

SABRINA HELENA DA CRUZ ARAUJO

**TOLERÂNCIA DE *Brassica juncea* AO ARSÊNIO E SEU
POTENCIAL PARA A FITOESTABILIZAÇÃO DE SOLOS
CONTAMINADOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2011

SABRINA HELENA DA CRUZ ARAUJO

**TOLERÂNCIA DE *Brassica juncea* AO ARSÊNIO E SEU POTENCIAL PARA
A FITOESTABILIZAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS**

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

APROVADA: 29 de julho de 2011.

Prof^a. Aristéa Alves Azevedo

Prof. Wagner Luiz Araújo

Prof. Adriano Nunes-Nesi
(co-orientador)

Prof. Marcelo Ehlers Loureiro
(orientador)

*Aquele que leva a preciosa semente, andando e chorando,
voltará, sem dúvida, com alegria, trazendo consigo os seus
molhos. Salmo 126:6*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por seu amor incondicional por mim revelado na pessoa de Jesus. Pela inspiração deste trabalho e seu sustento a cada dia, sendo sempre meu melhor amigo.

Aos meus pais que são meus maiores tesouros, pelo amor, pelos exemplos e educação que recebi. Vocês são meus presentes de Deus. Em especial agradeço a minha mãe pela ajuda na casa de vegetação.

Aos meus pastores e amigos da Comunidade Batista da Paz em Viçosa pelas orações, pela torcida e amizade.

Ao meu orientador Professor Marcelo Loureiro pela orientação e apoio, sempre me desafiando a vencer minhas limitações.

A todos os professores da Fisiologia Vegetal por estes dois anos de convivência e aprendizagem. Sinto-me honrada em poder desfrutar da excelência das aulas aqui ministradas.

Aos membros da banca de avaliação da dissertação, professora Aristéa Alves Azevedo, professores Adriano Nunes-Nesi e Wagner Araújo, pelas valiosas sugestões que contribuíram para o enriquecimento do trabalho. Aos meus co-orientadores professores Adriano Nunes-Nesi e doutor Thomas Christopher Rhys Williams.

Aos amigos e colegas de laboratório pela convivência e trabalho em grupo. Em especial aqueles que me ajudaram no desenvolvimento do meu trabalho: Carol, Danilo, Naiara, Daniel, Yesid, Alyne, Samuca, Rosi, Alice e Laíse.

Em especial ao Yesid e Alyne por todos os momentos divertidos que compartilhamos durante o mestrado e que ficarão pra sempre guardados em meu coração.

A todos os técnicos dos laboratórios que sempre nos apóiam na realização das atividades.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal da UFV por esta grande oportunidade.

BIOGRAFIA

Sabrina Helena da Cruz Araujo, filha de Maria Helena da Cruz Araujo e José Geraldo Araujo, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, no dia 13 de abril de 1986. Em janeiro de 2009, graduou-se em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa. Em agosto de 2009 iniciou o curso de mestrado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa, concluído em julho de 2011.

CONTEÚDO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Condições de cultivo e Aplicação do tratamento	7
2.2. Variáveis Analisadas	7
2.2.1. Determinação dos teores de arsênio, fósforo e enxofre	7
2.2.2. Sintomatologia e análise do crescimento	8
2.2.3. Determinação do teor relativo de água	8
2.2.4. Determinação das trocas gasosas	8
2.2.5. Fluorescência da clorofila <i>a</i>	9
2.2.6. Determinação do malonaldeído	9
2.2.7. Determinação de peróxido de hidrogênio	10
2.2.8. Determinação de compostos fenólicos	11
2.3. Análise Estatística	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Teores de arsênio, fósforo e enxofre	12
3.2. Sintomas visuais de toxidez do arsênio em <i>Brassica juncea</i>	14
3.3. Murcha e análise do teor relativo de água em folhas de <i>Brassica juncea</i>	15
3.4. Análise de crescimento de <i>Brassica juncea</i>	16
3.5. Trocas gasosas em folhas de <i>Brassica juncea</i>	199
3.6. Fluorescência da clorofila <i>a</i> em folhas de <i>Brassica juncea</i>	22
3.7. Estresse oxidativo	24
3.8. Compostos fenólicos	24

4.	DISCUSSÃO.....	27
5.	CONCLUSÕES	34
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

RESUMO

ARAÚJO, Sabrina Helena da Cruz. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Tolerância de *Brassica juncea* ao arsênio e seu potencial para a fitoestabilização de solos contaminados**, Orientador: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-orientadores: Adriano Nunes-Nesi e Thomas Christopher Rhys Williams.

O arsênio é considerado o elemento mais perigoso para a saúde humana. Fitorremediação é uma importante tecnologia para amenizar o efeito antropogênico na contaminação ambiental, mas para o seu sucesso é necessário a compreensão detalhada dos mecanismos de tolerância de metais pesados, objetivo deste trabalho. A espécie escolhida foi a *Brassica juncea*, tolerante a vários metais, como cádmio e zinco, e que possui um crescimento rápido. O arsênio foi fornecido a solução nutritiva na forma de arsenato de sódio nas concentrações de 10, 50, 200 e 500 μM , sendo coletados dados aos 6, 10, 13, 14, 15 e 16 dias após a exposição. Quanto maiores os níveis de arsênio presentes no tratamento, maiores os níveis encontrados na planta, havendo um acúmulo de até 5457 mg Kg^{-1} de As nas raízes expostas a 500 μM de arsenato. Esta quantidade foi 26 e 34 vezes superior aquela observada em caules e folhas, respectivamente. Em nenhum dos tratamentos foram observadas alterações na concentração de fósforo. Esta ausência de inibição de acúmulo de fósforo pode significar a presença de um mecanismo de tolerância à toxidez do arsênio neste genótipo. Em contraste, doses de arsênio iguais ou superiores a 50 μM aumentaram os níveis enxofre nas raízes, em paralelo com um aumento no teor de fenóis, ao passo que reduziu os níveis de enxofre na folha. As duas maiores doses de arsenato levaram ao aparecimento de sintomas de toxidez nas folhas, caracterizados por clorose marginal e coloração arroxeadas nas faces abaxiais de folhas velhas. Apesar dos altos níveis de arsênio em raízes, não houve redução no comprimento e na massa seca deste órgão. Na parte aérea por outro lado, foi observada a redução na área foliar, comprimento e massa fresca em plantas tratadas com 200 e 500 μM de arsenato. Adicionalmente observou-se que somente a maior dose reduziu a fotossíntese líquida (A) e condutância estomática (g_s) até o 13º dia. A partir do 14º dia já foi possível observar a queda destes parâmetros em plantas tratadas com 200 μM de arsenato. Maiores períodos na presença altas doses de arsenato permitiram observar que além da

redução da abertura estomática, há uma limitação bioquímica contribuindo para a redução da fotossíntese. A diminuição em *A* esteve associada a limitações na etapa fotoquímica onde ocorreu uma redução na taxa linear de transporte de elétrons (ETR) e na eficiência quântica do fotossistema II [Y(II)], concomitante com o aumento da perda da energia luminosa na forma de calor [Y(NPQ)]. A segunda maior dose (200 µM) não provocou redução em *A* e nos parâmetros fotoquímicos até o 13º dia, com reduções negligíveis na área e massa foliar, com nenhum efeito no crescimento das raízes. Em conjunto, estes resultados permitem evidenciar que o genótipo de *Brassica juncea* em estudo possui tolerância aos níveis de arsênio. Apesar de acumular níveis altíssimos de arsênio nas raízes, estas plantas não apresentaram dano oxidativo, nem redução na acumulação de massa seca nas raízes. O fato de que altos níveis de As seja acumulado nas raízes, com efeitos reduzidos no seu crescimento, indica o grande potencial desta espécie para o seu uso na fitorremediação como uma espécie fitoestabilizadora.

ABSTRACT

ARAUJO, Sabrina Helena da Cruz. M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Tolerance of *Brassica juncea* and its potential for phytostabilization of arsenic-contaminated soils**, Adviser: Marcelo Ehlers Loureiro. Co-advisers: Adriano Nunes-Nesi and Thomas Christopher Rhys Williams.

Arsenic is the more dangerous element to human health. Phytoremediation is an important technology to reduce the antropogenic effect in the environmental contamination, but it is necessary a detailed knowledge of tolerance mechanism, which is the goal of this work. We choose *Brassica juncea*, tolerant plant to several heavy metals, such as cadmium, and a plant of rapid growth. The arsenate was added to nutritive solution at final concentrations of 10, 50, 200 and 500 μM , and data was collected after 6, 10, 13, 14, 15 and 16 days of exposition. Higher the arsenic in the treatment, higher the level found in leaves, stalk and in roots reach the highest level (5457 mg Kg^{-1}). This amount was 26 and 34 times higher than that found in stalk and leaves, respectively. No alteration in phosphorus level was found at any treatment. This absence of phosphate uptake inhibition seems to have a contribution to the tolerance found in this genotype. In contrast, arsenic concentrations equal or higher than 50 μM were associated with increase in sulphur content in roots in parallel with an increase in total phenol content in these organs, while it reduced sulfur levels in leaves. The two highest doses of arsenate led to the appearance of toxicity symptoms in leaves, characterized by marginal chlorosis and purple coloring in the abaxial faces of old leaves. Despite the highest levels of arsenic in roots, no change in root length and dry weight was detected. In shoot however, we observed reduction in leaf area, length and fresh weight in plants treated with 200 and 500 mM arsenate. Additionally, only the highest dose has produced a reduction in net photosynthesis (A) and stomatal conductance (g_s) by the 13th day. On the 14th day it was possible to observe the reduction of these parameters in plants treated with 200 mM arsenate. Longer periods in the presence of hight doses allowed us to observe that, besides the reduction in stomatal opening, arsenic could also produce biochemical limitation to photosynthesis, which was associated to reduction in electron transport rate (ETR) and in the quantic efficiency of photosystem II [Y(II)], concomitantly with increase in the level of energy loss as heat

[Y(NPQ)]. The second higher dose (200 μM) has not altered the A and other fluorescence parameters, by the 13th day and only negligible effects in leaf area and dry mass in parallel to no effect in roots was observed. Altogether these data support that the genotype of *Brassica juncea* under study is tolerant to arsenic. Despite of accumulation of high levels of arsenic in roots, no oxidative damage was observed, and no effects in root growth was noted. The fact that high levels of arsenic has occurred in roots, with minor effects in growth indicate the great potential of this plant to be used in phytoremediation as a phytostabilizer.

1. INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um metalóide tóxico que possui propriedades carcinogênicas e está presente na atmosfera, nos ambientes aquáticos e terrestres. Ele pode ser liberado no meio ambiente por meio de atividades geológicas e antropogênicas (Cullen e Reimer, 1989). A presença de As no solo e na água, mesmo sob baixas concentrações, apresenta-se como uma fonte de contaminação da cadeia alimentar e com isto um problema potencial para a saúde humana. Em décadas recentes, no sul e sudeste da Ásia, milhões de pessoas têm sofrido de envenenamento pelo consumo de água contaminada por As (Nordstrom, 2002). Um caso dramático no Brasil está relacionado à crescente atividade de mineração no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais. Esta é uma das maiores províncias minerais do Brasil e estima-se que nos últimos três séculos pelo menos 390 toneladas de As devem ter sido liberadas para o ambiente (Borba *et al.*, 2000). O arsenito (As^{III}) e o arsenato (As^{V}), que são as formas mais tóxicas de As, são prontamente absorvidos pelas plantas (Tripathi *et al.*, 2007). A compreensão de como as plantas absorvem e metabolizam As é importante para o desenvolvimento de estratégias para reduzir o problema da contaminação.

O As^{V} é a principal espécie presente em solos aeróbicos e nestas condições possui alta afinidade por óxidos e hidróxidos. Por ser análogo ao fosfato, compete pelos mesmos carreadores nas membranas celulares das raízes em plantas superiores (Meharg e Macnair, 1992; Ullrich-Eberius *et al.*, 1989; Asher e Reay, 1979). O mecanismo de captação envolve um co-transporte de fosfato ou arsenato e de prótons, com uma estequiometria de pelo menos 2H^+ para cada H_2PO_4^- ou H_2AsO_4^- (Ullrich-Eberius *et al.*, 1989). O As^{III} é a espécie predominante em ambientes redutores, como em solos alagados (Xu *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 1993). Os mecanismos de captação de As^{III} não são bem entendidos, mas os conhecimentos adquiridos por meio de pesquisas envolvendo microrganismos tem ajudado a elucidar a sua captação em plantas. O transporte de As^{III} parece envolver proteínas do tipo aquaporinas que formam grandes poros nas membranas permitindo a passagem de moléculas neutras e arsenito (Bhattacharjee & Rosen, 2007). Em estudos recentes, Ma e colaboradores (2006)

identificaram o transportador de silício Lsi1 (pertencente à família das aquaporinas) como a principal via de entrada de arsenito em raízes de arroz.

Após a absorção do arsenato, este é eficientemente reduzido a arsenito nas células vegetais e transportado imediatamente para o vacúolo uma vez que o pH desta organela favorece a estabilidade dos complexos contendo arsênio (Zhao *et al.*, 2009; Bleeker *et al.*, 2006). Esta redução e transporte para o vacúolo é um importante mecanismo para reduzir a toxidez do arsênio, visto que o arsenito não compete por fosfato nas reações bioquímicas em que este importante elemento é substrato. Análises de especiação demonstraram que o As se encontra predominantemente na forma As^{III}. Em raízes e parte aérea de *Brassica juncea*, foi encontrado de 96 – 100% de As^{III} (Pickering *et al.*, 2000).

Ao entrar nas células, o As precisa ser destoxificado através de complexação ou do seqüestro em vacúolo. Um mecanismo de destoxificação constitutivo sugerido recentemente é o efluxo de arsenito para o meio externo (Logoteca *et al.*, 2009), mas ainda faltam evidências para sustentar sua relevância.

Em plantas que não toleram nem acumulam doses altas de As (plantas hiperacumuladoras), existem fortes evidências sobre a importância dos tióis em processos de destoxificação através da complexação com o As. O arsenito possui uma alta afinidade por grupos sulfidrilas como glutationa (GSH) seus derivados, como as fitoquelatinas. Ha e colaboradores (1999) demonstraram que um mutante de *Arabidopsis thaliana* deficiente em fitoquelatina é de 10 a 20 vezes mais sensível ao arsenato que plantas selvagens. Em plantas hiperacumuladoras (aquelas que acumulam altas doses de As na parte aérea), por outro lado, não existem evidências para mecanismos de destoxificação baseados na complexação com fitoquelatinas (Zhang *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2003).

Outro processo de destoxificação é o seqüestro do As nos vacúolos. Em plantas, complexos de arsenito com fitoquelatina são comumente transportados para dentro de vacúolos por proteínas do tipo ABC, presentes em leveduras (Ghosh *et al.*, 1998), de identidade ainda desconhecida. Tonoplastos isolados de *Holcus lanatus* são capazes de transportar conjugados de arsenito com glutationa em um padrão consistente com transportes mediados por proteínas ABC (Bleeker *et al.*, 2006). A rápida redução do

arsenato a arsenito seguida de sua conjugação com tióis leva ao seu seqüestro em vacúolos em raízes e pode ser um fator que explica o limitado transporte de As da raiz para a parte aérea (Zhao *et al.*, 2009). O influxo de As como mecanismo de destoxificação tem sido demonstrado em microorganismos. Em fungos e leveduras, o influxo é mediado por uma proteína carreadora conhecida como Acr3 cujo mecanismo é possivelmente similar ao de AsrB de *Escherichia coli* que realiza um transporte secundário dependente da força protomotiva (Wysocki *et al.*, 1997; Dey *et al.*, 1994). Indriolo e colaboradores (2010) identificaram e isolaram em *Pteris vittata* dois genes, ACR3 e ACR3;1, que codificam para proteínas semelhantes a proteína Acr3 de leveduras. O transportador foi capaz de reverter o fenótipo quando expresso em leveduras deficientes para Acr3 sensíveis ao As. Além disso, ACR3, mas não ACR3;1, foi positivamente regulado por As em raízes de esporófito e gametófito. Estes pesquisadores demonstraram que o transportador está localizado no tonoplasto, sugerindo que ele está envolvido com o seqüestro de As no vacúolo. A ausência do transportador em angiospermas e sua duplicação em *Pteris vittata* podem explicar a tolerância e o acúmulo dos altos níveis de As nesta espécie e na família *Pteridaceae*.

Existem poucos trabalhos reportando os efeitos do arsênio sobre a fotossíntese. Rahman e colaboradores (2007) demonstraram que ocorre um efeito gradual de degradação de clorofila em plantas de arroz submetidos a doses crescentes (10 a 90 mg kg⁻¹) de arsenato no solo. Plantas de feijão submetidas a 5 mg L⁻¹ de arsenato, apresentaram redução na fotossíntese, condutância estomática, transpiração, teores de clorofilas e carotenóides, eficiência do uso da água e teor relativo de água (Stoeva *et al.*, 2005). Plantas de aveia crescendo sob 160 mg de As por quilo de solo apresentaram redução na fotossíntese sem a ocorrência de queda na condutância, além de queda transpiração, rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m) e redução no conteúdo de pigmentos fotossintéticos (Stoeva e Bineva, 2003). Sob baixas concentrações (até 0,800 mg L⁻¹), plantas de cebola apresentaram uma correlação positiva entre a quantidade de clorofila, crescimento e um aumento na concentração de arsênio (Sushant e Gosh, 2010).

As plantas tolerantes são aquelas capazes de excluir os poluentes, impedindo sua captação e translocação para a parte aérea. Entretanto, há uma classe de plantas

chamadas de hiperacumuladoras que combinam uma alta tolerância com o acúmulo foliar dos poluentes sem sintomas visíveis de toxidez. Elas possuem um grande potencial para a utilização em fitorremediação, utilização de plantas para a recuperação de ambientes contaminados (Verbruggen *et al.*, 2009). A primeira descoberta da hiperacumulação de As foi feita por Ma e colaboradores (2001) em *Pteris vittata*. Desde então, verificou-se que as plantas hiperacumuladoras de As são samambaias pertencentes à família *Pteridaceae* e a maioria é encontrada no gênero *Pteris* (Zhao *et al.*, 2009). Esta característica de hiperacumulação é um resultado da combinação de diversos fatores fisiológicos, embora as bases moleculares de tais características sejam pouco conhecidas. Comparada a espécie não-hiperacumuladora *Pteris ensiformis*, *Pteris vittata* possui uma capacidade antioxidante mais alta e apresenta um menor conteúdo de espécies reativas de oxigênio (Srivastava *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006). Plantas hiperacumuladoras também apresentam um efluxo menor de arsenito da raiz para o meio externo (Su *et al.*, 2008). Além disso, há pouca complexação de fitoquelatinas com arsenito na raiz (Zhao *et al.*, 2003). Estes fatores explicam o eficiente transporte no xilema e o acúmulo de arsênio na parte aérea em hiperacumuladoras. É possível ainda que plantas hiperacumuladoras sejam eficientes no carregamento do xilema, apresentando alguns transportadores sendo expressos nas células corticais, mas a identidade destes ainda não é conhecida. Em *Pteris*, a maioria do arsênio encontrada na folhagem (60 – 90%) está na forma de arsenito inorgânico (Francesconi *et al.*, 2002; Lombi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003; Pickering *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008) possivelmente sendo estocada no vacúolo (Lombi *et al.*, 2002; Pickering *et al.*, 2006). A redução de As^V a As^{III} parece ocorrer predominantemente nas raízes de *Pteris vittata*. Alguns mecanismos moleculares da hiperacumulação de diversos metais e metalóides são conhecidos, porém os mecanismos presentes em plantas que hiperacumulam As não são conhecidos.

A partir da década de 90, a fitorremediação passou a representar uma nova tecnologia utilizada para a recuperação de áreas contaminadas. Ela se baseia na utilização de plantas e sistemas de plantas e microrganismos para extrair metais e outros poluentes do solo e água (Ruiz & Romero, 2002). Apesar de possuir diversas vantagens como a facilidade de utilização e os baixos custos de instalação e manutenção, a técnica

possui desvantagens. A mais debatida é o fato de que a retirada dos poluentes do solo é lenta e pode aumentar sua biodisponibilidade caso não haja um eficiente mecanismo de metabolização e destoxificação (Aken, 2008). Os mecanismos responsáveis pela tolerância de plantas a diversos metais têm sido investigados para determinar as características essenciais para a fitorremediação.

A utilização de plantas no monitoramento (biomonitoramento) de áreas contaminadas pode fornecer não apenas informações sobre os níveis de contaminação, mas ainda sobre a biodisponibilidade dos poluentes. As vantagens da utilização de plantas no biomonitoramento são: o fato de serem imóveis e possuírem a capacidade de explorar grande volume de solo, mobilizar e acumular metais; a absorção de metais pela planta representa uma resposta integrada a poluição e clima, fornecendo informações sobre os efeitos de misturas poluidoras complexas, ocorrendo simultânea ou alternativamente, em um padrão aleatório (Elleberg *et al.*, 1991; Grant 1999). Plantas biossensoras são plantas que revelariam efeitos não visíveis, ao contrário de plantas bioindicadoras, e não necessariamente estariam envolvendo a presença de mecanismos de hiperacumulação de metais (Falla *et al.*, 2000). Várias análises fisiológicas e bioquímicas podem ser utilizadas como biomarcadores, como por exemplo, taxas fotossintéticas, fluorescência da clorofila a, atividade enzimática de enzimas antioxidantes.

Outra estratégia para a remediação de áreas de mineração é a chamada fitoestabilização. Esta técnica baseia-se na utilização de plantas para a estabilização *in situ* de rejeitos e contaminantes metálicos (Mendez e Maier, 2008). A fitoestabilização cria uma cobertura vegetativa de locais contaminados para a estabilização e contenção de contaminantes em longo prazo. Desta forma, o dossel da vegetação impediria a dispersão de contaminantes pelo vento e a porção radicular atuaria impedindo a dispersão pela água por meio da adsorção ou da precipitação provendo uma rizosfera onde os contaminantes podem ser estabilizados. Ao contrário da fitoextração e hiperacumulação de metais em tecidos vegetais (Ernst, 2005), a fitoestabilização é focalizada no seqüestro dos metais na rizosfera. O metal pode ser acumulado nas raízes, mas não é acumulado nos demais tecidos vegetais. Desta forma, os metais se tornam menos disponíveis para os seres vivos (Cunningham *et al.*, 1995; Munshower, 1994;

Wong, 2003). Existem trabalhos que demonstram algumas plantas capazes de sobreviver na presença de rejeitos de mineração contendo arsênio. Estes trabalhos, porém, restringem-se a regiões semi-áridas como México (Flores-Tavizón *et al.*, 2003), Equador (Bech *et al.* 2002), oeste do Estados Unidos (Mendez *et al.*, 2007; Rosario *et al.* 2007).

Visando o monitoramento da contaminação ambiental por arsênio, nosso grupo de pesquisa deseja desenvolver uma planta biossensora utilizando o promotor do gene *Acr3* regulando a expressão da proteína GFP. Esta poderá representar uma ferramenta eficiente para avaliações rápidas e práticas da contaminação por arsênio em regiões afetadas em Minas Gerais. A espécie escolhida foi a mostarda indiana (*Brassica juncea*). A sua escolha baseia-se nos fatos de que ela é uma espécie de planta tolerante a vários metais pesados (Hamlin *et al.*, 2003; Pickering *et al.*, 2000; Salt *et al.*, 1995, 1997), acumula grande biomassa, apresenta crescimento rápido, ciclo curto (bianual), e é de fácil transformação (Terry *et al.*, 1992).

Pesquisas recentes demonstram uma variedade de *Brassica juncea* tolerante ao arsênio. Esta variedade apresentou uma capacidade elevada em acumular arsênio em seus tecidos, além de apresentar respostas antioxidantes relacionadas à atividade enzimática e metabolismo de tióis (Srivastava *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2009). Plantas de *Brassica juncea* expostas a 25 µM de arsênio por 96 horas foram capazes de desenvolver respostas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, refletindo um sistema de defesa aos danos celulares causados pelo arsênio (Khan *et al.*, 2009). Outros trabalhos utilizaram linhagens transgênicas visando o aumento da tolerância de *Brassica juncea* ao arsênio e cádmio (Gasic e Korban, 2007; Navaza *et al.*, 2006). Baseado nestes dados citados acima, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar se o genótipo de *Brassica juncea* em estudo é tolerante ao arsênio e quais seriam os mecanismos fisiológicos responsáveis por esta tolerância.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo e Aplicação do tratamento

Sementes de *Brassica juncea* cedidas pelo laboratório do Dr. David Salt, Purdue University, foram colocadas em água e vernalizadas a 4°C durante 48 horas. Após este período as sementes foram semeadas em uma sementeira contendo substrato comercial (Plantimax, Eucatex) e expostas a um fotoperíodo de 10 horas, simulando noites longas e dias curtos. Após 18 dias as plantas, já contendo 2 ou 3 pares de folhas, foram transplantadas para um meio hidropônico em vasos de 5 L sob aeração. Nesta etapa as plantas foram aclimatadas durante 2 semanas em solução nutritiva de Hoogland, pH 5,6, meia força. Após este período o meio hidropônico passou a conter solução nutritiva de Hoogland pH 5,6, concentração normal. Após 17 dias em meio hidropônico, as plantas foram submetidas ao tratamento com o arsênio durante 16 dias. O arsênio foi fornecido a solução nutritiva na forma de arsenato de sódio nas concentrações de 10, 50, 200 e 500 µM. Cada tratamento e o controle eram compostos por 5 repetições, sendo que cada repetição era representada por um vaso contendo 3 plantas cada, com delineamento experimental inteiramente casualizado.

2.2. Variáveis Analisadas

2.2.1. Determinação dos teores de arsênio, fósforo e enxofre

Para a quantificação dos teores de arsênio, fósforo e enxofre em folhas, caules e raízes, aproximadamente 0,5 g do material vegetal seco e moído foi digerido a 200°C em 10 mL de solução de ácido nítrico-perclórico (4:1), seguindo metodologia proposta por Tedesco *et al.* (1995). Os teores de As, P e S foram determinados por espectrometria de emissão de plasma (Espectrômetro Optima 3300 DV, Perkin Elmer). A partir dos teores de arsênio foi possível calcular o fator de translocação (FT), que é definido como a razão entre a concentração do arsênio na biomassa da parte aérea e a concentração no sistema radicular. (Huang *et al.*, 2006; Fayiga e Ma, 2005).

2.2.2. Sintomatologia e análise do crescimento

Ao final do experimento foram avaliados visualmente os sintomas de toxidez em raízes e parte aérea. Além disso, foi realizada a análise do crescimento por meio das medições de comprimento e massas seca e fresca, de raiz, caule e folhas, além de área foliar.

2.2.3. Determinação do teor relativo de água

O teor relativo de água (TRA) foi determinado através do método da submersão de discos foliares. Imediatamente os discos foram pesados, evitando perdas de umidade, gerando os valores de massa fresca (MF). Em seguida, estas amostras foram colocadas em placas de Petri contendo água destilada durante 4 horas. Após esse período, retirando-se o excesso de água com papel toalha, obteve-se a massa túrgida (MT) das amostras, as quais foram levadas a estufa de ventilação até peso constante, para obtenção da massa seca (MS) das amostras. Utilizou-se balança de precisão analítica para determinação das massas fresca, túrgida e seca. As pesagens foram feitas no 8º dia de tratamento as 14h. Os cálculos foram feitos através da seguinte equação: $TRA(\%) = (MF - MS/MT - MS) \times 100$.

2.2.4. Determinação das trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas sempre no segundo par de folhas completamente expandidas. As variáveis, taxa de assimilação fotossintética líquida (A), condutância estomática (g_s), taxa de transpiração (E) e a razão entre concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a) foram determinadas por um analisador de gás por infravermelho (IRGA; modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincoln, Nebraska, USA). As medições foram realizadas entre 8:00 e 11:30 a.m., utilizando radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($800 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) ($\sim 370 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ($24 - 36 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade ambiente ($39 - 71 \%$).

2.2.5. Fluorescência da clorofila *a*

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram obtidas com auxílio do IRGA (LI-6400xt, LI-COR) na mesma área da folha em que foram realizadas as medições das trocas gasosas. Para as avaliações as folhas foram adaptadas ao escuro para que os centros de reação estivessem completamente abertos (todos os aceptores primários oxidados) com perda de calor mínima. As variáveis de indução da fluorescência obtidas foram: fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m). A partir desses valores foi obtido o rendimento quântico potencial do fotossistema II (FSII), $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ (Genty *et al.*, 1989). As variáveis da fase lenta de indução da fluorescência foram obtidas seqüencialmente com a aplicação de uma iluminação actínica e um pulso de luz actínica saturante para a determinação das variáveis: fluorescência em amostra adaptada à luz antes do pulso de saturação (F) e fluorescência máxima em amostra adaptada à luz (F_m'). A partir desses parâmetros foi possível calcular a fluorescência mínima do tecido vegetal iluminado, $F_0' = F_0 / [(F_m - F_0)/F_m + (F_0/F_m)']$ (Oxborough e Baker, 1997), para o cálculo do coeficiente de extinção fotoquímico pelo modelo *lake*, o qual fornece uma estimativa de centros de reações abertos do FSII, $q_L = (F_m' - F)/(F_m' - F_0') \cdot (F_0'/F)$ (Kramer *et al.*, 2004). O rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no PSII, $Y_{II} = (F_m' - F)/F_m'$; e os rendimentos quântico da dissipação de energia regulada, $Y_{NPQ} = (F/F_m') - (F/F_m)$ e da dissipação de energia não regulada, $Y_{NO} = F/F_m$, foram calculados de acordo com Genty *et al.* (1989) e Hendrickson *et al.* (2004). O Y_{II} foi utilizado ainda para estimar a taxa aparente de transporte de elétrons, $ETR = Y_{II} \cdot PAR \cdot 0,84 \cdot 0,5$ (Bilger *et al.*, 1995), onde PAR é o fluxo de fótons ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) incidente sobre a folha; 0,5 o valor correspondente à fração de energia de excitação distribuída para o FSII (Laisk e Loreto, 1996); e, 0,84 o valor correspondente à fração de luz incidente que é absorvida pelas folhas (Ehleringer, 1981).

2.2.6. Determinação do malonaldeído

A extração de malonaldeído (MDA) foi realizada segundo protocolo descrito por (Heath e Paker, 1968). Aproximadamente 0,150 g de folhas foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados com 2 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) 0,1%. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 15 minutos

a 10.000 rpm e 4°C. A partir do sobrenadante, 0,5 mL de extrato foram pipetados em dois tubos de ensaio, um tubo para a reação e outro representando branco. Aos tubos de reação foram adicionados 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,5% (TBA) em TCA 20%. Aos tubos do branco foram adicionados 1,5 mL de TCA 20%. Os tubos permaneceram em banho-maria a 95°C durante meia hora e as reações foram paralisadas imediatamente no gelo. Após o resfriamento conteúdo foi centrifugado durante 5 minutos a 10.000 rpm. A concentração de MDA acumulado foi determinada através da leitura das absorvâncias das reações a 440 nm, 532 nm e 600 nm. (Hodges *et al.*, 1999). Para o cálculo da concentração de MDA, inicialmente, a diferença entre os valores de 532 e 600 nm foram descontados dos mesmos valores obtidos pela reação sem adição de TBA, como segue:

$$A = [(Abs_{532}+TBA) - (Abs_{600}+TBA)] - [(Abs_{532}+TBA) - (Abs_{600}+TBA)]$$

Posteriormente, foi descontado o interferente de leitura em 440 nm:

$$B = [(Abs_{440}+TBA) - (Abs_{600}+TBA)] \times 0,0571$$

A partir das estimativas de A e B, o MDA foi quantificado pela equação:

$$MDA \text{ (nmol mL}^{-1}\text{)} = [A - B/157000] \times 106$$

Os valores de MDA foram expressos por quantidade de proteínas. A determinação de proteínas nos extratos foi realizada através do método do ácido Bicinconínico (Smith *et al.*, 1985).

2.2.7. Determinações de peróxido de hidrogênio

O teor de peróxido de hidrogênio foi determinado através da reação com alaranjado de xilenol (Gay *et al.*, 1999). Aproximadamente 0,1g de tecido vegetal foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 15 minutos a 10.000g e 4°C. O sobrenadante foi utilizado para a reação com o alaranjado de xilenol. Todos os procedimentos seguintes foram realizados no escuro. A meio de reação era composto por 100 µL H₂O, 500 µL sorbitol, 100 µL sobrenadante, 800 µL reagente Fe⁺² (na forma de FeNH₄(SO₄)) e 500 µL de alaranjado de xilenol. O sobrenadante foi substituído por H₂O no tubo correspondente ao branco. Os conteúdos dos tubos foram homogeneizados em vortex e tubos permaneceram por 30 minutos no escuro. O conteúdo dos tubos de reações foi utilizado para a determinação da absorvância a 560nm

em espectrofotômetro. A partir dos valores obtidos, foi possível calcular as concentrações de peróxido de hidrogênio por meio de uma curva padrão de referencia na faixa de 0 a 1 μ M de peróxido de hidrogênio. Os teores foram expressos por quantidade de proteínas. A determinação de proteínas nos extratos foi realizada através do método do ácido Bicinconínico (Smith et al.,1985).

2.2.8. Determinação de compostos fenólicos

Os extratos obtidos em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% para a quantificação de MDA foram utilizados para a quantificação de fenóis solúveis totais. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico do folin-ciocalteau (Sánchez-Viveros *et al.*, 2010), utilizando-se o acido tânico como padrão de referencia na faixa de 0 a 50 mg/ml. Para a reação, utilizou-se 40 μ L do extrato, 40 μ L de solução aquosa de metanol 80%, 420 μ L de água, 1250 μ L de solução aquosa de carbonato de sódio 20% e 250 μ L de folin-ciocalteau 0,25N. As reações ocorreram durante 30 minutos sob agitação (1000 rpm). Após o término da reação, os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm, durante 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a leitura das absorvâncias a 725 nm em espectrofotômetro. Para o cálculo da concentração de compostos fenólicos solúveis totais, utilizaram-se diferentes concentrações de ácido tânico para a obtenção de uma curva padrão.

2.3. Análise Estatística

O delineamento experimental constituiu-se de blocos inteiramente casualizados, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa SAS 9.0. Foram realizadas análises de correlações de Pearson, no qual foram identificadas as correlações do mineral As com os elementos P e S pelo programa SAS v 9.0.

3. RESULTADOS

3.1. Teores de arsênio, fósforo e enxofre

A exposição a níveis crescentes de arsênio na solução nutritiva levou a um acúmulo crescente do metalóide nas raízes, caules e folhas (Fig. 1). Tal acúmulo foi mais pronunciado nas raízes das plantas tratadas. Em plantas submetidas a 500 μM de arsênio, o acúmulo nas raízes foi cerca de 26 vezes maior que em caules e 34 vezes maior que em folhas. Para este tratamento, o acúmulo total foi de 5456 mg kg^{-1} . A partir dos teores de arsênio foi possível calcular o fator de translocação (FT). As plantas de mostarda submetidas a dose mais alta de arsênio apresentaram um valor de FT igual a 0,068.

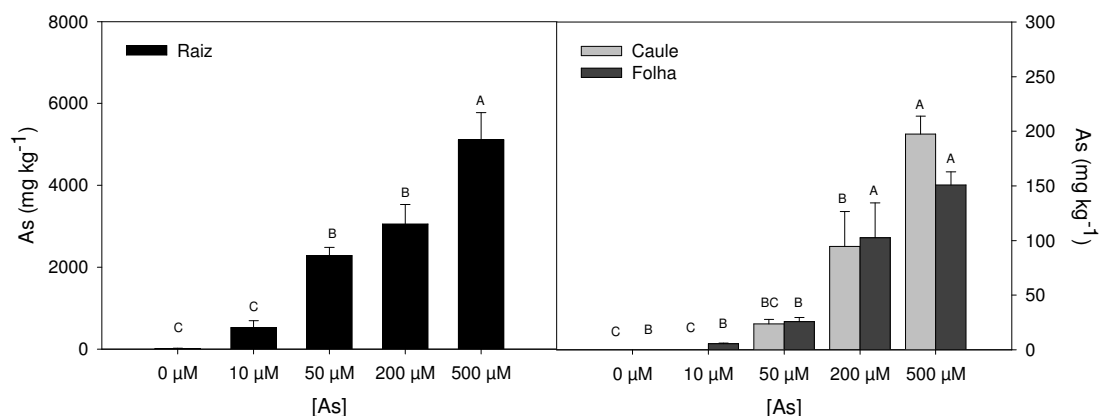


Fig. 1. Concentração de arsênio em raiz (■), caule (□) e folha (▒) de plantas de *Brassica juncea* expostas a diferentes concentrações de arsênio por 16 dias. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada órgão.

A exposição ao arsenato não afetou o teor de fósforo em raízes, havendo aumento apenas em plantas tratadas com 50 μM de arsenato. Em folhas e caules observou-se uma pequena redução nos teores de fósforo ocorreu somente a 200 μM de arsênio (Fig. 2). Em níveis de arsênio iguais ou superiores a 50 μM houve um aumento dos teores de enxofre em raízes, ao passo que não houve alterações para o caule, e contrariamente ao observado em raízes, houve redução no teor de enxofre em folhas para os mesmos tratamentos citados (Fig. 3).

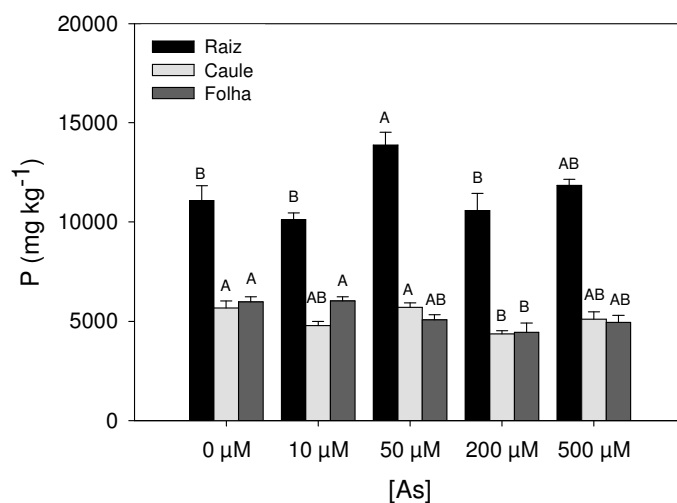


Fig. 2. Concentração de fósforo em raiz (■), caule (□) e folha (▒) de folhas de *Brassica juncea* expostas a diferentes concentrações de arsênio por 16 dias. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada órgão.

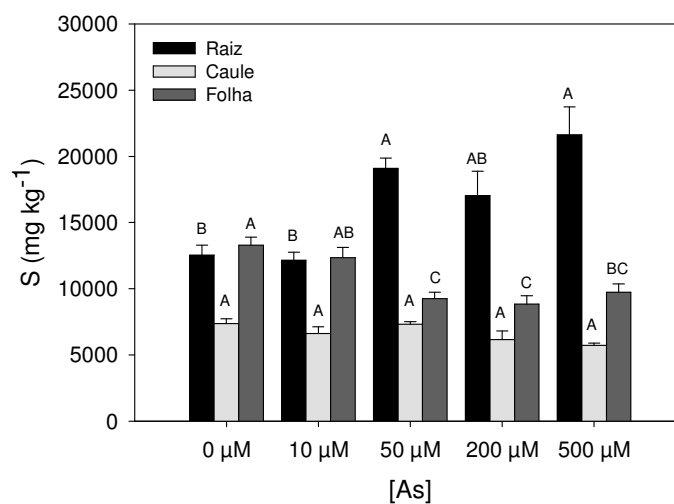


Fig. 3. Concentração de enxofre em raiz (■), caule (□) e folha (▒) de folhas de *Brassica juncea* expostas a diferentes concentrações de arsênio por 16 dias. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada órgão.

3.2. Sintomas visuais de toxidez do arsênio em *Brassica juncea*

Sintomas visuais de toxidez quando da exposição à altas dosagens de arsênio foram observados. As doses de 200 e 500 μM resultaram em clorose marginal nas folhas, e possível acúmulo de antocianinas nas folhas mais velhas, visualizado mais claramente na superfície abaxial das folhas (Fig. 4). Folhas apicais novas apresentaram uma leve clorose em toda lâmina foliar. Estas alterações na pigmentação são progressivas com a exposição a este metal pesado, resultando, com o aumento no tempo de exposição, na senescência das folhas (dados não mostrados).

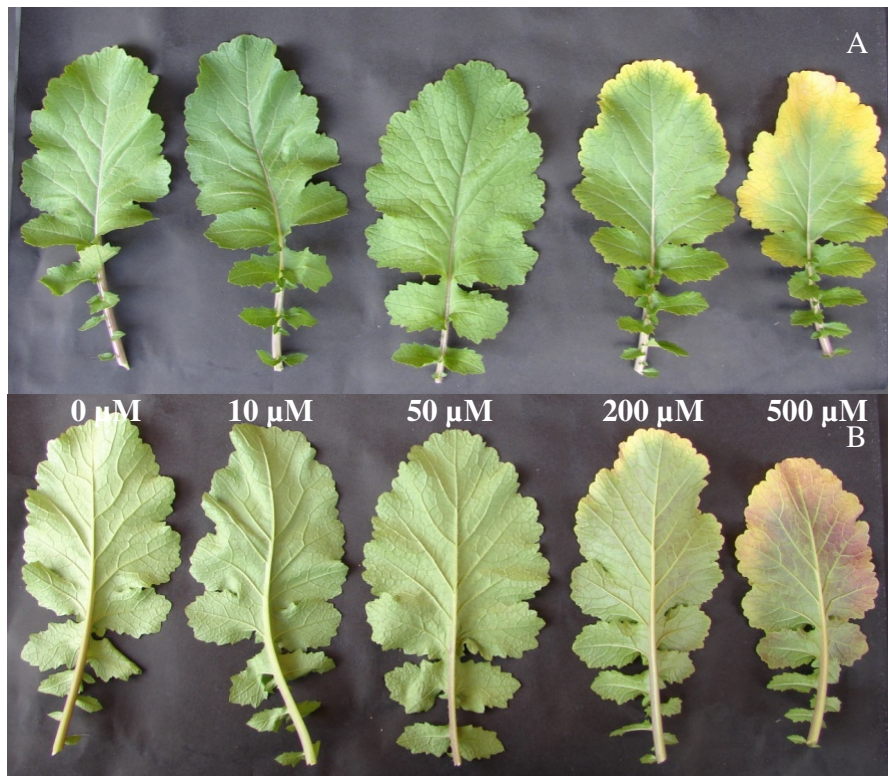


Fig. 4. Efeito da toxidade do arsênio nas faces adaxial (A) e abaxial (B) de folhas basais de *Brassica juncea* expostas à diferentes concentrações de arsênio por 16 dias.

Na mais alta dose de arsênio, podemos observar uma redução no sistema radicular (Fig. 5). De fato, como mostrado na figura 10, a análise quantitativa indica redução da massa fresca das raízes na presença das duas doses mais elevadas de arsênio.



Fig.5. Plantas de *Brassica juncea* cultivadas sob diferentes concentração de As por 16 dias. Barra = 10 cm

3.3. Murcha e análise do teor relativo de água em folhas de *Brassica juncea*

As plantas de *Brassica juncea* apresentaram murcha temporária no período da manhã a partir do 7º dia, quando cultivadas sob as doses de 200 e 500 μM (Fig.6). A murcha temporária, observada nas horas mais quentes do dia, não se reflete em um estado de desidratação contínua da planta, visto que o teor relativo de água nas plantas de *Brassica juncea* não foram significativamente alterado pela exposição à níveis tóxicos de arsênio (Fig. 7).



Fig. 6. Visualização de murcha em plantas de *Brassica juncea* cultivadas a 200 e 500 μM de arsênio. As fotos foram obtidas as 11h no 8º dia de tratamento.

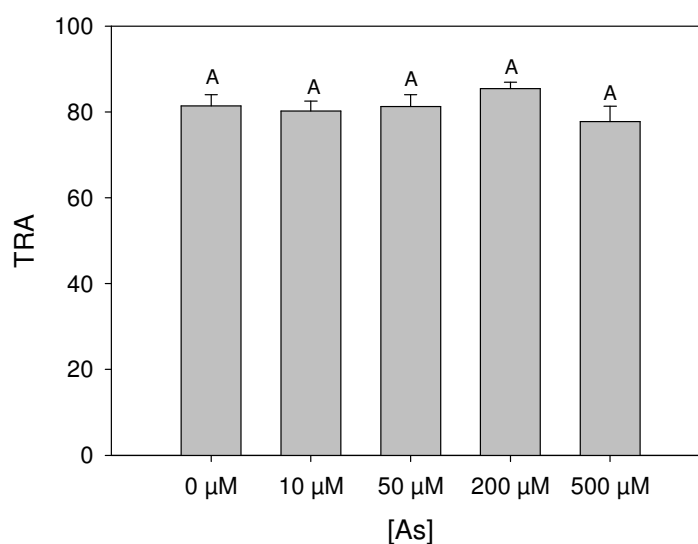


Fig. 7. Teor Relativo de Água (TRA) em folhas de plantas de *Brassica juncea* cultivadas na presença de arsênio. Barras (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$.

3.4. Análise de crescimento de *Brassica juncea*

Brassica juncea apresentou reduções significativas no comprimento do caule e folhas quando expostas por 16 dias sob concentrações tóxicas de arsênio. O caule apresentou redução em 14 e 16% sob exposição de 200 e 500 μM de arsenato, respectivamente (Fig. 8). Nas mesmas dosagens, a parte aérea teve seu comprimento reduzido em 9 e 14%, em relação ao controle (Fig. 8). Não houve alterações

significativas no comprimento das raízes em resposta ao arsênio. A área foliar, associada à diminuição no comprimento das folhas, foi reduzida significativamente em 28 % e 68 % nas duas maiores concentrações de arsenato (Fig. 9).

A redução no comprimento de folhas e caules em *Brassica juncea* foi acompanhada pela diminuição na massa fresca e seca sob cultivo nas duas maiores concentrações de arsenato (Fig. 10), onde uma ocorreu uma redução de 35 e 47 % na massa fresca e seca das folhas de *Brassica juncea*, respectivamente. O caule apresentou uma redução significativa em 48 e 33 % em relação aos controles, na massa fresca e seca sob exposição a 500 μM de arsenato. A raiz apresentou redução significativa apenas na massa fresca das plantas expostas à maior dose de arsenato, nas duas maiores doses, sendo esta redução de 50 %, na dose de 500 μM .

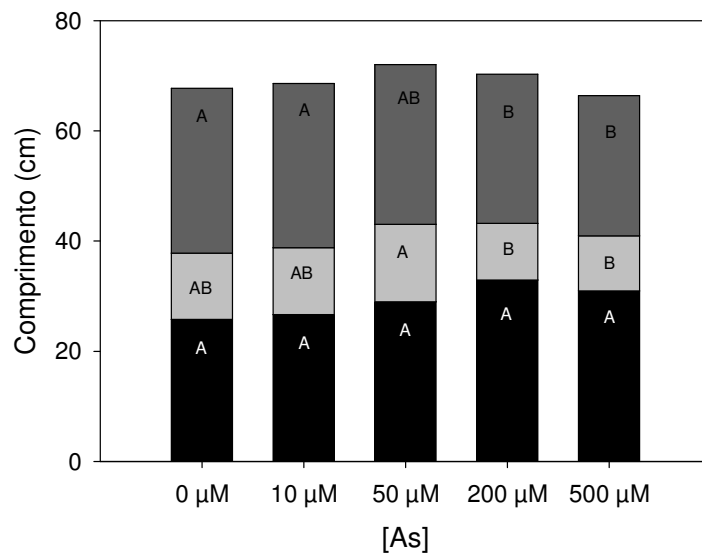


Fig. 8. Comprimento (cm) da raiz (■), caule (□) e folhas (▒) de plantas de *Brassica juncea* expostas a diferentes concentrações de arsênio por 16 dias. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada órgão.

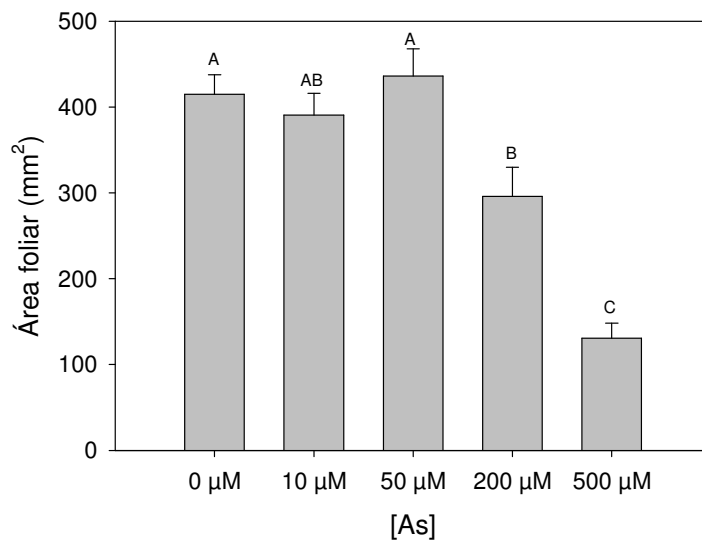


Fig. 9. Área foliar de *Brassica juncea* expostas a diferentes concentrações de arsênio por 16 dias. Barras (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$.

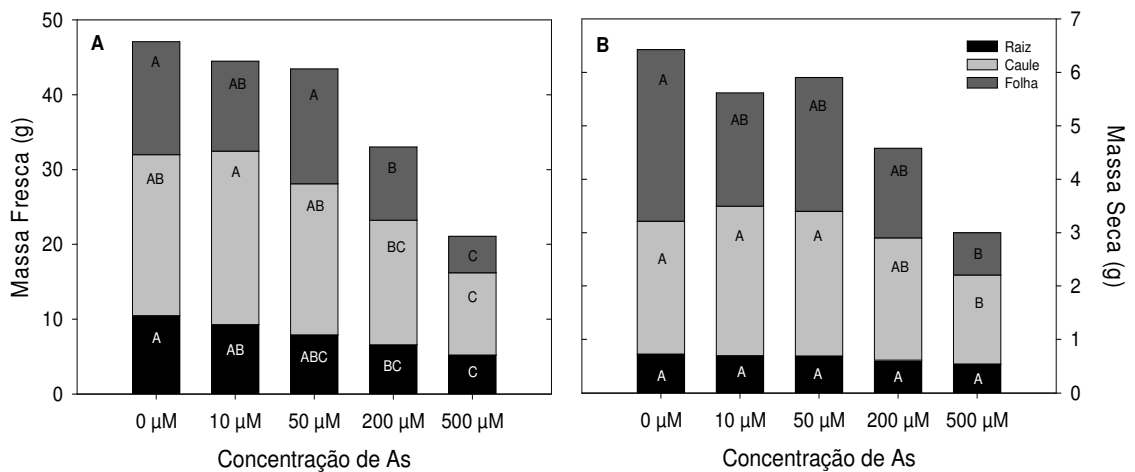
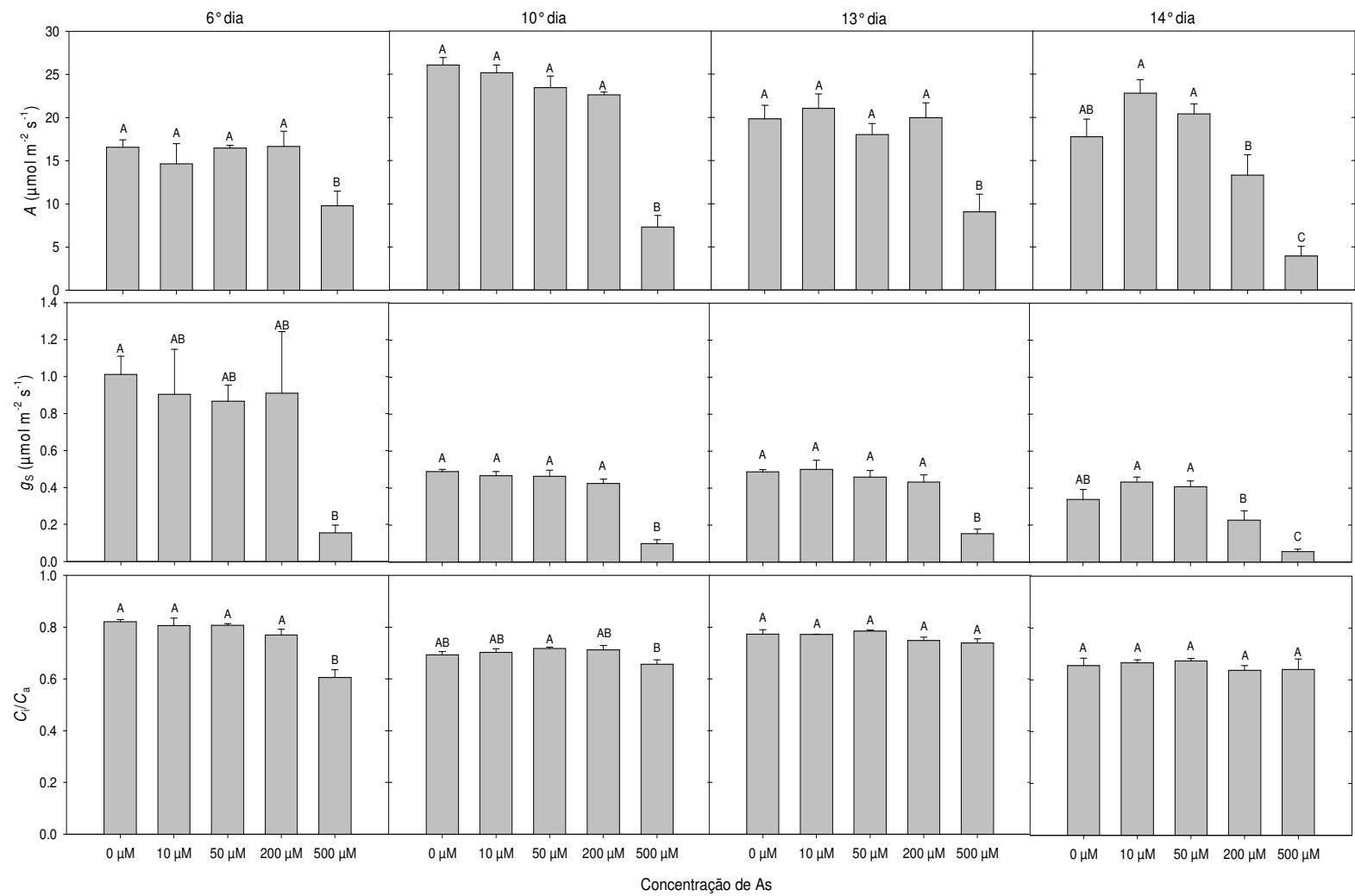


Fig. 10. Massa fresca (A) e Massa Seca (B) da raiz (■), caule (□) e folhas (▨) de plantas de *Brassica juncea* expostas a diferentes concentrações de arsênio por 16 dias. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada órgão.

3.5. Trocas gasosas em folhas de *Brassica juncea*

A taxa fotossintética (A) de *Brassica juncea* apresentou reduções somente na maior concentração de arsenato (500 μM). Neste tratamento, após seis dias de exposição foi possível observar uma redução em 40 % de A (Fig. 11). Esta redução chegou a 77 % após 14 dias de cultivo. A queda fotossintética foi acompanhada pela diminuição de 84 % na condutância estomática (g_s), após seis dias de exposição à 500 μM de arsenato. Esta redução se manteve mesmo após 14 dias de cultivo, além da redução na taxa transpiratória (E). A relação C_i/C_a , no entanto, apresentou redução, decorrente do fechamento estomático, apenas após seis dias de exposição ao arsenato, com redução de 26 %, em relação ao controle. A eficiência do uso da água (A/E) apresentou um incremento (81%) após seis dias de exposição a maior concentração de As devido a redução drástica na E .

A redução em g_s foi acompanhada pelo incremento na temperatura foliar, de forma mais evidente nas plantas de *Brassica juncea* cultivadas, ao longo de 13 dias, sob 200 e 500 μM de As (Fig. 12).



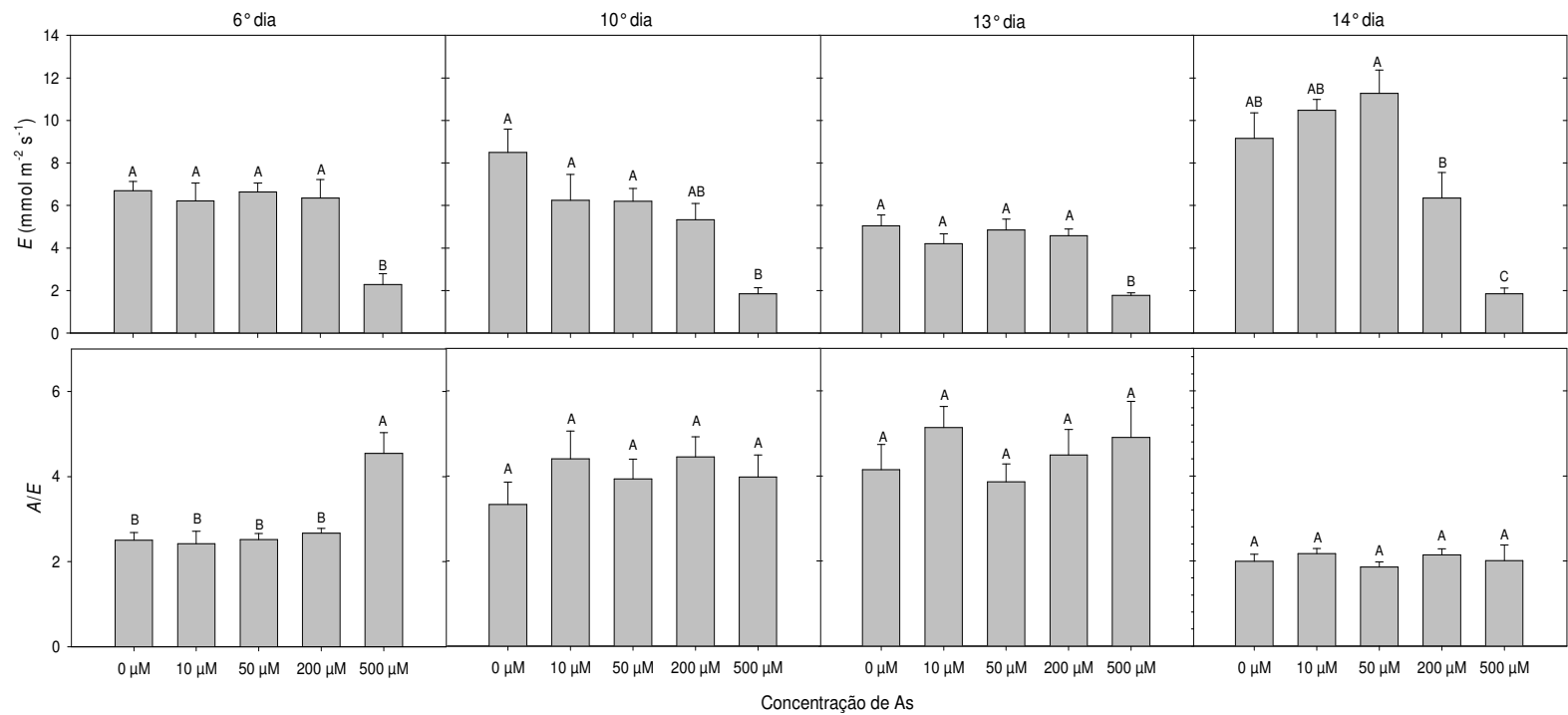


Fig. 11. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), relação C_i/C_a , Transpiração (E) e Eficiência do uso da água (A/E) em folhas de *Brassica juncea* cultivadas em diferentes concentrações de arsênio ao longo de 14 dias. Barras (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada dia de análise.

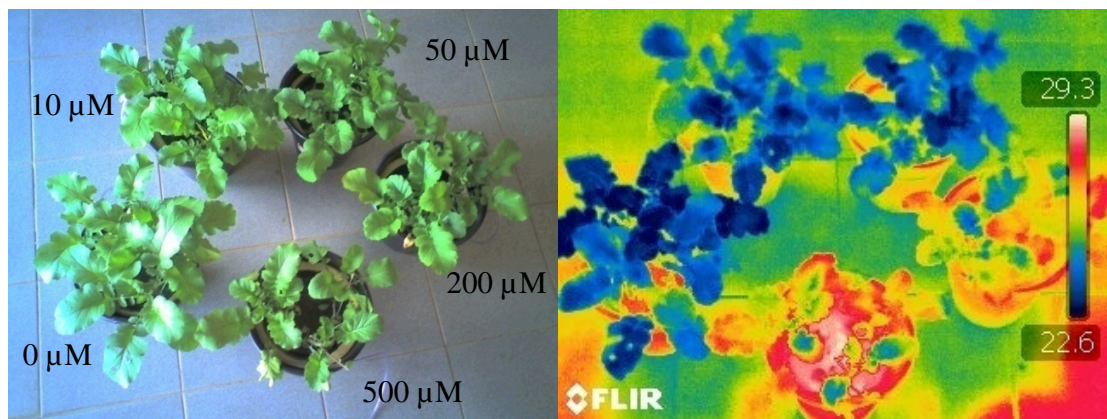


Fig. 12. Plantas de *Brassica juncea* (A) e temperatura foliar de folhas de *Brassica juncea* (B) sob diferentes concentrações de arsênio (após 10 dias de exposição aos tratamentos). Cores mais avermelhadas indicam maiores temperaturas.

3.6. Fluorescência da clorofila *a* em folhas de *Brassica juncea*

A partir da análise da fluorescência da clorofila *a*, foi possível observar um incremento significativo na fluorescência basal (F_0) em 41 % nas plantas de *Brassica juncea* após 13 dias de cultivo sob 500 μM de As (Fig. 13). A taxa de transporte de elétrons (ETR) foi reduzida nas plantas expostas à maior concentração de As em 18 %, em relação ao controle, sem, no entanto, apresentar alterações significativas na estimativa de centros de reações abertos do fotossistema II (q_L).

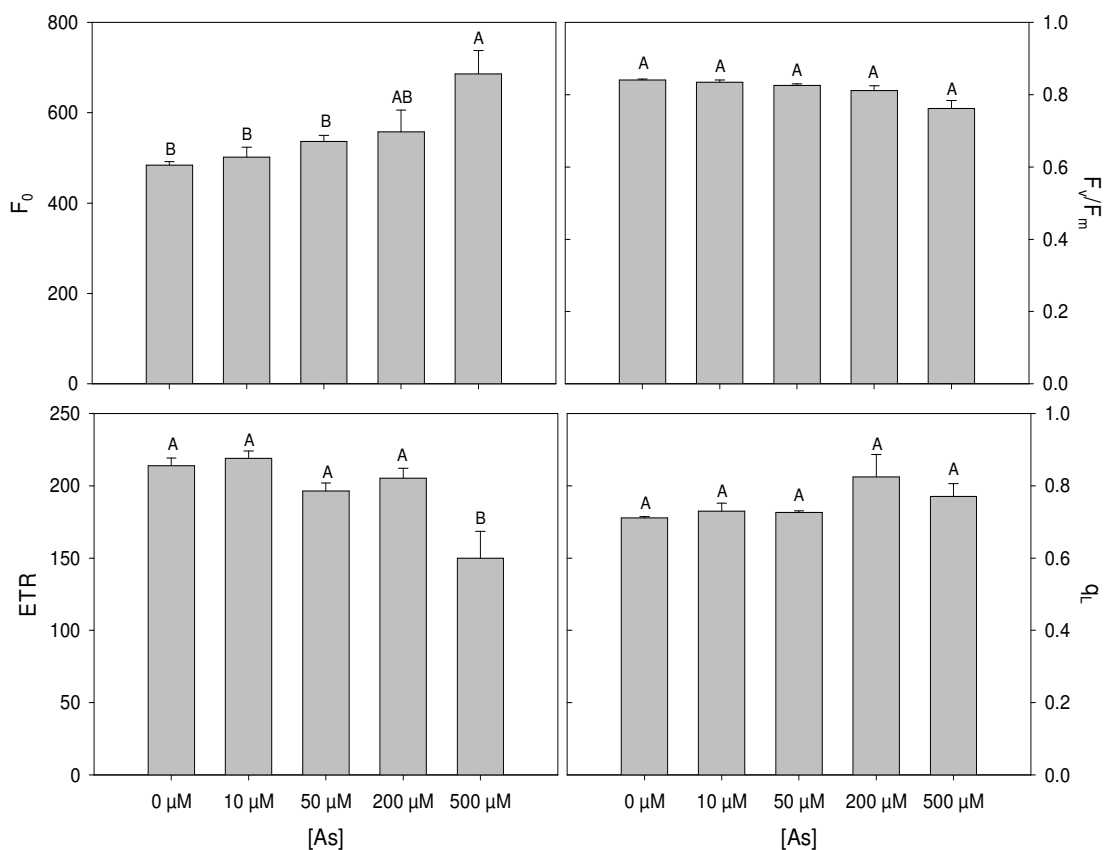


Fig. 13. Fluorescência basal (F_0), rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção fotoquímico (q_L) em folhas de *Brassica juncea* cultivadas em diferentes concentrações de arsênio por 13 dias. Barras (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$.

As plantas de *Brassica juncea* apresentaram diminuição significativa do Y(II), em 29 %, sob exposição a 500 μ M de As acompanhada pelo incremento em 96 % no Y(NPQ) (Fig. 14).

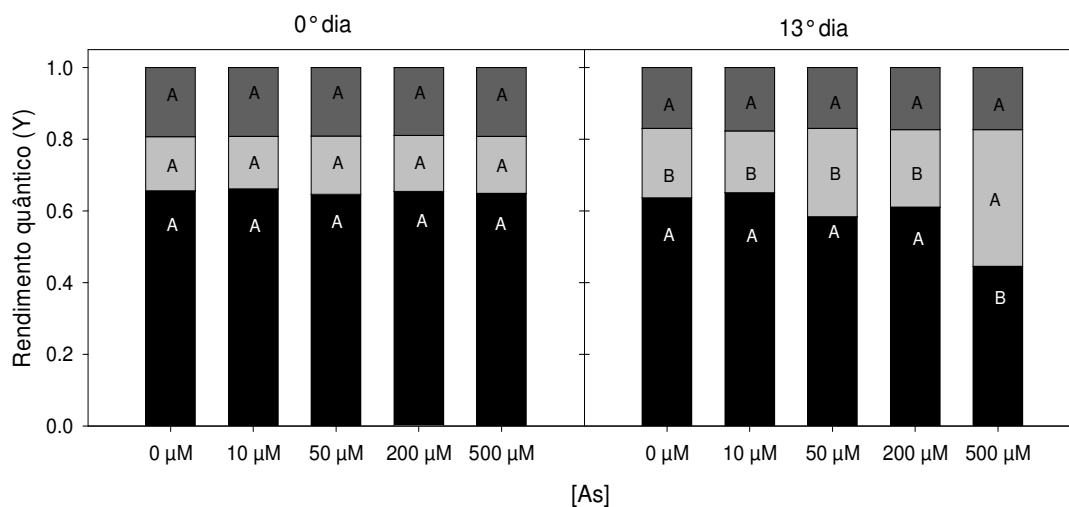


Fig. 14. Rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no fotossistema II, Y(II) (■) e os rendimentos quânticos da dissipação de energia regulada, Y(NPQ) (□) e da dissipação de energia não regulada, Y(NO) (▒) em folhas de *Brassica juncea* cultivadas em diferentes concentrações de arsênio antes da imposição dos tratamentos (0° dia) e após 13 dias de exposição ao As. Barras (± EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada dia de análise.

3.7. Estresse oxidativo

Os teores de malonaldeído e de peróxido de hidrogênio não foram alterados significativamente em folhas e raízes de *Brassica juncea* após 15 dias de exposição à diferentes concentrações de As (Fig. 15 e Fig.16, respectivamente).

3.8. Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos não foi alterado em folhas de *Brassica juncea*, após 15 dias de exposição à diferentes concentrações de As (Fig. 17A). Foi observado, no entanto, incremento significativo de fenólicos de 2,3 e 2,7 vezes, em relação ao controle, nas raízes de *Brassica juncea* expostas à 200 e 500 µM de As, respectivamente (Fig. 17B).

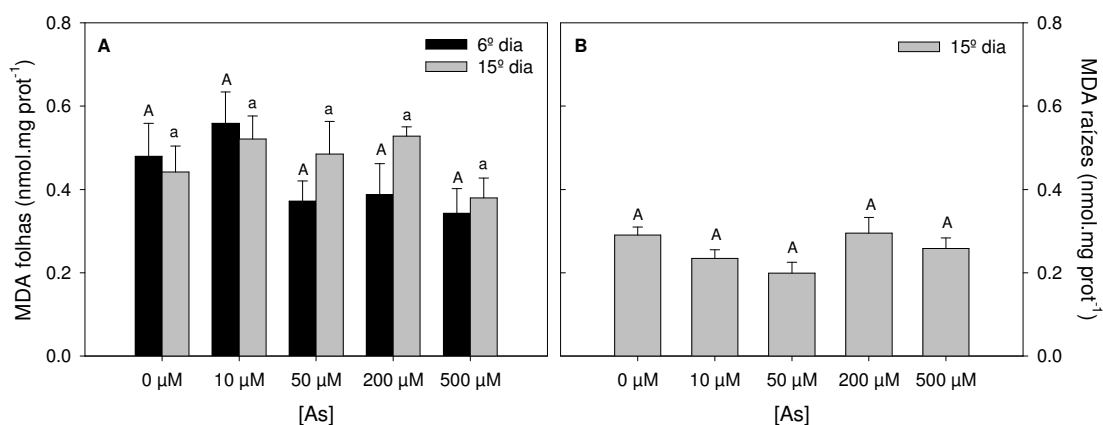


Fig. 15. Teor de Malonaldeído (MDA) em folhas (A) e raízes (B) de *Brassica juncea* cultivadas em diferentes concentrações de arsênio por 6 (■) e 15 (□) dias. Barras (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada dia de análise.

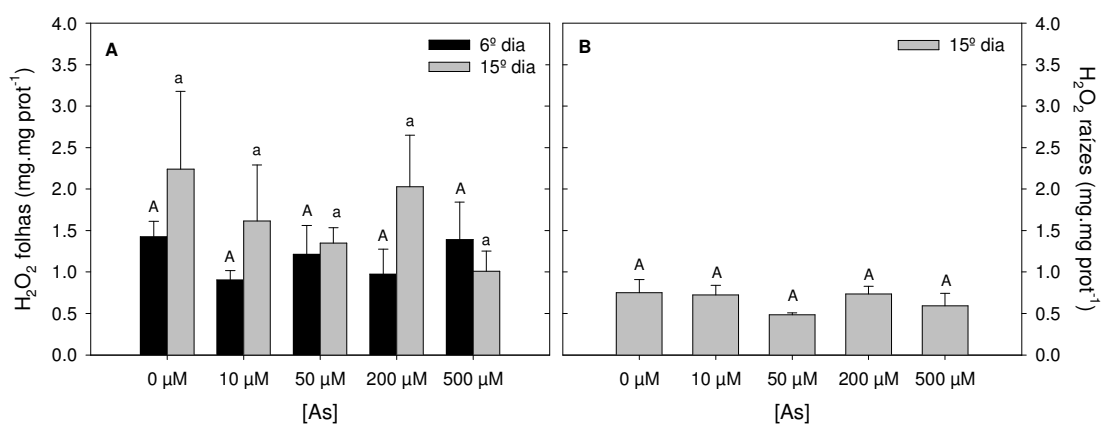


Fig. 16. Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas (A) e raízes (B) de *Brassica juncea* cultivadas em diferentes concentrações de arsênio por 6 (■) e 15 (□) dias. Barras (\pm EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada dia de análise.

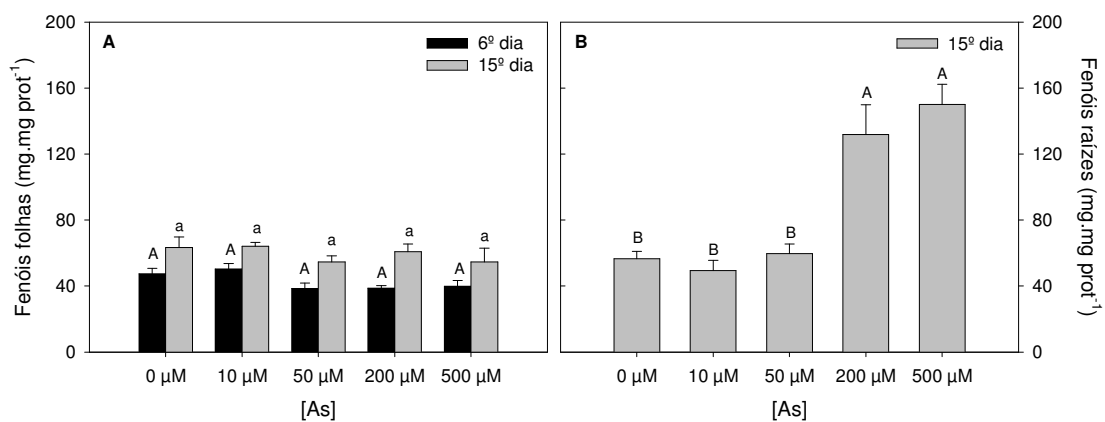


Fig. 17. Teor de compostos fenólicos em folhas (A) e raízes (B) de *Brassica juncea* cultivadas em diferentes concentrações de arsênio por 6 (■) e 15 (□) dias. Barras (± EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p > 0,05$, dentro de cada dia de análise.

4. DISCUSSÃO

Plantas de *Brassica juncea* submetidas a doses crescentes de arsênio apresentaram maior acúmulo deste metalóide, tanto em folhas como em raízes. A quantidade de acúmulo de arsênio nas plantas é um parâmetro que define uma espécie acumuladora. Em uma espécie acumuladora, a concentração total de arsênio deve ser superior a 1000 mg kg⁻¹ além de apresentar um fator de translocação (FT) superior a um (Huang *et al.*, 2006; Fayiga e Ma, 2005). As plantas de mostarda possuem um acúmulo superior a 1000 mg kg⁻¹ quando submetidas a 500 µM de arsenato, porém o FT é inferior a um. Em *Pteris vittata* foi encontrado um acúmulo de 22630 mg kg⁻¹ nas folhas, bem maior do que encontrado nas raízes, sendo o seu fator de translocação bem superior a unidade (Ma *et al.*, 2001). Portanto, este genótipo de *Brassica juncea* é acumulador, mas acumula o arsênio na parte aérea.

Uma deficiência de fósforo nas plantas submetidas ao arsênio seria esperada. O arsenato possui uma estrutura análoga ao fosfato e ambos competem pelo mesmo transportador em raízes (Asher e Reay, 1979; Ullrich-Eberius *et al.*, 1989; Meharg e Macnair, 1992). Oposto ao reportado para outras espécies de plantas não ocorreu alteração os níveis de fósforo nos três órgãos analisados. Um padrão semelhante foi observado em plantas de *Pteris vittata* submetidas a 133 e 167 µM de arsenato. Embora significativas, as alterações nas concentrações de fósforo não foram tão grandes, ao se comparar com a espécie não-acumuladora *Pteris ensiformis*. Nesta espécie houve queda nas concentrações de fósforo em frondes, e aumento em raízes, principalmente com o aumento da concentração de arsenato e do tempo de exposição (Singh e Ma, 2005). Esta ausência de inibição no acúmulo de fósforo pode significar a presença de um mecanismo de tolerância a este metalóide tóxico.

A absorção de arsênio levou ao aparecimento de sintomas visuais na parte aérea. Este poderia ser um sintoma relacionado a uma deficiência de enxofre causada pela presença de arsênio. A coloração arroxeadada evidencia um acúmulo de antocianina, sintoma descrito também para a deficiência de enxofre (Allen e Pilbeam, 2007). O aumento nos teores de enxofre em raízes pode estar relacionado ao incremento na síntese de compostos ricos em grupos tióis os quais aumentaram somente em raízes. Este aumento em raízes poderia também indicar uma queda no transporte de enxofre para a

parte aérea que por sua vez explicaria a redução nos seus níveis em folhas. Especula-se que o eficiente acúmulo de arsênio em raízes está relacionado à complexação de arsênio com grupos tióis, reduzindo sua translocação para a parte aérea e favorecendo o seqüestro em vacúolos nas raízes. O arsenato, ao entrar nas células é prontamente reduzido a arsenito, adquirindo alta afinidade por grupos tióis e tais compostos são muitas vezes responsáveis pelo seqüestro do arsenito em vacúolos. Este seqüestro poderia contribuir para o limitado transporte de arsênio para a parte aérea evidenciado pela baixa concentração em relação ao sistema radicular (Zhao *et al.*, 2009). De fato, uma variedade de *Brassica juncea* tolerante submetida a 500 μM de arsenato apresentou alterações na atividade de enzimas do metabolismo de tióis e nas concentrações de tióis não-protéicos (Srivastava *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2009).

Além da coloração arroxeadada, as plantas de mostarda submetidas as doses mais altas de arsênio apresentaram clorose marginal em folhas mais velhas além de murcha durante a manhã. Singh e Ma (2006) encontraram sintomas semelhantes na espécie não acumuladora *Pteris ensiformis* exposta a 267 μM de arsenato. Estes autores não encontraram tais sintomas na espécie hiperacumuladora *Pteris vittata*. Apesar de necrose foliar estar freqüentemente relacionada a toxidez por arsênio, as plantas de *Brassica juncea* não apresentaram tais sintomas. Shaibur e Kawai (2009) não encontraram sintomas visíveis causados por arsenito (67 μM) em *Brassica rapa*. Tais plantas apresentaram murcha após o segundo e terceiro dias de tratamento, mas recuperaram a turgescência em seguida. Sistemas hidropônicos não são ideais para o entendimento sobre as relações hídricas uma vez que há uma disponibilidade hídrica contínua para as plantas. A ocorrência da murcha parece estar relacionada a uma limitação radicular causada pela redução do crescimento e comprometimento das raízes durante a exposição ao arsênio (Singh *et al.*, 2007; Singh e Ma, 2006; Machlis, 1941). No presente trabalho, porém não houve redução nem no comprimento nem na massa seca das raízes, sendo esta mais uma evidencia da tolerância desta espécie ao arsênio. Barbosa (2009) sugeriu que a ocorrência de murcha em plantas submetidas ao arsênio pode estar relacionada a uma redução no acúmulo de nutrientes na raiz. O acúmulo de nutrientes ocorre contra o gradiente eletroquímico e depende da disponibilidade energia. A redução da absorção de fosfato estaria prejudicando a síntese de ATP e conseqüentemente o acúmulo de íons nas

raízes. Tal queda leva a um aumento no potencial hídrico radicular e queda no gradiente de potencial hídrico em relação ao solo. Tais fatos explicariam a ocorrência de murcha mesmo em plantas cultivadas em sistema hidropônico, com plena disponibilidade hídrica. Não houve, porém, no presente trabalho, queda no teor de fósforo na raiz com os tratamentos. Embora não ocorra redução nos níveis fosfato em raízes, a presença de arsênio pode reduzir a disponibilidade de ATP. Meharg (1994) sugere que uma vez presente no citoplasma, o arsenato pode substituir o fosfato no ATP, formando complexos instáveis do tipo ADP-As, levando a uma interrupção nos fluxos de energia das células.

Os efeitos significativos no crescimento ocorreram na parte aérea, com redução no comprimento, área foliar, massa fresca e massa seca, sobretudo em plantas submetidas a 500 μM . O arsênio é considerado fitotóxico e apresenta correlação negativa com o crescimento de plantas de um modo geral (Kabata-Pendias and Pendias, 1991). Tu e Ma (2002), entretanto, demonstraram aumento de biomassa em plantas de *Pteris vittata* em solos contendo até 50 e 100 mg kg^{-1} de arsênio. A capacidade para manter o ganho de biomassa em ambientes ricos em arsênio é uma característica interessante para programas de fitorremediação. Pelo menos em doses inferiores a 200 μM as plantas de *Brassica juncea* atenderam a este requisito, suportando doses superiores aquelas encontradas, por exemplo, em solos, água e sedimentos no Quadrilátero Ferrífero em Minas Gerais (Matschullat, 2000).

A exposição ao arsênio foi capaz de alterar as trocas gasosas em *Brassica juncea* somente na mais alta dose utilizada. No sexto dia após o tratamento, houve queda em A acompanhada por uma redução em g_s e na razão C_i/C_a . Isto indica que está ocorrendo uma limitação estomática e/ou mesofílica na fotossíntese, ou seja, a queda em g_s é suficiente para reduzir os níveis de CO_2 que alcançam o sítio de carboxilação da ribulose- 1,5- bisfosfato carboxilase/ oxigenase (rubisco). A partir do décimo dia de tratamento, o decréscimo em A se mantém, bem como a queda em g_s . Porém, a redução em g_s não resulta na queda da razão C_i/C_a . Estes resultados sugerem que a partir do décimo dia de tratamento as limitações na fotossíntese não estão relacionadas a uma queda nos níveis de CO_2 que alcançam o sítio de carboxilação da rubisco e que, portanto, deve estar ocorrendo uma limitação bioquímica de A

A avaliação da fluorescência da clorofila *a* foi capaz de fornecer um indício da relação entre a limitação bioquímica e os efeitos do arsênio sobre a etapa fotoquímica de *A*. Ocorreu uma significativa redução na taxa aparente de transporte linear de elétrons em plantas submetidas a 500 μM de arsênio. Conseqüentemente, estaria ocorrendo uma redução no transporte vetorial de prótons e, portanto na síntese de ATP, além de queda na geração de poder redutor (NADPH). Tudo isso corrobora a diminuição em *A* observada nestas plantas e sugere a hipótese de que a limitação bioquímica que está ocorrendo na fotossíntese a partir do décimo dia está associada a limitações na etapa fotoquímica.

De fato, a 500 μM houve uma redução no rendimento quântico efetivo de conversão fotoquímica de energia no fotossistema II, $Y(\text{II})$, porém não ocorreram alterações nos valores do rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m). Isto indica que a capacidade do fotossistema II em utilizar a energia luminosa para reduzir o pool de quinonas oxidadas parece não ter sido alterado. Isto está de acordo com os valores encontrados para a capacidade fotoquímica do fotossistema II (q_L). Estes valores são uma estimativa do estado de oxidação dos primeiros aceptores estáveis (quinonas).

Não ocorreram alterações na capacidade fotoquímica do fotossistema II com a aplicação dos tratamentos. Estes resultados sugerem que não ocorreram danos nas membranas dos tilacóides ou alguma espécie de fotoinibição. A queda nas taxas de transporte de elétrons pode estar relacionada a uma alteração no transporte da energia luminosa nos complexos antenas. Ocorreu um aumento nos valores de fluorescência basal (F_0) em plantas submetidas a 200 e 500 μM de arsênio. O valor F_0 representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofilas a excitadas, antes de a energia ser dissipada para o centro de reação do PSII, ou seja, evento que independe da ocorrência da fotoquímica.

Não ocorreram alterações nos valores da dissipação de energia não regulada, $Y(\text{NO})$. Este representa a dissipação de energia que ocorre de forma constitutiva na forma de fluorescência e nas antenas do fotossistema II. Este fato descarta a possibilidade de ocorrência de danos nas antenas, e o aumento nos valores de F_0 poderia estar relacionado a um aumento na quantidade de complexos antena no fotossistema II.

Ocorreu um aumento no valor do rendimento quântico da dissipação de energia regulada, $Y(NPQ)$, em plantas submetidas a $500 \mu\text{M}$ de arsênio. Este parâmetro reflete a dissipação térmica que ocorre por meio do ciclo das xantofilas, que é regulado pela luz e pelo gradiente de prótons da membrana do tilacóide. O aumento da dissipação térmica está de acordo com as imagens de infravermelho obtidas após o décimo dia de tratamento em que se pode observar que as temperaturas das plantas submetidas a 200 e $500 \mu\text{M}$ são superiores as temperaturas observadas nas demais plantas. Considerando a ausência de danos no aparato fotossintético e nos complexos antena, é possível inferir que a queda nos eventos fotoquímicos e nas taxas de transporte de elétrons pode ser uma resposta a uma possível limitação na etapa bioquímica na fotossíntese. Este fato pode ser devido a alterações em atividade de enzimas envolvidas na etapa bioquímica ou simplesmente por alterações no metabolismo energético devido a deficiência de fosfato em plantas submetidas a arsênio. A redução nos eventos de carboxilação da rubisco poderia gerar um excesso de energia nas membranas dos tilacóides caso não ocorresse queda nos eventos fotoquímicos. Na ausência de mecanismos de dissipação este excesso poderia causar danos nas membranas. No caso das plantas de *Brassica juncea*, os mecanismos de dissipação do excesso de energia parecem estar relacionados a um incremento nos complexos antena do fotossistema II e aumento da dissipação térmica via ciclo das xantofilas.

Poucos trabalhos descrevem os efeitos do arsênio na fotossíntese, e são pouco detalhados, concentrando-se principalmente em espécies sensíveis a este metalóide e restringindo-se somente a determinação da taxa de fotossíntese, efeito nos pigmentos e relações hídricas (Rahman et al, 2007; Stoeva et al, 2005; Stoeva e Bineva, 2003, e Sushant e Gosh, 2010). Estes resultados demonstram que mesmo a concentrações altíssimas ($200 \mu\text{M}$) e altamente disponíveis (solução nutritiva, ao invés de experimentos em solo) não ocorre redução significativas na fotossíntese, e que não foram detectadas alterações nos parâmetros fotoquímicos, sendo esta mais uma evidência para confirmar que este genótipo de *Brassica juncea* é tolerante ao arsênio.

Um indicativo da ocorrência de danos nas membranas celulares é o incremento de malonaldeído (MDA) nos tecidos vegetais. O MDA é um produto da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A ocorrência de peroxidação é decorrente da geração de

excessos de espécies reativas de oxigênio, fenômeno comumente associado à presença de metais pesados (Sthos e Bagchi, 1995). No presente trabalho, não houve alteração significativa nos níveis de MDA tanto em raízes quanto na parte aérea, sugerindo que uma possível geração de espécies reativas de oxigênio não foi capaz de causar algum tipo de dano em membranas. Este fato está de acordo com os resultados obtidos por meio da quantificação de peróxido de hidrogênio.

Em raízes, seria esperado um dano decorrente dos altos níveis de arsênio encontrados. Foi observado um incremento significativo no teor de compostos fenólicos apenas em raízes. Estes compostos poderiam estar atuando na redução de um possível excesso de espécies reativas de oxigênio, evitando assim a ocorrência de danos oxidativos. Diversas pesquisas têm demonstrado a importância destes metabólitos em processos de destoxificação celular em plantas na presença de metais pesados (Michalak, 2006). Tais compostos podem atuar diretamente sobre membranas, aumentando sua estabilidade (Arora *et al.*, 2000), impedindo a difusão de radicais ou alterando a cinética de peroxidação (Blokhina *et al.*, 2003; Arora *et al.*, 2000). Podem atuar ainda, diretamente sobre as espécies reativas de oxigênio, através da doação de elétrons ou hidrogênio (Khan *et al.*, 2000; Shakihama *et al.*, 2000; Inzé e Van Montagu, 1995; Arora *et al.*, 1998).

Os resultados de trabalhos envolvendo plantas de *Brassica juncea* expostas ao arsênio ajudam a fundamentar a tolerância do genótipo em estudo. Pesquisas demonstram que espécies tolerantes de *Brassica juncea* possuem uma capacidade elevada em acumular arsênio em seus tecidos, além de apresentar respostas antioxidantes relacionadas à atividade enzimática e metabolismo de tióis (Srivastava *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2009). Plantas de *Brassica juncea* expostas a 25 µM de arsênio por 96 horas foram capazes de desenvolver respostas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, refletindo um sistema de defesa aos danos celulares causados pelo arsênio (Khan *et al.*, 2009). Outros trabalhos utilizaram linhagens transgênicas visando o aumento da tolerância de *Brassica juncea* ao arsênio e cádmio e demonstraram a importância de fitoquelatinas no transporte intercelular de metais pesados (Gasic e Korban, 2007; Navaza *et al.*, 2006).

Em conjunto, estes dados permitem evidenciar que o genótipo de *Brassica juncea* em estudo é tolerante ao arsênio. Apesar de acumular níveis altíssimos de arsênio nas raízes, estas plantas não apresentaram dano oxidativo, nem redução na acumulação de massa seca nas raízes. A dose de 200 μM reduziu marginalmente a área e massa foliar, e nesta dose não foram observadas alterações pontuais na fotossíntese e parâmetros de fluorescência até o 13º dia de tratamento. Esta tolerância indica que este genótipo pode ser utilizado para o desenvolvimento de uma planta biossensora de arsênio. O fato de que mais de 5000 mg kg^{-1} de arsênio seja acumulado nas raízes desta espécie, com efeitos reduzidos no seu crescimento, indica o grande potencial desta espécie para a fitoestabilização, uma importante estratégia de fitorremediação, a qual reduz a disponibilidade de metais contaminantes na rizosfera, seja impedindo sua lixiviação para o lençol freático, seja reduzindo os efeitos da erosão do solo na contaminação ambiental, ou mesmo reduzindo o efeito tóxico em outras espécies de plantas e animais. Apesar de ser uma planta herbácea, sua alta taxa de crescimento, seu hábito bianual de reprodução, e sua alta biomassa acumulada entre as espécies tolerantes a este metalóide, tornam esta espécie uma alternativa para a revegetação de áreas contaminadas e fitoestabilização de áreas contaminadas com arsênio.

5. CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos permite concluir que o genótipo de *Brassica juncea* estudado possui tolerância ao arsênio. Esta tolerância está ligada principalmente a capacidade de manter o metabolismo do fosfato e níveis normais de espécies reativas de oxigênio resultando na manutenção da estrutura de membranas. Os compostos fenólicos exercem um papel importante de proteção contra o estresse em raízes. A tolerância observada se reflete na alta capacidade de acumular arsênio em raízes sem apresentar queda no crescimento e acúmulo de matéria seca.

Outro fato importante a ser ressaltado é a capacidade de tais genótipos em manter a atividade fotossintética mesmo sob doses elevadas de arsênio. Estes fatos nos levam a acreditar que embora o genótipo não acumule grande quantidade de arsênio na parte aérea, este possui características importantes para a utilização em remediação de áreas contaminadas. Ele suporta concentrações mais elevadas do que aquelas encontradas em regiões contaminadas do Brasil. A alta capacidade de acumular e seqüestrar arsênio nas raízes permite a utilização deste genótipo como fito-estabilizador destas áreas contaminadas.

Estudos adicionais são interessantes para avaliar as respostas de tais plantas em longo prazo. Além disso, é necessário avaliar se este genótipo se adaptaria bem em ambientes contaminados, em áreas de mineração em que há uma combinação de diversos fatores ambientais que poderiam afetar o desenvolvimento das plantas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aken BV. 2008. Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends Biotechnol.* 5: 225-227.

Allen AB. 2007. Handbook of plant nutrition. (Books in soils, plants and the environment). Sulfur by Haneklaus S, Bloem E, Schnug E, Kok LJ, Stulen I. Pilbeam DJ, ed. p 183-277.

Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM .2000. Modulation of liposomal membranes fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 102-109.

Asher CJ, Reay PF. 1979. Arsenic uptake by barley seedlings. *Aust. J. of Plant Physiol.* 6: 459-466.

Barbosa AP. 2009. Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* L. (DC) (Fabaceae). Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade Federal de Viçosa, MG. 50 p.

Bech J, Poschenrieder C, Barcelo J, Lansac A. 2002. Plants from mine spoils in the South American area as potential sources of germplasm for phytoremediation technologies. *Acta Biotechnol.* 1: 5-11.

Bhattacharjee H, Rosen BP. 2007. Arsenic metabolism in prokaryotic and eukaryotic microbes. In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Nies DH, Silver S, eds. Berlin, Germany: Springer-Verlag, p.371-406.

Bilger W, Schreiber U, Bock M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102: 425-432.

Bleeker PM, Hakvoort HWJ, Bliet M, Souer E, Schat H. 2006. Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J.* 45: 917-929.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV . 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91: 179-194

Borba RP, Figueiredo BR, Rawlins BG , Matchullat J. 2000. Arsenic in water and sediment in the Iron Quadrangle, Minas Gerais State, Brasil. *Rev. Brasil. de Geoc.* 30: 554-557.

Cullen, WR, Reimer, KJ. 1989. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.* 89: 713-764.

Cunningham SD, Berti WR, Huang JWW. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.*13: 393-397.

Dey S, Dou DX, Rosen BP. 1994. ATP-dependent arsenite transport in everted membrane vesicles of *Escherichia coli*. *J. of Biol. Chem.* 269: 25442-25446.

Ehleringer J .1981. Leaf absorptances of Mohave and Sonoran desert plants. *Oecologia* 102: 366-370.

Ellenberg H. 1991. Bioindicators and biological monitoring. In Biological monitoring. signals from the environment. Ellenberg H, ed. Vieweg, Braunschweig, p.13-127.

Ernst W. 2005. Phytoextraction of mine wastes options and impossibilities. *Chem Erde-Geochem.*65: 29-42.

Falla J, Laval GP, Henryon M, Morlot D, Ferard JF. 2000. Biological air quality monitoring: a review. *Environ. Monit. and Assess.* 64: 627-644.

Fayiga AO, Ma LQ. 2005. Arsenic uptake by two hyperaccumulator ferns from four arsenic contaminated soils. *Water Air Soil Pollution.* 168: 71-89.

Flores-Tavizon E, Alarcon-Herrera MT, Gonzalez-Elizondo S, Olguin EJ. 2003. Arsenic tolerating plants from mine sites and hot springs in the semi-arid region of Chihuahua, Mexico. *Acta Biotechnol.* 23: 113-119.

Francesconi K, Visoottiviseth P, Sridokchan W, Goessler W. 2002. Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 284: 27-35.

Gasic k, Korban SS. 2007. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (AtPCS1) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol. Biol.* 64: 361-369.

Gay C, Collins J, Gebicki JM. 1999. A critical evolution of the effect of sorbitol on the ferric-xilenol orange hydroperoxide assay. *Analytical Biochem.* 273: 149-155.

Genty B, Briantais J-M, Baker NR .1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* 990: 87-92.

Ghosh M, Shen J, Rosen BP. 1999. Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 96: 5001–5006.

Grant WF .1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mut. Res.* 426: 107-112.

- Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S. 1999. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 11: 1153-1163.
- Hamlin RL, Schatz C, Barker AV. 2003. Zinc accumulation in Indian mustard as influenced by nitrogen and phosphorus nutrition. *J. Plant Nut.* 26: 177-190.
- Heath RL, Packer L .1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125: 180-198.
- Hendrickson L, Furbank RT and Chow WS .2004. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 82: 73-81.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.
- Huang R, Gao S, Wang W, Staunton S, Wang G .2006. Soil arsenic availability and the transfer of soil arsenic to crops in suburban areas in Fujian Province, southeast China. *Sci. Total Environ.* 368: 531-541.
- Indriolo E, Na G, Ellis D, Salt DE, Banks JA. 2010. A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell* 22: 2045-2057.
- Inzé D, Van Montagu M. 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 153.
- Kabata-Pendias A, Pendias H. 1991. Arsenic. In: Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA 203-209.

Khan I, Ahmad A, Iqbal M. 2009. Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 72: 626-634.

Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 21: 197-207.

Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res.* 79: 209-218.

Laisk A, Loreto F. 1996. Determining photosynthetic parameters from leaf CO₂ exchange and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 110: 903-912.

Logoteta B, Xu XY, Macnair MR, McGrath SP, Zhao FJ. 2009. Arsenite efflux is not enhanced in the arsenate-tolerant phenotype of *Holcus lanatus*. *New Phytol.* 183: 340-348.

Lombi E, Zhao FJ, Fuhrmann M, Ma LQ, McGrath SP. 2002. Arsenic distribution and speciation in the fronds of the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.* 156: 195-203.

Ma LQ, Komar KM, Tu C, Zhang WH, Cai Y, Kennelley ED. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409: 579.

Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688-691.

Machlis L. 1941. Accumulation of arsenic in the shoots of sudan grass and bush bean. *Plant Physiol.* 16: 521-544.

Marin AR, Masscheleyn PH, Patrick WH. 1993. Soil redox-pH stability of arsenic species and its influence on arsenic uptake by rice. *Plant and Soil* 152: 245-253.

Matschullat J, Borba RP, Deschamps E, Figueiredo BF, Gabrio T, Schwenk M (2000). Human and environmental contamination in the Iron Quadrangle, Brazil. *App. Geochem.* 15: 181-190.

Meharg AA, Naylor J, Macnair MR. 1994. Phosphorus nutrition of arsenate tolerant and nontolerant phenotypes of velvetgrass. *J. Environ. Qual.* 23: 234-238.

Meharg AA, Macnair MR. 1992. Suppression of the high-affinity phosphate-uptake system – a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J. Exp. Bot.* 43: 519-524.

Mendez MO, Maier RM. 2008. Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments - An Emerging Remediation Technology. *Environ. Health Perspectives.* 116: 278-283

Mendez MO, Glenn EP, Maier RM. 2007. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation and microbial community changes. *J. Environ. Qual.* 36: 245-253.

Michalak A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish J. Environ. Stud.* 15: 523-530.

Munshower FF. 1994. Practical Handbook of Disturbed land Revegetation. Boca Raton, FL: Lewis Publishing.

Navaza AP, Montes-Bayo M, LeDuc DL, Terry N, Sanz-Medel A. 2006. Study of phytochelatin and other related thiols as complexing biomolecules of As and Cd in wild type and genetically modified *Brassica juncea* plants. *J. Mass Spectrom.* 41: 323-331.

Nordstrom DK. 2002. Public health – worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296: 2143-2145.

Oxborough K, Baker NR .1997b. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photosynth Res.* 54: 135-142.

Pickering IJ, Gumaelius L, Harris HH, Prince RC, Hirsch G. 2006. Localizing the biochemical transformations of arsenate in a hyperaccumulating fern. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5010-5014.

Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE. 2000. Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. *Plant Physiol.* 122: 1171-1177.

Rahman MA, Hasegawa H, Rahman MM, Islam MN, Majid Miah MA, Tasmen A. (2007). Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa L.*) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 67: 1072-1079.

Rosario K, Iverson SL, Henderson DA, Chartrand S, McKeon C, Glenn EP. 2007. Bacterial community changes during plant establishment at the San Pedro River mine tailings site. *J Environ. Qual.* 36: 1249-1259.

Ruiz JM, Romero L. 2002. First evidence of arsenic phytoremediation. *Trends Plant Sci.* 7: 385.

Sakihama Y, Mano J, Sano S, Asada K, Yamasaki H. 2000. Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279: 949-954.

Salt DE, Pickering IJ, Prince RC, Gleba D, Dushenkov S, Smith RD, Raskin I. 1997. Metal accumulation by aquacultured seedlings of Indian mustard. *Environ. Sci. and Technol.* 31: 1636-1644.

Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol. Rockville* 109: 1427-1433.

Sánchez-Viveros G, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A. 2011. Short-Term Effects of Arsenate-Induced Toxicity on Growth, Chlorophyll and Carotenoid Contents, and Total Content of Phenolic Compounds of *Azolla filiculoides*. *Water Air Soil Pollut.* 217: 455-462.

Shaibur MR, Kawai S. 2009. Effect of arsenic on visible symptom and arsenic concentration in hydroponic Japanese mustard spinach. *Environ. Exp. Bot.* 67: 65-70.

Singh HP, Batish DR, Kohli RK, Arora K. 2007. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regul.* 53: 65-73.

Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B. 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L. and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci.* 170: 274-282.

Singh N, Ma LQ. 2005. Arsenic speciation, and arsenic and phosphate distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and non-hyperaccumulator *Pteris ensiformis* L. *Environ. Pol.* 141: 238-246.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85.

Srivastava S, Srivastava K, Suprasanna P, D'Souza SF. 2010. Comparative Antioxidant Profiling of Tolerant and Sensitive Varieties of *Brassica juncea* L. to Arsenate and Arsenite Exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84: 342-346.

Srivastava S, Srivastava AK, Suprasanna P, Souza SFD. 2009. Comparative biochemical and transcriptional profiling of two contrasting varieties of *Brassica juncea* L. in response to arsenic exposure reveals mechanisms of stress perception and tolerance. *J. Exp. Bot.* 60: 3419-3431.

Srivastava M, Ma LQ, Singh N, Singh S. 2005. Antioxidant responses of hyper-accumulator and sensitive fern species to arsenic. *J. Exp. Bot.* 56: 1335-1342.

Sthos SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol Med.* 48: 321-348.

Stoeva N, Berova N, Zlatev Z. 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biol. Plant.* 49: 293-296.

Stoeva, N, Bineva T. 2003. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 29: 87-95.

Su YH, McGrath SP, Zhu YG, Zhao FJ. 2008. Highly efficient xylem transport of arsenite in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.* 180: 434-441.

Sushant KS, Ghosh AK. 2010. Effect of Arsenic on Photosynthesis, Growth and its Accumulation in the Tissues of *Allium cepa* (Onion). *Intern. J. Environ. Eng. Manag.* 1: 39-50.

Takahashi Y, Minamikawa R, Hattori KH, Kurishima K, Kihou N, Yuita K. 2004. Arsenic behavior in paddy fields during the cycle of flooded and nonflooded periods. *Environ. Sci. & Technol.* 38: 1038-1044.

Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA. 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais - 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

Terry N, Carlson C, Raab TK, Zayed A. 1992. Rates of Se volatilization among crop species. *J. Environ. Qual.* 21: 341-344.

Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJM. 2007. Arsenic hazards; strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnol.* 25: 158-165.

Tu C, Ma LQ .2002. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. *J. Environ. Qual.* 31: 641-647.

Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky AJ. 1989. Evaluation of arsenate- and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba*-G1. *J. Exp.Bot.* 40: 119-128.

Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.* 181: 759-776.

Wang JR, Zhao FJ, Meharg AA, Raab A, Feldmann J, McGrath SP. 2002. Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*: uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiol.* 130: 1552-1561.

Webb SM, Gaillard JF, Ma LQ, Tu C. 2003. XAS speciation of arsenic in a hyper-accumulating fern. *Environ. Sci. Technol.* 37: 754-760.

Wong MH. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*. 50: 775-780.

Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S. 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. of Biol. Chem.* 272: 30061-30066.

Xu XY, McGrath SP, Meharg A, Zhao FJ. 2008. Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. *Environ. Sci. & Technol.* 42: 5574-5579.

Zhang WH, Cai Y, Downum KR, Ma LQ. 2004. Thiol synthesis and arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata* (Chinese brake fern). *Environ. Pollut.* 131: 337-345.

Zhang WH, Cai Y, Tu C, Ma LQ. 2002. Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyperaccumulating plant. *Sci. of the Total Environ.* 300: 167-177.

Zhao FJ, Ma JF, Meharg AA, McGrath SP. 2009. Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol.* 181: 777-794.

Zhao FJ, Wang JR, Barker JHA, Schat H, Bleeker PM, McGrath SP. 2003. The role of phytochelatins in arsenic tolerance in the hyperaccumulator *Pteris vittata*. *New Phytol.* 159: 403-410.