução da produção de matéria seca, indicando, possivelmente, maior tolerância ao Cd. A retenção de Cd no sistema radicular aumentou nas três linhagens estudadas em função do incremento das doses desse metal. As plantas expostas à maior dose de Cd apresentaram sintomas de manchas avermelhadas nos caules, pecíolos e nervuras das folhas, escurecimento de raízes, clorose internerval, encarquilhamento e murcha que evoluíram para secagem das folhas do ápice, porém, foi observado um fenótipo tolerante das linhagens transgênicas, apresentando sintomas mais brandos de toxicidade e melhor desempenho em relação às plantas controle (WT). No presente trabalho, os resultados observados nas plantas de soja expressando BiP nos tratamentos com exposição ao Cd sugerem a possibilidade dessas plantas apresentarem mecanismo de tolerância ao Cd, de forma semelhante ao que ocorre com a tolerância ao déficit hídrico nessas plantas. Experimentos adicionais são necessários para confirmar essa ocorrência em relação ao estresse causado pela exposição ao Cd.

As plantas das três linhagens de tabaco estudadas tiveram o crescimento e o desenvolvimento afetados de maneira negativa, devido à exposição a doses crescentes de Cd. A linhagem anti-senso apresentou sensibilidade ao Cd significativamente maior do que as linhagens senso e WT, em termos de redução relativa de matéria seca. O incremento nas doses de Cd na solução nutritiva resultou em aumento do teor de Cd nos tecidos das plantas das três linhagens e diminuição no acúmulo desse metal nas linhagens senso e WT. Houve menor absorção de Cd pelas plantas anti-senso, provavelmente devido à ocorrência de danos mais severos ao sistema radicular e aos

vasos condutores, evidenciando a maior sensibilidade dessa linhagem a toxicidade causada pelo Cd. Houve distribuição preferencial de Cd na parte aérea das três linhagens, evidenciando a maior tendência pelo tabaco em acumular Cd nessa estrutura das plantas. As plantas expostas ao Cd apresentaram danos severos no sistema radicular, murcha acentuada, manchas avermelhadas nas nervuras das folhas, encarquilhamento das folhas novas, clorose internerval e redução do crescimento, observando-se maior severidade desses sintomas na linhagem anti-senso. Investigando a função do gene *GmTP-55*, que codifica a aldeído desidrogenase (ALDH7A), em plantas transgênicas de tabaco e *arabidopsis*, Rodrigues *et al.* (2006) observaram que em condições de estresse salino, hídrico e oxidativo, as plantas transgênicas mostraram melhor desempenho em relação às plantas controle. No presente trabalho, não se observou nenhuma vantagem adquirida com a expressão da proteína ALDH7A nas plantas de tabaco. Os sintomas das plantas transgênicas transformadas com o gene *GmTP-55* na orientação senso não diferiram das plantas controle (WT). No entanto, as plantas transformadas com o gene na orientação anti-senso, ou seja, que têm a expressão de ALDH7A suprimida exibiram sintomas mais acentuados de toxicidade devido ao Cd. Esses resultados sugerem que a expressão desse gene seja importante para ativar mecanismos de resposta ao estresse oxidativo causado pelo Cd nas plantas, pois, mesmo que não tenha sido observada tolerância diferencial das plantas senso em relação às plantas WT, a supressão da expressão desse gene levou a maiores danos causados pela toxicidade do Cd nas plantas anti-senso.

REFERÊNCIAS

- ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.22, p.21-26, 1998.
- ALVIM, F.C., CAROLINO, S.M.B., CASCARDO, J.C.M., NUNES, C.C., MARTINEZ, C.A., OTONI, W.C. AND FONTES, E.P.B. *Plant Physiol* 126, 1042-1054, 2001.
- BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition*, n.13, p.1-37, 1990.
- BARCELO J, VAZQUEZ MD, POSCHENRIEDER C.. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytologist* 108, 37–49. 1988.
- BARCLAY, K. D.; MCKERSIE, B. D. Peroxidation reactions in plant membranes – effects of free fatty acids. *Lipids*, v. 29, p. 877-882, 1994.
- BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends Plant Sci*, v. 6, p. 284-286, 2001.
- BOSTON, R.S.; VIITANEN, P. V. AND VIERLING, E. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, v. 2, p. 191-222, 1996.
- BRAY. E. A. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55 (407): 2331-2341, 2004.
- CARVALHO, H.H. de. Função fisiológica e molecular da proteína BiP em eventos de morte celular programada em plantas. Viçosa, MG. Tese de doutorado. 2013.
- CASCARDO JC, Almeida RS, Buzeli RA, Carolino SM, Otoni WC, Fontes EBP: The phosphorylation state and expression of soybean BiP isoforms are differentially regulated following abiotic stresses. *JBC* 12:14494-14500, 2000.
- CATALDO, D.A.; GARLAND, T.R.; WILDUNCI, ItE. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant Physiology*, Rockville, v.73, p.844-848, 1983.
- CETESB. Ficha de informação toxicológica. Cádmio e seus compostos. 2012.
- CHAFFEI C, PAGEAU K, SUZUKI A, GOUIA H, GHORBEL MH, MASCLAUX-DAUBRESSE C. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol*. 45:1681-1693. 2004.
- CHANEY, R.L.; RYAN, J.A.; LI, Y-M.; BROWN, S.L. Soil cadmium as a threat to human health. In: MCLAUGHLIN, M.J.; SINGH, B.R. (Ed.). *Cadmium in Soils and Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publ. p.219–256, 1999.

- CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. *Environmental Pollution*, v. 92, p.1-5, 1996.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.*, 23:458-60, 1975.
- CLARKE, B. B., BRENNAN, E. Differential cadmium accumulation and phytotoxicity in sixteen tobacco cultivars. *JAPCA* 39: 1319-1322. 1989.
- CLEMENS S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimistry* 88, 1707–1719, 2006.
- DALCORSO, G. FARINATI, S. FURINI, A. Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signaling & Behavior.*; 5:6, 663-667. 2010.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, v. 98, p. 29-36, 1997.
- DAVIS DG, SWANSON HR Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *Environ. Exp. Bot.* 46:95-108, 2001.
- DE FILIPPIS LF, ZIEGLER H. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *J. Plant Physiology*.142:167-172, 1993.
- DELLAPORTA SL, WOOD J, HICKS JB. A plant DNA miniprep version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-21, 1983.
- DENECKE, J. Soluble endoplasmic reticulum resident proteins and their function in protein synthesis and transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 34, p. 197-205, 1996.
- DEVI, S.R.; PRASAD, M.N.V. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. Springer, printed in India, p.127-145, 2004.
- DING, X., JIANG, J. WANG, Y., WANG, W., RU, B. Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. *Environmental Pollution*, v. 84, p. 93-96, 1994.
- FIGUEIREDO J.E.F., CASCARDO, J.C.M., CAROLINO, S.M.B.; ALVIM, F.; FONTES, E.P.B. Water-stress regulation and molecular analysis of the soubean BiP gene family. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.9, p. 103-110, 1997.
- FINK, A. L. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, v. 79, n. 2, p. 425-49. 1999.
- GETHING, M.J. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465-472, 1999.
- GODBOLD, D.L.; HUTTERMANN, A. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation of *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest dieback. *Environmental and Pollution*.v. 38, p. 509-516, 1985.

- GONZALEZ-MENDOZA D AND ZAPATA-PEREZ O. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente toxicos en plantas. *Bol Soc Bot Mex* 82: 41-49, 2008.
- GUERRERO, F. D., JONES, J. T., MULLET, J. E. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Molecular Biology*, 15: 11-26, 1990.
- GUIMARÃES, M. A.; SANTANA.T. A.; SILVA, E. V.; ZENZENI. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*. N. 3, v. 1, p. 58, 2008.
- GUPTA, M., DEVI, S. Cadmium sensitivity inducing structural responses in *Salvinia moléstia* Mitchell. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, v. 49, p. 436-443, 1992.
- HASAN, S.A., Q. FARIDUDDIN, B. ALI, S. HAYAT AND A. AHMAD. Cadmium: Toxicity and tolerance in plants. *J.Environ. Biol.*, 30(2): 165-174, 2009.
- HEGEDÜS A., ERDEI S., HORVÁTH G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.*, 60: 1085–1093, 2001.
- HERNÁNDEZ L.E., CÁRPENA-RUIZ R, GARATE A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutr.* 19: 1581-1598, 1996.
- HUANG CY, BAZZAZ FA, VANDERHOEF LN.. Inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant. Phys.* 54: 122-124. 1974.
- ISAURE M. P., FAYARD B., SARRET G., PAIRIS S. AND BOURGUIGNON J. Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and Xray spectromicroscopy. *Spectrochemistry. Acta B* 61, 1242–1252, 2006.
- ISAURE, M. P., SARRET, G. HARADA, E., CHOI, Y. E., MARCUS, M. A., FAKRA, S. C. GEOFFROY, N. PAIRIS, S. SUSINI, J., CLEMENS, S., MANCEAU, A. Calcium promotes cádmium elimination as vaterite grains by tobacco trichomes. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74. P. 5817-5834, 2010.
- JIANG, R.F.; MA, D.Y.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). *New Phytologist*, v. 167, p. 805-814, 2005.
- JOHRI, N., JACQUILLET, G. UNWIN, R. Heavy metal poisoning: the effects of cadmium on the kidney. *Biometals*. 23: 783-792. 2010.
- KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 4th ed. 2011.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace Elements in Soils and Plants. 3rd ed. CRC Press, London, p.123 – 167, 2000.

- KUPPER, H.; PARAMESWARAN, A.; LEITENMAIER, B.; TRTILEK, M.; SETLIK, I. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, p.1-20, 2007.
- KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. Springer, printed in India, p.146-181, 2004.
- LEE, K. G., CUNNINGHAM, B. A., PAULSEN, G. N. M., LIANG, G.H., MOORE, R. B. Effect of cadmium on respiration rate and activity of several enzymes in soybean seedlings. *Physiol. Plant.*, v. 36, p. 4-6, 1976.
- LEPP, N.W. Effects of heavy metal pollution on plants. London: *Applied Science*, V. 1. p.352, 1981.
- LIU, S. Y.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response. *Cell Science*, v. 116, p. 1861-1862, 2003.
- LÖSCH, R. Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals. In: PRASSAD, M. N. V. (Ed.). Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. Springer, printed in India, p. 182-200, 2004.
- MA, J.F.; UENO, D.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Subcellular localisation of cadmio and Zn in the leaves of a cadmio-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, v.220, p.731-736, 2005.
- MA W., XU W., XU H., CHEN Y., HE Z., MA M. Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Planta* 232, 325–335. 2010.
- MAIER EA, MATTHEWS RD, MCDOWELL JA, WALDEN RR, AHNER BA. Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution. *J Environ Qual* 32: 1356–1364. 2003.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 319 p,1997.
- MENGEL, K., KIRKBY, E. A. Principles of plant nutrition. International Potash Institute, Switzerland, 1982.
- MITTLER R Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.* 7:405-410, 2002.
- MOLINARI, M.; GALILI, C., PICCALUGA, V.; PIEREN, M.; PAGANETTI, P. Sequential assistance of molecular chaperones and transiente formation of covalente completes during protein degradation from the ER. *The Journal of Cell Biology*, v. 150 (2), p. 247-257, 2002.
- MURASHIGE T, SKOOG FA. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol* 15: 473-479. 1962.

- NAKAZONO, M. TSUJI, H., LI, Y., SAISHO, D., ARIMURA, S., TSUTSUMI, N. HIRAI, A. Expression of a Gene Encoding Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase in Rice Increases under Submerged Conditions. *Plant Physiology*, v. 124, p. 587-598, 2000.
- NASCIMENTO, C. W. A., PEREIRA, J. B. M. Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.32, n.12, p.1303-1308, 1997.
- NOCITO, F.F.; PIROVANO, L.; COCUCCHI, M.; SACCHI, G.A. Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*, v. 129, p. 1872-1879, 2002.
- OLIVEIRA, A. A., CAMBRAIA, J., CANO, M. A. O., JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e salvinha. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(3): 329-341, 2001.
- OLIVEIRA, J. A., OLIVA, M. A., CAMBRAIA, J., AND VENEGAS, V. H. A. Absortion, accumulation and distribution of cádmium by two soybean cvs. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6(2):91-95, 1994.
- PEREIRA GJG, MOLINA SMG, LEA PJ, AZEVEDO RA Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *C. juncea*. *Plant Soil* 239:123-132, 2002
- PEROZICH, J.; NICHOLAS, H. B. J. R.WANG, B. C., LINDAHL. R.; HEMPEL, J. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended Family. *Protein Sci*, 8: 137-146, 1999a.
- PILON M.; SHECHEKMAN R. Protein translocation: how Hsp 70 pulss pff. *The Cell*, v. 7, p. 679-682, 1999.
- RAZINGER, J., DERMASTIA, M., DRINOVEC, L., DROBNE, D., ZRIMEC, A. AND KOCE, J.D. Antioxidative responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure. *Env. Sci. Pollut. Res.*, **14**, 194-201. 2007.
- REIS, P. A. A., ROSADO, G. L., SILVA, L. A. C., OLIVEIRA, L. C., OLIVEIRA, L. B., COSTA, M. D. L., ALVIM, F. C., FONTES, E. P. B. The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rinch Protein-Mediated Signaling Pathway. *Plant Physiology*, v. 157, p. 1853-1865, 2011.
- REIS, P.A. AND FONTES, E.P. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant signaling & behavior* 7, 628-632, 2012.
- RODRIGUES, S. M.; ANDRADE, M. O., GOMES, A. P. S., DAMATTA, F. M., BARACAT-PEREIRA, A. C., FONTES, E. P. B. Arabidopsis and tobacco plants ectopically expressing the soybean antiquitin-like ALDH7 gene display enhanced tolerance to drought, salinity, and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, No. 9, p. 1909-1918, 2006.

- RODRÍGUEZ-SERRANO M, ROMERO-PUERTAS MC, ZABALZA A, CORPAS FJ, GÓMEZ M, DEL RÍO LA, SANDALIO LM. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots: imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant Cell Environ* 29: 1532–1544, 2006
- RODRIGUEZ-SERRANO, M., ROMERO-PUERTAS, M.C., PAZMINO, D.M., TESTILLANO, P.S., RISUENO, M.C., DEL RIO, L.A., SANDALIO, L.M.: Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. - *Plant Physiol.* 150: 229-243, 2009
- ROMERO-PUERTAS M.C, CORPAS F.J, RODRIGUEZ-SERRANO M, GOMEZ M, DEL RÍO L.A, SANDALIO L.M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by Cd in pea plants. *J Plant Physiol* 164: 1346–1357, 2007.
- ROMERO-PUERTAS, M.C.; CORPAS, F. J.; SANDALIO, L. M.; LETERRIER, M.; RODRIGUES-SERRANO, M.; del RIO, L. A.; PALMA, J. M. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytologist*, v. 170, p. 43-52, 2006.
- ROMERO-PUERTAS MC, PALMA JM, GÓMEZ M, DEL RÍO LA, SANDALIO LM. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25: 677–686. 2002.
- RON D, WALTER P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:519–529, 2007.
- RON D, WALTER P: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biology.* 8:519–529, 2007.
- SANDALIO LM, DALURZO HC, GOMEZ M, ROMERO-PUETRAS MC, DEL RÍO LA. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52:2115-2126. 2001.
- SANITA DI TOPPI L, GABRIELLI R. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105–130, 1999.
- SARRET G., WILLEMS G., ISAURE M. P., MARCUS M. A., FAKRA S. C., FRE´ROT H., PAIRIS S., GEOFFROY N., MANCEAU A. AND SAUMITOU-LAPRADE P. Zinc distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* _ *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various zinc accumulation capacities. *New Phytol.* 184, 581–595, 2009.
- SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, v. 74, p. 739-89, 2005
- SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems. 2nd ed. Springer, printed in India, p. 84-126, 2004.

- SOARES, C. R. F. S., SIQUEIRA, J. O., CARVALHO, J. G. MOREIRA, M.S. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. *Revista. Árvore*, Viçosa-MG, v.29, n.2, p. 175-183, 2005.
- SOPHOS, N. A., ZIEGLER T., VASILOU, V. ALDEHYDE dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem. Biol. Interact*, 130-132:323-337, 2001.
- STOBART, A.K.; GRIFFITHS, W.T.; BUKHARI, J.A. & SHERWOOD, R.P. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum*, 63:293-298, 1985.
- TROMBETTA, E.S. AND PARODI, J.A. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 649-76, 2003.
- VALENTE, M. A., FARIA, J. A., SOARES-RAMOS, J. R., REIS, P. A., PINHEIRO, G. L., PIOVESAN, N. D., MORAIS, A. T., MENEZES, C. C., CANO, M. A., FIETTO, L. G., LOUREIRO, M. E., ARAGAO, F. J. AND FONTES, E. P. The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *Journal of Experimental Botany* 60, 533-546, 2009.
- VALENTE, M. A. S. A proteína BiP exerce função protetora contra déficit hídrico em plantas de soja. Viçosa, MG. Tese de doutorado. 2008
- VAN ASSCHE F, CLIJSTERS H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant, Cell and Environment* 13,195–206, 1990.
- VAN ASSCHE, F., CARDINALES, C. CLIJSTERS, H. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. *Environmental Pollution*, v.52, p. 103-115, 1988.
- VASILIOU, V., PAPPA, A., PETERSEN, D. R. Role of aldehyde dehydrogenase in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem. Biol. Interact*, 129, 1-19, 2000.
- VERKLEIJ JAC, SCHAT H. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. in *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. ed Shaw AJ (CRC Press, Boca-Raton, FL), pp 179–193, 1990.
- VESTANA, S., CAMBRAIA, J., RIBEIRO, C., OLIVEIRA, J. A., OLIVA, A. A. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative enzyme response in water hyacinth and salvinia. *Braz. Journal of Plant Physiology*, 23(2):131-139, 2011.
- VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701- 710. 2001.
- WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. V. 533, p. 107-120, 3003.
- WAGNER, G. L. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy*, v. 51, p. 173-212, 1993.

- WAWRZYNSKI, A.; KOPERA, E.; WAWRZYNSKA, A.; KAMINSKA, J.; BAL, W.; SIRKO, A. Effects of simultaneous expression of heterologous genes involved in phytochelatin biosynthesis on thiol content and cadmium accumulation in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, p. 2173–2182, 2006.
- WOOD, A. J., KRAYESKY, S. The role of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in plant stress tolerance. *In Biochemical & Molecular Responses of Plants to the Environment, Research Signpost*. Pp. 1-14, 2002.
- YOSHIDA, A. RZHETSKY, A., HSU, L. C., CHANG, C. Human aldehyde dehydrogenase gene Family. *Eur. Journal Biochem*, v. 251, p. 549-557, 1998.
- YU, H.; WANG, J.; FANG, W.; YUAN, J.; YANG, Z. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Science of the Total Environment*, v.370, p.302–309, 2006.
- ZEITOUNI, C. F., BERTON, R. S., ABREU, C. A. Fitoextração de cádmio e zinco de um latossolo vermelho-amarelo contaminado com metais pesados. *Bragantia*, Campinas, v.66, n.4, p.649-657, 2007.
- ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. *Gene*, 179:21-30, 1997.
- ZHANG H., JIANG Y., HE Z., MA M. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Plant Physiology*, 162: 977–984. 2005.
- ZHANG, K.; KAUFMAN, R.J. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 25935-25938, 2004.
- ZHU, Y.L.; PILON-SMITH, E.A.H.; JOUANIN, L.; TERRY, N. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiology*, v. 119, p. 73–79, 1999.
- ZULI, Y., ZHONGHONG, W., Effect of cádmium on antioxidative capability and phytohormone level in tobacco roots. *Acta Ecológica Sinica*, 30(15): 4109-4118. 2010.