

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**



**Mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e  
ultraestruturais induzidas por Cd em plântulas de  
*Theobroma cacao* L.**

**ANDRESSA VIEIRA DE CASTRO**

**ILHÉUS – BAHIA  
2013**

**ANDRESSA VIEIRA DE CASTRO**

**Mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e  
ultraestruturais induzidas por Cd em plântulas de  
*Theobroma cacao* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

**ILHÉUS – BAHIA  
2013**

C355

Castro, Andressa Vieira de.

Mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e ultraestruturais induzidas por Cd em plântulas de *Theobroma cacao* L. / Andressa Vieira de Castro. – Ilhéus, BA : UESC, 2013.  
xii, 62 f. : il.

Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências: f. 50-62.

1. Cacao. 2. Stress oxidativo. 3. Microscopia eletrônica. 4. Fotônica. 5. Cádmio – Toxicologia. I. Título.

CDD 633.74

**ANDRESSA VIEIRA DE CASTRO**

**Mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e  
ultraestruturais induzidas por Cd em plântulas de  
*Theobroma cacao* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida.

APROVADA: 04 de junho de 2013.

Prof. Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida  
UESC – Orientador

Prof. Dr. Pedro Antonio O. Mangabeira  
UESC

Dra. Luana Mahé Gomes Costa  
UESC

Prof. Dra. Vânia Lima Souza  
IFBA

## **DEDICATÓRIA**

Ao anjo que veio enviado por Deus para abençoar e ser a razão da minha vida, à responsável pelo meu melhor sorriso, à dona das noites em claro mais gratificantes de minha vida, à sincera alegria de ser mãe, dedico a Ana Clara Vieira Lazzarotto, minha filha.

**DEDICO.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela dádiva da vida, por ser a razão de minha existência, obrigada pelos momentos difíceis porque eles me capacitaram e ajudaram a tornar-me o que sou hoje.

À minha família pelo apoio incondicional. Meu esposo, Ludianderson, pelo amor, amizade, companheirismo, ajuda em tudo que precisei e a qualquer momento, uma das pessoas que eu mais admiro. Minha mãe, Marilene, por ter cuidado tão bem de minha filha enquanto eu estava na UESC e por ter me apoiado em tudo na vida. Minha filha, Ana Clara, por ser a luz de minha vida e ter me apresentado o amor mais sincero que alguém pode possuir.

Ao professor Alex-Alan, uma pessoa completamente disponível para a solução de dúvidas, conselhos, um excelente orientador.

Aos amigos que me ajudaram a fazer as digestões das amostras para macro e micronutrientes, Jadiel, Mayara, Rafaela, Walter, Givaldo, obrigada pelos momentos de resenhas e risadas, foram dias cansativos, porém super divertidos.

A todo pessoal do Laboratório de Proteômica, Ana Camila, Wallace, Milena e, em especial, a Leila, pela paciência, amizade e por ser essa pessoa que não sabe dizer não, está sempre disposta a ajudar os outros e tem um coração enorme, que Deus te abençoe!

A toda família do grupo de Fisiologia Vegetal, Ivanildes, Márcia, Romária, Priscilla, Tainã, Joedson e Viviane. Em especial a Graciela e a Nicolle que foram minhas grandes companheiras nessa caminhada.

Ao pessoal da microscopia eletrônica: Zé, Thaíse, Lane, dona Jaci.

Ao colegiado de Genética, em especial a Fabrícia, pela boa vontade e paciência, a Kátia e Mara, sempre prestativas, ao Prof. Márcio por ser uma pessoa atenciosa e prestativa aos alunos.

À banca de defesa pelas preciosas dicas e acréscimos imprescindíveis na dissertação, Luana Mahé, Vânia Lima e Pedro Mangabeira, muito obrigada.

A UESC pela oportunidade do mestrado e toda infraestrutura necessária, a todos os funcionários que direta ou indiretamente contribuíram para o trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as dificuldades enfrentadas durante a execução deste trabalho, sem elas eu não seria o que sou hoje.

## SUMÁRIO

<b>EXTRATO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	4
<b>2.1. Theobroma cacao L</b> .....	4
<b>2.2. Fertilizantes Fosfatados</b> .....	6
<b>2.3. Metais tóxicos</b> .....	6
<b>2.4. Cádmio (Cd)</b> .....	7
<b>2.5. Estresse oxidativo em plantas</b> .....	9
<b>2.6. Alterações anatômicas induzidas por Cd e outros metais tóxicos</b> .....	10
<b>2.7. Alterações Ultraestruturais induzidas por Cd</b> .....	12
<b>2.8. Mecanismos de tolerância ao Cd</b> .....	13
<b>2.9. Expressão gênica em plantas submetidas a estresses por metais tóxicos</b> .....	15
<b>3. Material e Métodos</b> .....	16
<b>3.1. Material vegetal e condições de cultivo</b> .....	16
<b>3.1.1 Coleta de material vegetal para análise</b> .....	17
<b>3.2 Determinação da atividade de peroxidase do guaiacol (EC 1.11.1.7)</b> .....	17
<b>3.3 Microscopia Fotônica</b> .....	18
<b>3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b> .....	19
<b>3.5 Expressão gênica</b> .....	19
<b>3.6 Análise de Macro e micronutrientes minerais e Cd</b> .....	21
<b>3.7 Análise estatística</b> .....	22
<b>4. Resultados</b> .....	23
<b>4.1. Peroxidases do guaiacol (GPX)</b> .....	23
<b>4.2. Microscopia fotônica</b> .....	25
<b>4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	26
<b>4.4. Expressão Gênica</b> .....	30
<b>4.5 Análise de Cd, macro e micronutrientes minerais</b> .....	33
<b>5. Discussão</b> .....	40
<b>5.1 Peroxidase do guaiacol (GPX)</b> .....	40
<b>5.2. Microscopia fotônica</b> .....	41
<b>5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	42
<b>5.4 Expressão gênica</b> .....	43
<b>5.5 Análise de Cd, macro e micronutrientes minerais</b> .....	44
<b>6. Conclusões</b> .....	49
<b>7. Referências</b> .....	50



## **EXTRATO**

Castro, Andressa V. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, junho de 2013.  
**Mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e ultraestruturais induzidas por Cd em plântulas de *Theobroma cacao* L.** Orientador: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-orientador: Carlos Priminho Pirovani.

Cádmio (Cd), descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco (Zn), tem sido classificado em sétimo lugar na lista dos 20 compostos mais tóxicos aos seres humanos, animais e plantas. O uso de fertilizantes fosfatados na agricultura é considerado uma das principais causas da presença de Cd nos alimentos e da sua dispersão no ambiente. Nas células vegetais, o Cd dispara uma sequência de reações metabólicas e promove, conseqüentemente, uma série de alterações em plantas. Objetivou-se, no presente trabalho, avaliar as alterações moleculares, bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais induzidas por Cd em folhas maduras e raízes de plântulas de duas progênies de *T. cacao*, resultantes da autofecundação de 'Catongo' e do cruzamento entre CCN- 10 x SCA-6, obtidas a partir da germinação de sementes em diferentes concentrações de Cd (0; 2; 4; 8; 16 e 32 mg L<sup>-1</sup>), na forma de CdCl<sub>2</sub> x 5/2 H<sub>2</sub>O. Verificou-se que o aumento da concentração de Cd, fornecido via seminal, provocou alterações ultraestruturais nas células do mesofilo foliar, como (i) deformação em cloroplastos; (ii) condensação de cromatina nuclear; (iii) aumento no acúmulo de grãos de amido nos cloroplastos; (iv) e armazenamento de material eletrodensso na parede celular, principalmente na progênie 'Catongo'. Observaram-se, também, alterações anatômicas em nível foliar como a redução na espessura do mesofilo para ambas as progênies de *T. cacao* e diminuição na espessura da epiderme na face abaxial para 'Catongo'. Constatou-se aumento na atividade da peroxidase do guaiacol, enzima envolvida no metabolismo antioxidativo, em folhas de CCN-10 x SCA-6 e em raízes de 'Catongo' x 'Catongo'. Na presença de Cd, CCN-10 x SCA-6 apresentou incremento na expressão dos genes associados à síntese da fitoquelatina e à peroxidase do guaiacol em folhas; ao passo que para 'Catongo' x 'Catongo' houve também incremento na expressão de genes em folha, mas associados à síntese da peroxidase do guaiacol e à dismutase do superóxido. Por outro lado, em raízes de CCN-10 x SCA-6, o Cd promoveu aumento na expressão do gene associado à síntese de metalotioneínas; enquanto que em raízes de 'Catongo' x 'Catongo' houve incremento na expressão dos genes associados à síntese de metalotioneínas e de fitoquelatinas. Além disso, houve maior acúmulo de Cd na parte aérea, em ambas as progênies de *T. cacao*, principalmente para 'Catongo' x 'Catongo'. Verificou-se, também, que o aumento da concentração de Cd, fornecido via seminal, promoveu diminuição no teor de cátions divalentes em ambas as progênies, que competem pelos mesmos sítios de absorção do Cd, como Mn, Zn e Fe. Em suma, o incremento da concentração de Cd via seminal provocou alterações tissulares e celulares em níveis foliar e radicular; promoveu aumento do estresse oxidativo; interferiu na absorção de nutrientes minerais; e na expressão gênica em ambas as progênies de *T. cacao* avaliadas. A progênie CCN-10 x SCA-6 se mostrou mais tolerante ao estresse por Cd, quando

comparada à progênie '*Catongo*'; uma vez que acumulou menor quantidade de Cd nos órgãos vegetativos, apresentou maior atividade de peroxidases e incremento na síntese de fitoquelatinas e metalotioneínas, peptídeos responsáveis pelo sequestro de Cd em nível de vacúolo; reduzindo, por sua vez, a toxicidade de Cd em nível celular.

Palavras-chave: cacau, estresse abiótico, estresse oxidativo, microscopias eletrônica e fotônica, q-PCR, toxidez de cádmio.

## **ABSTRACT**

Castro, Andressa V. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, June, 2013. **Changes Morphological, biochemical, molecular and ultrastructural induced by Cd in seedlings of *Theobroma cacao***. Advisor: Alex-Alan Furtado de Almeida. Co-advisor: Carlos Priminho Pirovani.

Cadmium (Cd), discovered in 1817 by Stromeyer as an impurity in zinc carbonate (Zn), has been ranked seventh in the list of 20 compounds more toxic to humans, animals and plants. The use of phosphate fertilizers in agriculture is regarded as a main cause for the presence of Cd in foods and their dispersion in the environment. In plant cells, the Cd triggers a sequence of metabolic reactions and promotes, therefore, a number of changes in plants. The aim of the present study was to evaluate the molecular, biochemical, morphological and ultrastructural alterations induced by Cd in mature leaves and roots of seedlings of two progenies of *T. cacao* resulting from selfing of 'Catongo' x 'Catongo' and the crossing between CCN-10 x SCA-6, obtained from the germination of seeds in different concentrations of Cd (0, 2, 4, 8, 16 and 32 mg L<sup>-1</sup>) in the form of CdCl<sub>2</sub>.5/2 H<sub>2</sub>O. It was found that increasing the concentration of Cd, supplied via seminal, caused ultrastructural changes in leaf mesophyll cells, such as (i) deflection in chloroplasts; (ii) condensation of nuclear chromatin; (iii) increase in the accumulation of starch grains in chloroplasts; (iv) storage of electron-dense material in the cell wall, particularly in the progeny 'Catongo' x 'Catongo'. The study also observed anatomical changes in leaf level as the increase in the thickness of the mesophyll for both progenies of *T. cacao* and decrease in thickness of the epidermis on the abaxial face to 'Catongo'. We found an increase in the activity of guaiacol peroxidase, an enzyme involved in antioxidative metabolism in leaves of CCN-10 x SCA 6 and roots of 'Catongo' x 'Catongo'. In the presence of Cd, CCN-10 x SCA-6 showed an increase in expression of genes associated to phytochelatin synthetase and guaiacol peroxidase, while for 'Catongo' there was also an increase in gene expression in leaves but associated to synthesis of guaiacol peroxidase and superoxide dismutase. Moreover, in roots of CCN-10 x SCA-6, Cd increased the expression of the gene associated to synthesis of metallothioneins, whereas in roots of 'Catongo' x 'Catongo' there was an increase in the expression of genes associated to synthesis of metallothionein and phytochelatins. In addition, there was a greater accumulation of Cd in shoots in both progenies of *T. cacao*, especially for 'Catongo' x 'Catongo'. It was found also that increasing the concentration of Cd, supplied through seminal caused a decrease in the content of divalent cations in both progeny, that compete for the same site of absorption of Cd, such as Mn, Zn and Fe. In summary, the increased concentration of Cd through seminal caused changes in tissue and cell levels in leaf and root; promoted increased oxidative stress; interfere with the absorption of nutrients, and gene expression in both progenies of *T. cacao* evaluated. The progeny CCN-10 x

SCA-6 was more tolerant to Cd stress compared to the progeny 'Catongo' x 'Catongo'; since smaller amount of Cd accumulated in vegetative organs showed higher peroxidase activity and an increase in the synthesis of phytochelatins and metallothionein, peptides responsible for sequestration of Cd in the vacuole; reducing, in turn, Cd toxicity at cell level.

**Keywords:** abiotic stress, cacao, cadmium toxicity, electron microscopy and photonics, oxidative stress, q-PCR,

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em duas **24**  
progênes de *T. cacao* ('Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x  
SCA-6).
- Figura 2 -** Eletromicrografias de células do mesofilo foliar das progênes **27**  
'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6.
- Figura 3 -** Eletromicrografias de células do mesofilo foliar das progênes **29**  
'Catongo' x 'Catongo' e 'CCN-10 x SCA-6.
- Figura 4 -** Expressão relativa dos genes que codificam para peroxidases **32**  
(PER- 1), dismutase do superóxido citoplasmática (SODCyt),  
metalotioneínas (MET), fitoquelatinas (PCs) em folhas e  
raízes de plântulas de progênes de *T. cacao* 'Catongo' x  
'Catongo' e CCN-10 x SCA-6.
- Figura 5 -** Acúmulo de Cd nas raízes (●), caules (Δ) e folhas (□) de **34**  
duas progênes de *T. cacao* CCN-10 x SCA-6 e 'Catongo' x  
'Catongo'.
- Figura 6-** Acúmulo de macronutrientes minerais em folhas (□), caules **36**  
(Δ) e raízes (●) de progênes de *T cacao*: CCN-10 x SCA-6 e

'Catongo' x 'Catongo'.

**Figura 7-** Acúmulo de macronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T cacao*: CCN-10 x SCA-6 e 'Catongo' x 'Catongo' **38**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Pares de *primers* gene-específicos utilizados nas análises de qRT-PCR. **20**

**Tabela 2** - Análise anatômica do mesofilo foliar de plântulas de progênies de *T. cacao*. **26**

**Tabela 3** - Equações das curvas de regressão para o teor de Cd, macro e micronutrientes minerais em folha, caule e raiz de plântulas de progênies de *T. cacao*. **39**



## 1. Introdução

*Theobroma cacao* L. (Malvaceae) é uma espécie vegetal nativa da América do Sul e Central, cujo gênero compreende cerca de 20 espécies (KENNEDY, 1995). A importância econômica do cacau se deve, principalmente, à produção de frutos, dos quais se extraem sementes que servem de matéria prima para a fabricação do chocolate e de vários outros produtos (ALMEIDA; VALLE, 2007; GODOY et al., 2009). *T. cacao* é considerada uma das espécies vegetais mais importantes do mundo, e dentre os países com maior extensão de área plantada estão Brasil, Malásia e alguns outros países da África Ocidental (DANTAS; GUERRA, 2010). O Brasil atualmente é o sexto principal produtor de cacau, participando com 4,4% da produção mundial, o que corresponde a 161 mil toneladas de amêndoas secas de cacau (ICCO, safra 2011- 2012).

O Cádmio (Cd), descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco (Zn), tem sido classificado em sétimo lugar na lista dos 20 compostos mais tóxicos existentes na natureza (AL-KEDHAIRY et al., 2001). A biodisponibilidade de metais pesados no solo, inclusive de Cd, é regulada por processos físicos, químicos e biológicos e por suas interações (ERNEST et al., 1996). Pequenas variações de pH podem causar grandes modificações na disponibilidade de metais (PIERANGELI et al., 2001). No solo, o Cd apresenta-se, principalmente, na forma disponível, trocável, sendo facilmente absorvido pelas plantas, sendo causador de fitotoxicidade (SOARES et al., 2005). As rochas fosfatadas usadas na produção de fertilizantes são as maiores fontes de contaminação de Cd em solos agrícolas (MORTVEDT, 1995). Assim, o uso de fertilizantes fosfatados na agricultura é considerado uma das principais causas do desequilíbrio da presença de Cd nos alimentos e da sua dispersão no ambiente, principalmente devido a sua característica de bioacumulação (DICKINSON; PULFORD, 2005).

Recentemente, tem-se encontrado concentrações de Cd em níveis tóxicos em amêndoas secas de cacau e em sementes de outros cultivos (KRAMER, 2010). O Cd é classificado como um dos metais pesados mais tóxico existente na natureza (AL- KEDHAIRY et al., 2001) para plantas, animais e seres humanos (ALMEIDA et al., 2007). No caso de animais e seres humanos, ao se acumular no organismo ao

longo da cadeia alimentar, pode desenvolver doenças crônicas, a exemplo do câncer (MOULIS, 2010).

Nas células vegetais, o Cd dispara uma sequência de reações metabólicas, e promove, conseqüentemente, uma série de alterações em plantas como: (i) inibição ou diminuição do crescimento da parte aérea e do sistema radicular; ii) indução da senescência prematura e clorose foliar; iii) lignificação; (iv) diminuição das taxas transpiratórias e fotossintéticas; (v) aumento na atividade de determinadas enzimas, tais como peroxidases, catalase, redutase da glutathione, sintetase da glutamina e dismutase do superóxido; (vi) indução da produção de fitoquelatinas; (vii) estímulo do metabolismo secundário e, finalmente, (viii) morte celular (ALMEIDA et al., 2010; PIETRINI et al., 2010; CALLAHAN et al., 2006). No entanto, existem espécies vegetais que conseguem se desenvolver nesses ambientes contaminados por metais tóxicos, por meio de estratégias de sobrevivência como: (i) exclusão do metal por meio da absorção seletiva de elementos minerais; (ii) quelatação de íons metálicos tóxicos por um ligante específico de alta afinidade (PATRA et al., 2004); (iii) acúmulo de fitoquelatinas e de metalotioneínas (PIETRINI et al., 2010; SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002); (iv) retenção de metais tóxicos nas raízes, impedindo a sua translocação para a parte aérea; v) compartimentalização de metais tóxicos em nível de vacúolos e adsorção à parede celular; (v) exclusão do metal por meio da absorção seletiva de elementos minerais; (vi) ativação de enzimas antioxidativas, que protegem as vias vitais dos processos fisiológicos contra danos resultantes de espécies reativas de oxigênio (EROs); (vii) ) exclusão e acumulação de grandes quantidades de metais tóxicos em seus tecidos; e (viii) e mecanismos de reparo celular (ALMEIDA et al., 2010).

Dessa forma, o estudo das alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e ultraestruturais promovidas pelo Cd em plântulas de *T. cacao* oriundas de sementes germinadas em ambientes contaminados por este elemento metálico, pode mostrar as diferenças entre progênies contrastantes para tolerância a estresses bióticos e abióticos. Existem na literatura diversos estudos avaliando as alterações metabólicas promovidas pelo Cd em diferentes espécies incluindo *T. cacao*, principalmente em cultivos hidropônicos. Porém, não há registros em relação à toxidez por Cd em sementes de *T. cacao*. Por isso, estudos básicos são



importantes auxiliando no desenvolvimento de programas de melhoramento genético, a fim de se obter genótipos mais tolerantes ao Cd e permitir o cultivo desta espécie, de elevada importância econômica e socioambiental, em áreas com níveis tóxicos desse elemento. Este trabalho teve por objetivo avaliar as mudanças morfológicas, bioquímicas, moleculares e ultraestruturais induzidas por Cd em progênies de *T. cacao*, contrastantes para tolerância a estresses bióticos e abióticos, oriundas do cruzamento entre 'Catongo' x 'Catongo' (intolerante) e entre CCN-10 x SCA-6 (tolerante).

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1. *Theobroma cacao* L.

*T. cacao* é uma espécie arbórea tropical perene, eudicotiledônea e diplóide ( $2n=20$ ) (FIGUEIRA et al., 1992), que faz parte da família Malvaceae com América do Sul como origem geográfica (ALMEIDA; VALLE, 2007). É considerada uma das culturas perenes mais importantes do planeta, com uma produção mundial estimada superior a 400 mil toneladas na safra 2012-2013 (ICCO, 2013). Esta espécie é explorada principalmente para a produção de chocolate, entretanto, também pode ser utilizada na produção de cosméticos, bebidas, geleias, cremes e sucos (ALMEIDA; VALLE, 2007). Sua propagação pode ser realizada por meio de sementes (sexuada) ou vegetativa (assexuada) (MONTEIRO; AHNERT, 2012). No Brasil possui dois períodos de produção: safra temporã (março a agosto) e safra principal (setembro a fevereiro). A produção brasileira de cacau é estimada em 220 mil ton (ICCO-2012). Sendo, hoje, o quinto maior produtor de cacau, atrás dos Estados Unidos, da Alemanha e do Reino Unido. Além disso, existem esforços na Bahia para produzir cacau fino e isso se mostra uma tendência mundial para outros lugares com ambientes semelhantes, constituindo, assim, uma grande oportunidade para a expansão deste cultivo (ARGOUT et al., 2011).

As variedades cultivadas de *T. cacao* pertencem a três principais grupos: 'Crioulo', 'Forasteiro' e 'Trinitário', que são classificados de acordo com suas características genéticas e origens geográficas (BARTLEY, 2005). O grupo 'Crioulo', altamente aromático, suscetível a pragas e doenças e de baixa produtividade. Estima-se que menos de 1% do mercado cacaueiro é abastecido pelo cacau 'Crioulo'. Este grupo é cultivado da América do Sul até o México, sendo considerado o primeiro grupo de cacau domesticado, que produz frutos grandes com casca enrugada, sementes com interior branco ou violeta pálido e que fornece o cacau de alta qualidade (ALMEIDA; VALLE, 2007; CUATRECASAS, 1964). Acredita-se que foram as primeiras árvores de *T. cacao* domesticadas pela civilização maia (HEBBAR et al., 2011).

O grupo 'Forasteiro' é mais cultivado mundialmente, devido à sua resistência a pragas e à grande produção anual, sendo responsável pelo abastecimento de 85%

do mercado. Este grupo possui frutos contendo sementes de sabor amargo, pouco aromáticas e, por esse motivo, não são valorizadas pela chocolataria fina. O 'Forasteiro' está limitado mais ao Oeste da Cordilheira do Andes, do norte do Brasil até as Guianas, e é considerado o verdadeiro cacau brasileiro, possui frutos ovoides, com casca lisa e sementes com seu interior com cor violeta escuro (ROSÁRIO et al., 1978).

O terceiro grupo 'Trinitário' é um híbrido entre os grupos 'Crioulo' e 'Forasteiro', que combina as melhores características de seus predecessores. Dominando 14% do mercado de cacau, o 'Trinitário' possui a resistência do 'Forasteiro' e o aroma característico do 'Crioulo'. A hibridização natural ocorreu na ilha de Trinidad e Tobago, após surgirem problemas numa lavoura de cacauzeiros 'Crioulo'. Devido a doenças e situações climáticas desfavoráveis, sementes de 'Forasteiro' foram plantadas na mesma área e acabaram cruzando com as sobreviventes de 'Crioulo' (DIAS; KAGEYAMA, 1997).

*T. cacao* exibe grande variabilidade genética em suas características morfológicas e fisiológicas (DAYMOND et al., 2002). O clone SCA-6, por exemplo, originário do Peru, considerado um genótipo do tipo selvagem, possui alelos de resistência às doenças fúngicas vassoura-de-bruxa e podridão-parda, apresenta frutos e sementes pequenas (<1g), cujo número varia entre frutos. 'Catongo' é uma cultivar originária na Bahia, proveniente do 'Cacau Comum', introduzido na região em 1746, vindo do Pará. Apresenta frutos e sementes de tamanho médio (~1g), em relação a outros genótipos. Trata-se de uma cultivar com mutação natural para o albinismo do cacauzeiro, com alterações para as antocianinas, pigmentos vacuolares vermelhos escuros que dão cor às folhas jovens e aos frutos de *T. cacao* (NETO et al., 2005).

Para identificar genótipos com alta capacidade geral de combinação quanto à resistência à vassoura-de-bruxa, que tem como agente causal o fungo *Moniliophthora perniciosa*, Midlej Silva et al. (2010) observou que os genótipos SCA-6 e CCN-10 apresentam elevada resistência a este fungo. Para avaliar os efeitos do alagamento no crescimento e na nutrição mineral de seis clones de *T. cacao*, Rehem et al. (2009) observaram que o genótipo CCN-10 alcançou uma posição

intermediária em relação à tolerância ao alagamento em comparação com os outros clones avaliados. Logo, espera-se que as progênies F1, resultantes do cruzamento desses genótipos (CCN-10 x SCA-6), sejam um material genético de elevada resistência a diversos estresses bióticos e abióticos, por apresentarem alto grau de heterozigose; ao passo que as progênies F1, resultantes da autofecundação de 'Catongo' x 'Catongo', sejam, conseqüentemente, mais homozigotas e contrastantes com as de CCN-10 x SCA-6 e mais intolerantes aos estresses bióticos e abióticos.

## 2.2. Fertilizantes Fosfatados

As rochas fosfatadas são usadas como matéria prima para a produção dos fertilizantes fosfatados. Entretanto, em sua composição mineralógica, encontram-se, além de P, diversos outros elementos metálicos contaminantes, dentre eles o Cd, em variadas concentrações, sendo, portanto, as maiores fontes de contaminação de Cd em solos agrícolas (PROCHNOW et al., 2001; GABE; RODELLA, 1999; LAEGREID, 1999; MORTVEDT, 1987). Aplicações sucessivas de fertilizantes fosfatados incrementam as quantidades de Cd em solos e plantas, causando impactos ao ambiente devido a sua alta toxicidade ao homem, aos animais e às plantas (BIZARRO et al., 2008; LOGANATHAN et al., 1997).

O aumento na concentração de Cd em plantas pode ocorrer em função do uso de fertilizantes fosfatados na agricultura (DICKINSON; PULFORD, 2005). O seu uso intensivo na agricultura tropical se deve ao fato de que P pode limitar a produtividade das culturas. Além disso, em agroecossistemas há perda constante deste nutriente, pela exportação de alimentos e fibras, sendo necessária sua reposição via adubação (BOEIRA et al., 1995). Assim, a adubação fosfatada é considerada uma das principais causas da presença de Cd nos alimentos e na dispersão no ambiente (DICKINSON; PULFORD, 2005).

## 2.3. Metais tóxicos

Os metais pesados são elementos metálicos com densidade superior a 5 g cm<sup>-3</sup>, que possuem a capacidade de exercer efeitos tóxicos em células microbianas e em outras formas de vida (TAN, 2000). Ocorrem de forma natural no ambiente,

porém, a ação antrópica tem provocado considerável aumento desses elementos nos ecossistemas (SEBASTIAN, 2004). Os metais tóxicos tem sido um dos principais agentes de estresse abiótico para os organismos vivos, devido ao crescente uso nas indústrias, em agroquímicos e por sua elevada bioacumulação e toxicidade (MAKSYMIEC et al., 2007). As descargas de resíduos industriais que contêm Cd, Pb, Cu e Cr constituem um risco para a vida aquática, animais e seres humanos, devido à contaminação do ar, do solo, dos sedimentos, da vegetação e da água (YANG et al., 2004). A presença destes elementos metálicos no ambiente, em quantidades excessivas, pode causar sérios problemas para todos os organismos (BENEVIDES et al., 2005).

O impacto ambiental causado pela adição de metais pesados ao solo depende, fundamentalmente, de três processos, os quais controlam o destino e a biodisponibilidade de metais nos solos: (a) remoção dos metais da solução do solo por meio da adsorção aos colóides do solo; (b) liberação dos metais das partículas do solo por dessorção; e (c) dissolução-precipitação do metal como fase independente da matriz do solo. As pesquisas evidenciam que características do solo como (i) pH; (ii) potencial de oxirredução; (iii) força iônica; (iv) textura; (v) presença de cátions, competindo pelos mesmos sítios de adsorção; (vi) e os teores de matéria orgânica e óxidos de Fe e Al são os principais fatores que influem na adsorção-dessorção de Cd nos solos (NAIDU et al., 1994; CHRISTENSEN, 1989). Assim, a biodisponibilidade dos metais pesados depende de sua concentração na solução do solo, (SOUZA, 2009; COSIO et al., 2005; PATRA et al., 2004). Sendo o pH um dos fatores mais importantes no controle dessa concentração dos metais pesados (YAP et al., 2009). Em pH ácido, a dessorção de Cd é favorecida, pois íons  $H^+$  podem deslocar uma fração do metal adsorvido em forma não-trocável (WANG; XING, 2002).

#### 2.4. Cádmio (Cd)

Descoberto em 1817 por Stromeyer como uma impureza do carbonato de zinco, o Cd, que pertence ao grupo II B da tabela periódica juntamente com Zn e Hg, tem sido classificado em sétimo lugar na lista dos 20 compostos mais tóxicos

existentes na natureza (AL-KEDHAIRY et al., 2001). Este elemento metálico é amplamente utilizado em processos industriais. Logo, o desenvolvimento, de grande parte dos empreendimentos, veio acompanhado da poluição por deposições de Cd em esgotos e rios e armazenamento de dejetos sem o devido tratamento. Além disso, o Cd tem contaminado rios por meio de escoamento da água da chuva, e, com isso, tem-se observado aumento do número de incidentes de envenenamento por Cd no mundo inteiro. Embora emissões para o ambiente tenham diminuído na maioria dos países industrializados, este metal tóxico continua a ser uma fonte de preocupação para a população em geral, especialmente nos países menos desenvolvidos (BERNARD et al., 2008).

Após a absorção pelo ser humano, o Cd é rapidamente transportado no sangue para vários órgãos do corpo (JIN et al., 1998), onde é irreversivelmente bioacumulado, principalmente nos rins, pulmões e fígado (BERNARD et al., 2008). Além de suas notáveis propriedades bioacumulativas, Cd tem sido relacionado a uma série de doenças em mamíferos, como insuficiência renal, imunodepressão e vários tipos de cânceres (NORDBERG et al., 2007). A intoxicação aguda por Cd está associada aos efeitos gastrointestinais, ao comprometimento das funções hepática e renal e às lesões pulmonares. A intoxicação crônica por Cd pode levar a enfisemas (LAUWERYS et al., 1974) e às lesões renais e ósseas (JIN et al., 2004). Além disso, Cd é um inibidor da topoisomerase I do DNA e é considerado um agente mutagênico (WU et al., 2011). Em estudos realizados por Fowler et al. (2009), observou-se que o maior risco de câncer para a população se concentra nas regiões poluídas por Cd. Embora os mecanismos responsáveis por tais alterações moleculares ainda necessitem de estudos mais aprofundados, a ação do Cd pode ter uma herança não-genotóxica, ou com base epigenética envolvendo metilação do DNA (JIANG et al., 2008; BENBRAHIM-TALLAA et al., 2007; WAISBERG et al., 2003; WAALKES; MISRA, 1996).

Entre os metais tóxicos, o Cd é considerado um poluente ambiental de significativa importância devido à sua elevada solubilidade em água e toxidez, tanto para plantas quanto para animais (MOULIS, 2010; UNTERBRUNNER et al., 2007). Durante o intemperismo, o Cd passa facilmente para a solução do solo. Embora seja conhecida sua ocorrência como  $Cd^{2+}$ , pode também formar muitos íons complexos

como  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdOH}^+$ ,  $\text{CdHCO}_3^+$ ,  $\text{CdCl}_4^{2-}$ ,  $\text{CdCl}_3^-$ ,  $\text{CdCl}_4^{2-}$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$  e quelatos orgânicos (KABATA-PENDIAS et al., 2001). No solo, o Cd apresenta-se, principalmente, na sua forma disponível, trocável, sendo facilmente absorvido pelas plantas e causador de fitotoxicidade (SOARES et al., 2005). São considerados solos poluídos por Cd aqueles que apresentam concentrações acima de  $0,5 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ . Calcula-se que as emissões antropogênicas de Cd se situam em torno de 30.000 toneladas por ano (SANITÀ DI TOPPI; GABRIELLE, 1999). Entretanto, esse elemento metálico também pode se apresentar complexado à matéria orgânica; formando complexos de superfície com óxidos, diminuindo sua mobilidade no solo; bem como formar complexos com ligantes orgânicos de baixo peso molecular, potencializando sua solubilidade (COSTA, 2005).

### *2.5. Estresse oxidativo em plantas*

A dinâmica do estresse envolve um processo de desestabilização celular, proporcionado por alguma adversidade, biótica ou abiótica, e como resposta ocorre o desenvolvimento de mecanismos de resistência e recuperação. De acordo com o conceito dinâmico de estresse, o organismo sob pressão do ambiente passa por uma série de fases características (LARCHER, 1995). A fase de alarme se caracteriza pelo início da perturbação, seguida pela perda da estabilidade de estruturas e das funções que mantém as atividades celulares vitais em perfeito funcionamento. Entretanto, caso ocorra uma intensificação muito rápida dos efeitos do estresse, antes que a espécie vegetal tenha tempo para aperfeiçoar as medidas de defesa, ocorrem sérios danos na integridade celular. Essa fase de alarme se inicia como uma reação ao estresse, fase em que as reações de catabolismo predominam sobre as de anabolismo (LARCHER, 1995).

Há casos em que o agente estressor não provoca grandes danos no organismo, nesse momento os processos de reparação, tais como síntese de proteínas ou substâncias de proteção são rapidamente iniciados. Esta situação leva para uma fase de resistência, em que se observa no organismo sob pressão um incremento da resistência, devido à estabilização dos processos metabólicos (adaptação). A resistência pode permanecer elevada durante algum tempo após a ocorrência do estresse. Se o estado ou a intensidade do estresse ocorrer por um período muito longo é possível que ocorra a exaustão das reservas das células,

deixando a planta susceptível a infecções que ocorrem como consequência da redução de defesas do hospedeiro, podendo levar a planta a morte. No entanto, se a ação do estressor é apenas temporária, o “status” funcional é restaurado ao seu nível original (REHEM et al., 2009; LARCHER, 1995).

EROs desempenham um papel vital nos processos de sinalização intracelular, ativando os mecanismos de resistência antioxidante. Porém, durante o estresse oxidativo, há um excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), cujo metabolismo antioxidativo existente não é capaz de eliminar, podendo, assim, atingir e modificar quase todas as moléculas orgânicas, gerando sérios danos às células e aos tecidos (BULBOVAS et al., 2005). Por outro lado, as plantas podem mobilizar enzimas e substâncias antioxidantes para protegê-las contra o excesso ou a produção inapropriada de EROs. Sob condições normais, defesas antioxidantes como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidases, S-transferase da glutationa (GST) e o complexo P450 impedem a formação de EROs ou inativam àquelas já presentes. Assim, trata-se de uma forma de resposta à tentativa de sobrevivência das plantas para controlar a concentração de EROs (MAZID, 2011). A geração de excesso de EROs em diferentes locais, nas células dos tecidos vegetais (mitocôndrio, cloroplastos, peroxissomos e núcleos), causam injúrias e morte celular.

## 2.6. Alterações anatômicas induzidas por Cd e outros metais tóxicos

Estudos evidenciam que o estresse por Cd pode afetar fortemente a morfologia dos órgãos clorofilianos e diminuir o número de vasos e diâmetro do xilema em folhas maduras. Além disso, no sistema radicular provoca alterações na endoderme, apresentando-se duplicada com camadas separadas, limitando a entrada de água (DELMAILA et al., 2011). O estudo das mudanças estruturais nas células é essencial para o entendimento dos mecanismos de tolerância da fitotoxicidade de Cd em plantas. Alterações anatômicas e estruturais em tecidos de plantas estão relacionadas à toxicidade por Cd, sendo as mais evidentes as alterações em cloroplastos (VOLLENWEIDER et al., 2005; SANDALIO et al., 2001).

Cunha et al. (2008) com o objetivo de verificar os efeitos de diferentes concentrações de cádmio no solo (0, 1, 3, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>) no crescimento, na



estrutura, e a localização celular do Cd em folhas de plantas de milho (*Zea mays* L.), observaram que nas células do mesofilo o Cd se armazenou na endoderme. O autor ressalta que a imobilização do Cd na endoderme é dependente da concentração do metal e é importante para evitar transporte de Cd para as células da bainha do feixe, local onde há maior atividade fotossintética. Com esse estudo os autores concluíram que a capacidade de acumulação de Cd depende, dentre outros fatores, do tecido considerado. O colênquima do aploplasto apresentou a maior concentração de Cd seguido pela endoderme, xilema e epiderme. Com base nas alterações estruturais e de redução do crescimento, a concentração crítica de Cd tóxico do solo para as plantas de milho está entre 5 e 10mg kg<sup>-1</sup>.

Em estudo realizado com a espécie *Polygonum ferrugineum*, submetida a concentrações crescentes de Cd em solução nutritiva, observou-se alterações na nervura central da folha e na raiz numa concentração de 50 mg Cd L<sup>-1</sup>. Além disso, nesta mesma concentração de Cd, verificaram, também, em nível foliar, acréscimos de tricomas glandulares e compactação do mesofilo (SOUZA et al., 2009). Em caule de *Alternanthera philoxeroides* também cultivada em solução nutritiva, verificou-se que os núcleos das células do córtex se apresentaram em formato elíptico na concentração correspondente a 50 mg Cd L<sup>-1</sup>. Houve, ainda a diminuição de drusas nas células da nervura central da folha em 25 e 50 mg Cd L<sup>-1</sup> em relação ao controle (SOUZA et al., 2009).

Em experimento realizado por Reis et al. (2013) com as progênies oriundas do cruzamento entre CCN-10 x SCV-6 a autofecundação de 'Catongo' x 'Catongo' submetidas a estresse por chumbo (Pb) via seminal, observou-se, em nível tissular, que o Pb provocou um aumento nos espaços intercelulares do parênquima lacunoso no mesofilo foliar de plântulas de 'Catongo' (REIS et al., 2013). Em outro estudo realizado com as mesmas progênies citadas, porém submetidas à fitotoxidez por Alumínio (Al), também via seminal, as análises anatômicas do mesofilo foliar demonstraram que não houveram efeitos intraprogênies significativos de doses de Al<sup>3+</sup> sobre a espessura da epiderme, nas faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab); dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL); e do mesofilo (M), com diferenças apenas interprogênies. A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou os maiores valores

para as espessuras de Ead, PP, PL e M em relação ao 'Catongo' x 'Catongo' (ALMEIDA et al., 2013).

## 2.7. Alterações Ultraestruturais induzidas por Cd

Há extensa literatura sobre a toxicidade de Cd em diversas espécies vegetais, principalmente em espécies de ciclo curto enfatizando as alterações moleculares, morfológicas, bioquímicas e ultraestruturais provocadas por esse elemento (GRECO et al., 2012; DELMAILA et al., 2011; FUSCONI et al., 2006; BENAVIDES et al., 2005; COSIO et al., 2005; AL-KEDHAIRY et al., 2001). No entanto, poucos estudos descrevem as alterações estruturais e ultraestruturais induzidas por Cd em plantas. Além disso, há deficiência de pesquisas relacionadas à fitotoxidez de Cd em plantas seminais de *T. cacao*.

Dentre os principais efeitos ultraestruturais causados pelo Cd em plantas destacam-se: (i) aumento do número de nucléolos e de vacúolos; (ii) condensação do citoplasma; (iii) redução das cristas mitocondriais; (iv) plasmólise celular; (v) condensação da cromatina; (vi) aumento de vacúolos; (vii) desorganização da estrutura do cloroplasto; (viii) e rompimento do envoltório nuclear (DAUD et al., 2009; BENAVIDES et al., 2005; VITORIA et al., 2003; KUPPER et al., 2000). O aumento do número de nucléolos é um indicativo de grande produção de ribossomos e de mRNA, e, conseqüentemente, da intensificação da produção de novas proteínas. Isto, por sua vez, pode estar envolvido com mecanismos de tolerância aos metais pesados (SRESTY et al., 1999).

A compartimentalização de Cd no apoplasto das regiões apicais das raízes pode ser provocada pela capacidade do Cd de se ligar aos componentes da parede celular (PARAMONOVA et al., 2003). Em estudo realizado com *Mesembryanthemum crystallinum*, observou-se que a ultraestrutura celular é caracterizada por um afrouxamento da lamela média, seguida de sua substituição por cavidades preenchidas com polissacarídeos amorfos de natureza pécticos (PARAMONOVA et al., 2003). Nesse estudo, os autores concluíram que a formação de complexos de Cd, com pectinas no apoplasto, é um dos mecanismos mais importantes de proteção

da planta para a desintoxicação de concentrações elevadas de Cd acumulado pelas células de raiz.

## 2.8. Mecanismos de tolerância ao Cd

Há evidências de que plantas que conseguem crescer em ambientes contaminados com determinado metal pesado, foram selecionadas durante o processo evolutivo e se apresentam com estratégias de escape ou tolerância a toxicidade do metal (PATRA et al., 2004). Existem espécies que desenvolvem tolerância a metais em um período relativamente curto de cerca de 30 anos (HALL, 2002). Isso ocorre porque as plantas apresentam grande capacidade de adaptar ou aclimatar seu metabolismo às rápidas mudanças no ambiente (XIONG et al., 2009; KOPYRA; 'Z'DZ' GWO 2004; TURNER et al., 2002). Há uma variedade de mecanismos complexos, para tolerância a metais em plantas, sugerindo que essas estratégias servem para controlar a absorção e o acúmulo de metais pesados (HASAN et al., 2009).

Diferentes espécies vegetais mostram capacidade variável para acumular Cd em relação à concentração encontrada no substrato em que crescem (VASSILEV et al., 2002). Mesmo entre as cultivares da mesma espécie, há uma ampla variação na absorção e translocação de Cd. Em experimento realizado com uma espécie halófita submetida a diferentes concentrações de Cd (*Mesembryanthemum crystallinum*), concluiu-se que a resistência ao estresse causado pelo metal foi alcançada pela sua acumulação predominante nas raízes, onde o excesso de Cd é compartimentalizado no apoplasto e pode ser submetido à desintoxicação por meio da formação de pectato. Além disso, as folhas e, principalmente, as raízes são caracterizados por possuírem uma elevada atividade dos sistemas antioxidativos, tais como peroxidases do guaiacol, na ocorrência de baixas concentrações de Cd (SHEVYAKOVA et al., 2003). Alguns estudos mostram que as espécies tolerantes a metais possuem mecanismos de defesa ligados a antioxidantes celulares e a enzimas antioxidantes, que protegem as rotas vitais de processos fisiológicos contra danos resultantes de acúmulo de EROs (PANDA; CHOUDHURY, 2005). Quando estes sistemas estão sobrecarregados, os mecanismos de defesa ao estresse oxidativo são ativados (PATRA et al., 2004).

A quelação de íons metálicos por um ligante específico de alta afinidade diminui a concentração dos íons livres na solução. Os principais ligantes associados a metais encontrados em tecidos vegetais são: aminoácidos, oligo e polipeptídios (glutaciona, fitoquelatinas e metalotioneínas), agentes macrocíclicos (porfirinas, cobalaminas e clorofilas), polissacarídeos e glicosídeos (ramnogalacturonana), nucleobases, oligo-polinucleosídeos e nucleotídeos (fragmentos de DNA) (PATRA et al., 2004). O acúmulo de fitoquelatinas em células vegetais expostas ao Cd tem sido relatado em diversas espécies como proteção ou mecanismo de tolerância ao efeito do estresse (PIETRINI et al., 2010; SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002). A compartimentalização de Cd e acúmulo de fitoquelatinas ocorrem em nível do vacúolo contribuindo para a proteção da toxicidade de metais pesados em várias espécies vegetais (SCHÜTZENDÜBEL; POLLE, 2002).

Existem diversos mecanismos de tolerância ou resistência ao Cd em plantas, tais como: (i) excreção de compostos quelantes, que reduzem a disponibilidade do metal no solo ou na água; (ii) a exclusão do metal por meio da absorção seletiva de elementos; (iii) a retenção do metal nas raízes, impedindo a sua translocação para a parte aérea; (iv) a quelação ou seqüestro de metais pesados por ligantes, biotransformação, compartimentalização e mecanismos de reparo celular; (v) o desenvolvimento de enzimas tolerantes ao metal; (vi) o aumento da produção de compostos intracelulares ligados ao metal; (vii) a imobilização do metal na parede celular; (viii) os mecanismos celulares homeostáticos, para regular a concentração de íons metálicos no interior da célula; (ix) a indução de proteínas de choque térmico; (x) a liberação de fenóis a partir de raízes; (xi) o aumento na expressão de proteínas relacionadas ao estresse; (xii) o aumento na absorção de determinados macronutrientes; e (xiii) a expressão de genes que codificam para enzimas com capacidade de absorver e utilizar minerais na presença de metais pesados. Como resultado desta tolerância e, ou mecanismos de resistência (isolado ou em combinação com outros elementos) algumas plantas podem crescer em ambientes contaminados por metais, quando outras espécies não sobreviveriam (GOMES et al., 2012; ALMEIDA et al., 2010; BENAVIDES et al., 2005; COSIO et al., 2005; HECKATHORN et al., 2004; PATRA et al., 2004; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2000; HALL, 2002).

## 2.9. Expressão gênica em plantas submetidas a estresses por metais tóxicos

Análises de transcriptoma indicam que a expressão de muitos genes é regulada por EROs (ANDRADE et al., 2006). Os antioxidantes incluem genes que codificam para o resgate de proteínas de células de defesa e proteínas de sinalização (HASSINEN et al., 2011). A dismutase do superóxido (SOD) é uma das principais enzimas eliminadoras dos radicais livres, juntamente com as enzimas peroxidase do guaiacol (GPX), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutatona (GR) (HASSINEN et al., 2011; MILLER et al., 2008). Elementos metálicos, a exemplo do Cd, ativam, também, a formação de fitoquelatinas (PCs) e metalotioneínas (MTs), as quais possuem a função de sequestro de metais pesados (HASSINEN et al., 2011; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; PAL et al., 2010).

PCs são produzidos enzimaticamente a partir do precursor de GSH tri-peptídeo (-Glu-Cys) n-Gly, onde n = 2-11 (INOUE et al., 2005). Devido à presença de grupos de *Cys thiolic*, as PCs quelam Cd e formam complexos com vários pesos moleculares de cerca de 2.500-3.600 Da, protegendo o citosol dos efeitos maléficos de íons Cd livres e, eventualmente, sequestrando Cd no vacúolo (ERNST et al., 2008; CLEMENS, 2006; SCHAT et al., 2002; COBBETT, 2000). Em resposta a metais pesados, tem-se observado o acúmulo de PCs (LEE; KORBAN, 2002; RAUSER, 1999; NOCTOR et al., 1998). As sintetases da fitoquelatina (PCS), por sua vez, são constitutivamente expressas, mas requerem a ativação pós-tradução de metais, sendo Cd um dos ativadores mais eficazes (VERBRUGGEN et al., 2009; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2000). Em *Arabidopsis thaliana*, o mRNA de PCS aumentou em função da presença de Cd (SEMANE et al., 2007). Nas raízes de *Hordeum vulgare* (uma espécie não tolerante a metais) os complexos Cd-fitoquelatina somaram 34-50% da fração solúvel (PERSSON et al., 2006), enquanto que em espécies tolerantes ao metal, como *Sedum alfredii* e *Noccaea caerulescens*, a maior quantidade de Cd esteve presente na parede celular / apoplasma do que na fração solúvel / vacúolo (REDJALA et al., 2009; NI; WEI, 2003).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus, BA. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal, Centro de Biotecnologia e Genética (CBG) e Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UESC. Foram utilizadas duas progênies de *T. cacao*, contrastantes para a tolerância a diversos tipos de estresses como alagamento, salinidade, seca, doenças, dentre outros (MIDDLEJ SILVA et al., 2010; REHEM et al., 2009), oriundas do cruzamento entre CCN-10 x SCA-6 e da autofecundação de ‘Catongo’ [(‘Catongo’ x ‘Catongo’)], as quais foram obtidas via polinização controlada no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Cacau, do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC), da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC).

Sementes provenientes de frutos fisiologicamente maduros, resultantes de ambas as progênies, foram previamente limpas, friccionando as sementes com pó de serra, para eliminar a mucilagem; seguida da remoção do tegumento, para que todos os seus tecidos ficassem expostos ao metal quando em solução. Em seguida, as sementes foram totalmente imersas, durante 24 h, em diferentes concentrações de Cd (0, 2, 4, 8, 16 e 32 mg L<sup>-1</sup> Cd) em solução, tendo como fonte CdCl<sub>2</sub> . 5/2 H<sub>2</sub>O.

Período de 24 h de embebição das sementes (momento em que havia sido exaurido todo oxigênio dissolvido em solução (dados não mostrados), o que poderia desencadear a respiração anaeróbica ou fermentação e interferir nos resultados experimentais); No período em que já se observava a protrusão da raiz (cerca de 2 mm de comprimento), iniciou-se o plantio das sementes em tubetes plásticos pretos cônicos de 235 cm<sup>3</sup>, contendo como substrato orgânico fibra de coco + casca de *Pinus* na proporção de 1:1. Durante o período experimental, as plântulas foram irrigadas diariamente e adubadas semanalmente, com 4 g de Fosfato monoamônico, 3 g de Uréia e 3 g de KNO<sub>3</sub> para 5 mL de água, por tubete.

### 3.1.1 Coleta de material vegetal para análise

Aos 60 dias após a emergência das plântulas, época em que as reservas cotiledonares foram totalmente exauridas e inicia-se a queda dos cotilédones, foram coletadas raízes primárias, caule e a 2ª ou 3ª folha madura a partir do ápice do eixo ortotrópico das plântulas das progênes de *T. cacao* avaliadas. O material coletado foi utilizado para análise da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo; das alterações anatômicas e ultraestruturais, em níveis tissular e celular, respectivamente; da expressão gênica; e das concentrações de macro (P, K, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Mn, Fe, Cu e Zn) minerais e Cd.

### 3.2 Determinação da atividade de peroxidase do guaiacol (EC 1.11.1.7)

Foram coletadas 10 amostras de folhas e 6 de raízes de cada progênie e tratamento. Imediatamente as folhas, foram imersas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), armazenadas em ultrafreezer (- 80°C) e, posteriormente, liofilizadas. As amostras de folhas liofilizadas foram maceradas em N<sub>2</sub> até que apresentassem uma consistência de pó fino, e transferidas para microtubos de 2 mL. Em seguida, adicionou-se tampão fosfato de sódio às folhas maceradas (50 mM, pH 6,0), na proporção 1:20 (macerado:tampão). Essas amostras ressuspensas com tampão foram sonicadas durante 1 min e 20 s, com pulsos de 05 s *on* e 10 s *off* e amplitude de 60 %, com posterior centrifugação por 15 min a 13000 x g. O sobrenadante (extrato bruto) foi coletado e transferido para microtubos de 1,5 mL. Os extratos foram, então, utilizados no preparo da reação de ativação enzimática e lidos em espectrofotômetro de placa para avaliar a atividade da peroxidase do guaiacol (GPX).

A reação básica de ativação da atividade de GPX consistiu em 140 µL de solução de guaiacol (20 mM): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03 % v/v) em tampão fosfato (10 mM), 90 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 6) e 50 µL do extrato bruto. As amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços: tampão, extrato bruto e a solução de guaiacol: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi acompanhada colorimetricamente a 470 nm em espectrofotômetro de microplaca (VERSAmax). A leitura foi realizada por 100 s e o valor de consumo de guaiacol foi expresso em µmol s<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tecido liofilizado,

utilizando a fórmula:  $y = 0,0189 + 0,1284 x$  ( $R^2 = 0,99$ ), originada a partir da curva padrão para GPX-guaiacol (REHEM et al., 2011).

### 3.3 Microscopia Fotônica

Para microscopia fotônica, foram retiradas amostras de tecidos da região mediana da folha madura, nas plântulas de ambas as progênies de *T. cacao*, oriundas de sementes, controle e submetidas às concentrações de 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>. Essas concentrações foram selecionadas dentre as trabalhadas neste estudo, porque em outro estudo que também trabalhou com fitotoxidez por Cd não foram verificadas alterações em nível tissular para as outras doses de Cd (Souza et al. 2011). Imediatamente, o material vegetal foi fixado em glutaraldeído a 3 % e em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 6,9, durante 4 h. Posteriormente, as amostras foram transferidas para álcool a 50 % e estocadas a 4 °C em geladeira. Amostras de folha foram desidratadas em série butanólica (70, 80, 90 e 100%) e, em seguida, foram submetidas a butanol terciário a 100 % com trocas em 2, 4 e 1 h. Posteriormente, foram submetidas em butanol terciário + óleo de parafina (2 h), butanol terciário + parafina ½ troca (2 h), butanol terciário + parafina ½ troca (2 h) e parafina troca total (2 h). Logo após, fez-se o emblocamento, colocando os cortes fixados em parafina em caixinhas de papel. Em seguida, os bloquinhos de parafina contendo o material vegetal foram fixados em suporte de madeira e armazenados na geladeira. Posteriormente, o material vegetal fixado foi seccionado em micrótomo rotativo Leica, modelo RM 2145, com espessura de 10 µm, seguido da montagem dos cortes em lâminas de vidro e do processo de coloração com safranina e azul de astra a 1 % e montagem com lamínulas. Logo depois, as lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio Leica DM 500, para posterior medição dos tecidos foliares (espessuras da epiderme, nas faces abaxiais e adaxiais; dos parênquimas paliçádicos e esponjosos; e do mesofilo) por meio do software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal, Anati Quanti, versão 2, disponibilizado pela Universidade Federal de Viçosa. As medições foram realizadas em secções transversais provenientes de folhas de três plantas por tratamento e de dez campos por repetição, totalizando trinta medições por tratamento.



### 3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para microscopia eletrônica, foram retiradas amostras da região mediana de folhas maduras e de raízes primárias, nas plântulas de ambas as progênes de *T. cacao*, oriundas de sementes, controle e submetidas às concentrações de 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>. Para tanto, realizou-se a pré-fixação do material em glutaraldeído a 3% em solução tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 6,9, sob vácuo e, em seguida, procedeu-se a lavagem em tampão cacodilato a 0,1 M, pH 6,9; 6 x por um tempo de 15 min. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1 %, preparado no mesmo tampão, seguido de outras lavagens no mesmo tampão por 6 x. Para a desidratação, utilizaram-se séries etanólicas (30, 50, 70, 90 e 100 %). A embebição foi realizada em etanol / *LR White* (3:1, 1:1, 1:3 e resina pura por 3 x). A Inclusão foi feita em *LR White*, em capsula de gelatina. A polimerização ocorreu à temperatura entre 50 – 60 °C, por um período de 20h. Posteriormente, foram obtidas secções ultrafinas, com 70 nm de espessura, utilizando-se o ultramicrótomo Leica UC6, que, em seguida, foram depositados em grades de Cu de 300 mesh. Foram utilizadas 3 grades para cada tratamento com três cortes em cada. Posteriormente, as secções foram contrastadas com acetato de uranila a 3 %, durante 20 min, seguido por citrato de chumbo a 0,4 %, durante 5 min. Em seguida, foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) Morgagni™ modelo 268 D, operando com voltagem de aceleração de 80 kV; microprocessado e controlado por meio de plataforma Windows, equipado com câmera CCD. Logo após, as grades de Cu, contendo as amostras, foram fotografadas e as imagens analisadas.

### 3.5 Expressão gênica

Para as análises de expressão gênica, via *Real Time qRT-PCR*, foram utilizados *primers* gene-específicos relacionados a enzimas do estresse oxidativo: (i) *PER- 1*, associado à biossíntese de peroxidase da classe III; (ii) *Cu-Zn-SODcyt*, associado com a biossíntese de *SOD* citosólico; (iii) *MET*, associada à biossíntese do polipeptídeo metalotioneína; e (iv) *PC*, associada à biossíntese da sintase da fitoquelatina (Tabela 1).

O RNA de folhas e de raízes liofilizadas, oriundas das plântulas, de ambas as progênes de *T. cacao*, submetidas aos tratamentos controle, 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, foi

extraído utilizando-se o *kit RNAqueous* (Ambion®), segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, a pureza e integridade do RNA foram testadas por eletroforese em gel de agarose a 1 %. Em seguida, as amostras de RNA foram utilizadas para a síntese do cDNA com o *Revertaid H-Minus Reverse Transcriptase* (Fermentas), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando *primers* oligo d(T)15. As reações foram incubadas a 65 °C por 5 min, 37 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e 70 °C por 10 min. O PCR em tempo real quantitativo relativo (qPCR) foi realizado em um termociclador “Real Time PCR” (*Applied Biosystems*, modelo 7500), usando sequência de detecção (fluoróforo) não específica, *SYBR Green I*. A abundância de transcritos foi analisada por meio de *primers* específicos (Tabela 1), desenhados a partir da análise das sequências de genes conhecidas na biblioteca de *T. cacao*. Para testar a qualidade desses *primers*, a especificidade e a identidade dos produtos da transcrição reversa, os produtos da qPCR foram monitorados após cada PCR por uma curva de análise de produtos da reação, capaz de distinguir produtos de PCR gene-específico daqueles não-específico. A temperatura dos produtos de PCR foi elevada de 55 para 99 °C a uma taxa de 1 °C/5 s, e os dados resultantes foram analisados usando o *software LightCycler*. Apenas uma única banda, com um ponto de fusão característico, foi observada para cada amostra, indicando que a qPCR produziu um produto específico para os *primers* utilizados. Para confirmar que a qPCR produziu apenas o gene de interesse, os produtos do PCR foram separados e visualizados em gel de agarose a 1 %. Valores para o ciclo *Threshold* ( $C_T$ ) foram determinados usando o *software LightCycler*. Números da expressão relativa dos genes foram calculados como uma porcentagem do tratamento controle utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), usando o gene da  $\beta$ -Tubulina (Tabela 1) como endógeno (referencial), a fim de detectar alterações na abundância de transcritos.

Tabela 1. Pares de *primers* gene-específicos utilizados nas análises de qRT-PCR.

Gene	Primer
<i>PER-1</i>	Forward; 5' CAGGTGTCGTGGGATCAAGA -3' Reverse; 5' TGGAAAACTACGCCAATATGC -3'
<i>Cu-Zn SOD<sub>Cyt</sub></i>	Forward; 5' GATGATGGCTGTGTGAGTTTCTCT- 3' Reverse; 5' CAACAACAGCTCTTCCAATAATTGA -3'
<i>MET</i>	Forward; 5' –GCAACCCTTGCACTTGTAATG – 3' Reverse; 5'–CAAGCCATGGCAACTTTATTCTAA– 3'
<i>PCS</i>	Forward; 5'- TTCAGGCACGGTAATTAGTAATGG- 3' Reverse; 5'- GGATGCATGCCACAACAATTAT -3'
<i>β –Tubulina</i>	Forward; 5'-TGCAACCATGAGTGGTGTTC A- 3' Reverse; 5'-CAGACGAGGGAAGGGAATGA- 3'

### 3.6 Análise de Macro e micronutrientes minerais e Cd

Para a análise de nutrientes minerais, foram coletadas dez plântulas de cada tratamento (0, 2, 4, 8, 16 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>). Em seguida, as plântulas de ambas as progênes de *T. cacao* foram lavadas em água de torneira (1 x), HCl a 3 % (1 x) e água destilada (2 x) e separadas em raiz, caule e folha. Após o processo de lavagem, os três órgãos foram colocados separadamente em sacos de papel e secos a 75 °C, em estufa com circulação forçada de ar, até massa constante. Posteriormente, o material vegetal seco foi triturado em moinho tipo Willey e armazenado em frascos de vidro tampados.

Para determinação dos nutrientes minerais, foram pesados 200 mg de cada amostra, com o uso de balança analítica. Logo após, as amostras foram colocadas em tubos de vidro (50 mL) e submetidas à digestão ácida em bloco digestor TECNAL, modelo TE-007MP. Para a digestão ácida, adicionou-se 4 mL de ácido nítrico concentrado, iniciando o aquecimento do bloco digestor e mantendo-se a temperatura a 50 °C por 30 min. Posteriormente, aumentou-se a temperatura para 80 °C, mantendo-a por 1 h. Após este período, a temperatura foi elevada e mantida a 130 °C por 2 h, foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio (30 %) em intervalos regulares de 20 min, totalizando mais 1 h de aquecimento. Ao final da

digestão, o material digerido foi transferido para tubos falcon de 15 mL, previamente descontaminados, completando-se o volume para 15 mL com água Milli-Q. Logo após, procedeu-se a determinação da concentração de macro (P, K, Ca, Mg e S), de micronutrientes minerais (Mn, Fe, Cu e Zn) e de Cd, utilizando-se a técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Varian, modelo 710 ES).

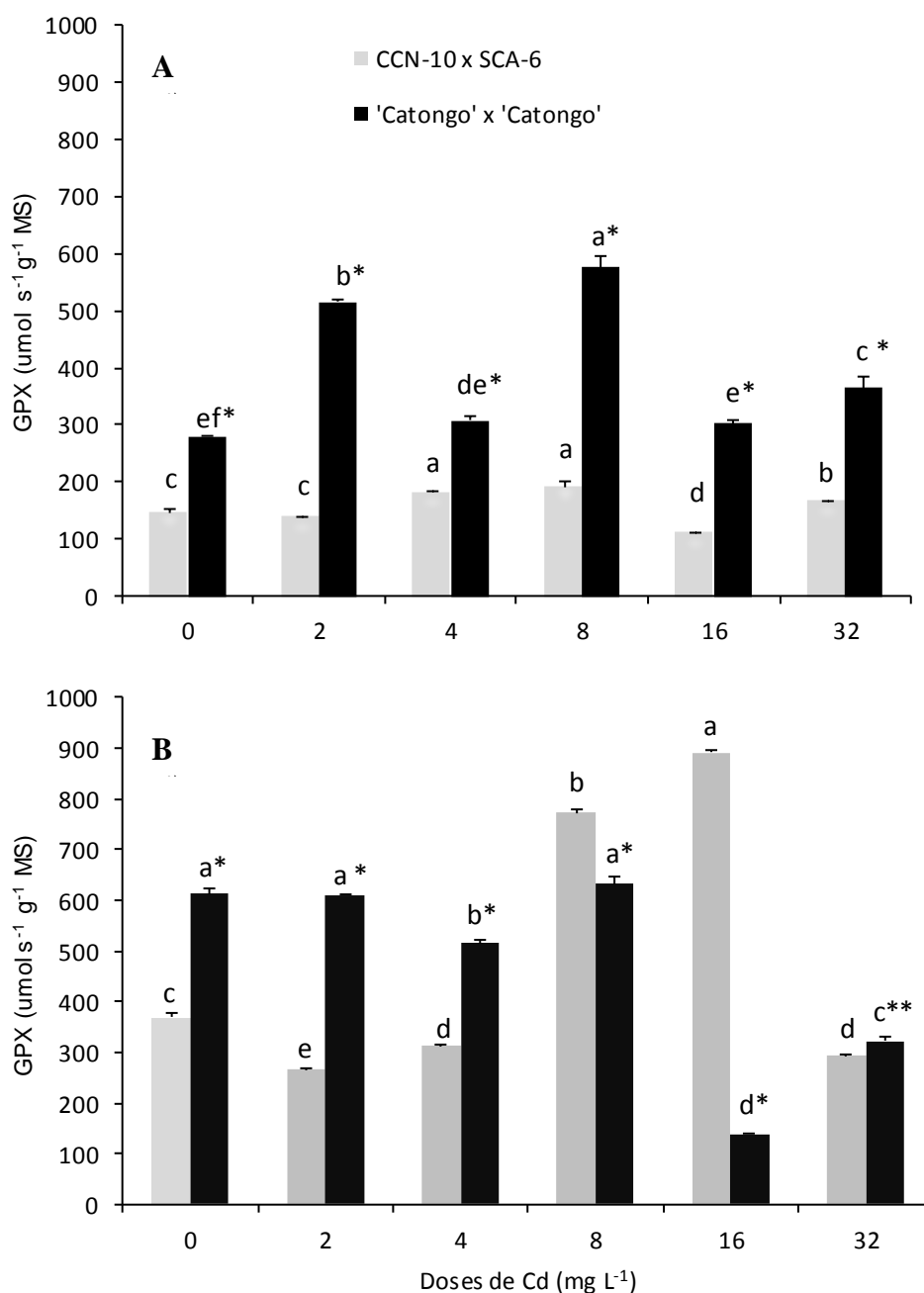
### 3.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, em arranjo fatorial 2 x 6, correspondentes a 2 progênies de *T. cacao* ('*Catongo*' x '*Catongo*' e CCN-10 x SCA-6) e 5 concentrações de Cd ( 2, 4, 8, 16 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>) + tratamento controle (sem Cd) e com um número variável de repetições (quatro para análise de atividade enzimática, três para análises anatômicas e ultraestruturais, nove para determinação da concentração de macro e micronutrientes minerais e seis para análise de expressão gênica) e uma plântula por unidade experimental. Fez-se análise de variância (ANOVA) e comparação de médias entre os tratamentos usando o teste Tukey (p<0,05) e teste-t (p<0,05). Além disso, foram efetuadas análises de regressão para macro e micronutrientes minerais.

## **4. Resultados**

### *4.1. Peroxidases do guaiacol (GPX)*

A progênie de 'Catongo' x 'Catongo' apresentou maior atividade da enzima peroxidase do guaiacol (GPX) em folhas quando comparada com CCN-10 x SCA-6. Para a progênie cujos aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) foram de 46%, 9%, 51%, 7% e 23%, para as concentrações de 2, 4, 8, 16 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente, em relação ao controle. (Figura 1 A). Por outro lado, em raízes de CCN-10 x SCA-6, ocorreu incremento na atividade de GPX em relação ao controle nas concentrações 8 mg Cd L<sup>-1</sup> (52%) e 16 mg Cd L<sup>-1</sup> (58%). Em contrapartida, 'Catongo' x 'Catongo' apresentou considerável redução na atividade de GPX em raízes, que correspondeu a 58% na concentração de 16 mg Cd L<sup>-1</sup>, em relação ao controle. Para as concentrações 2 e 8 mg Cd L<sup>-1</sup> em raízes de 'Catongo' x 'Catongo' não foram observadas diferenças significativas em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 1 B).



**Figura 1** - Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em duas progênies de *T. cacao* ('Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6), submetidas a diferentes concentrações de Cd via seminal, aos 60 dias após emergência das plântulas. Atividades em folhas (A) e raízes (B). A significância estatística interprogênies foi obtida por ANOVA seguida do t-test. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (n.s) não significativo. Médias intraprogênies seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores médios de quatro repetições ( $\pm$  EP).

#### 4.2. Microscopia fotônica

As análises anatômicas do mesofilo foliar de plântulas de *T. cacao*, de ambas as progênies, demonstraram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) inter e intraprogênies, com o aumento das doses de Cd aplicada via seminal, sobre a espessura da epiderme, nas faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab); dos parênquimas paliádicos (PP) e lacunosos (PL); e do mesofilo (M) (Tabela 2). A progênie 'Catongo' x 'Catongo' apresentou incrementos significativos ( $p < 0,05$ ) de 10 % e 9 % nas espessuras de Ead e Eab, respectivamente, para a concentração 8 mg Cd L<sup>-1</sup>, ao passo que na concentração 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, houve redução de 5% na espessura de Eab. Em relação à espessura de PP, ocorreu incremento de 27% em 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, enquanto que para PL houve redução da espessura de 45% em 8 mg Cd L<sup>-1</sup>. Em contrapartida, observou-se uma pequena redução na espessura do mesofilo foliar (M), que correspondeu a 8 e 2 %, nas concentrações de 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente. Por outro lado, para CCN-10 x SCA-6, verificaram a ocorrência de variações intraprogênies nas espessuras de Ead, Eab, PP, PL e M. Para Ead, observou-se incremento de 12 % e redução de 17 %, nas concentrações 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, para Eab houve um incremento de 11 % apenas na maior dose do metal, ao passo que PP apresentou reduções de 75 % e 66 %; PL de 23 % e 35 % e M de 20 % e 31 % nas doses correspondentes a 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Ocorreram também variações significativas ( $p < 0,05$ ) interprogênies para Ead, Eab, PP e PL. O percentual de redução para Ead foi de 17% em CCN-10 x SCA-6, na concentração de 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, quando comparado ao 'Catongo' x 'Catongo'. Entretanto, para Eab as reduções foram de 55% e 20%, nas concentrações de 8 e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, em CCN-10 x SCA-6, respectivamente, em relação ao 'Catongo' x 'Catongo'. Por outro lado, para PP ocorreu redução de 34 % na maior dose do metal em CCN-10 x SCA-6, quando comparado com 'Catongo' x 'Catongo'. Em contrapartida, houve incremento na espessura de PL de 22 % para CCN-10 x SCA-6, na concentração de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> em relação ao 'Catongo' x 'Catongo'.

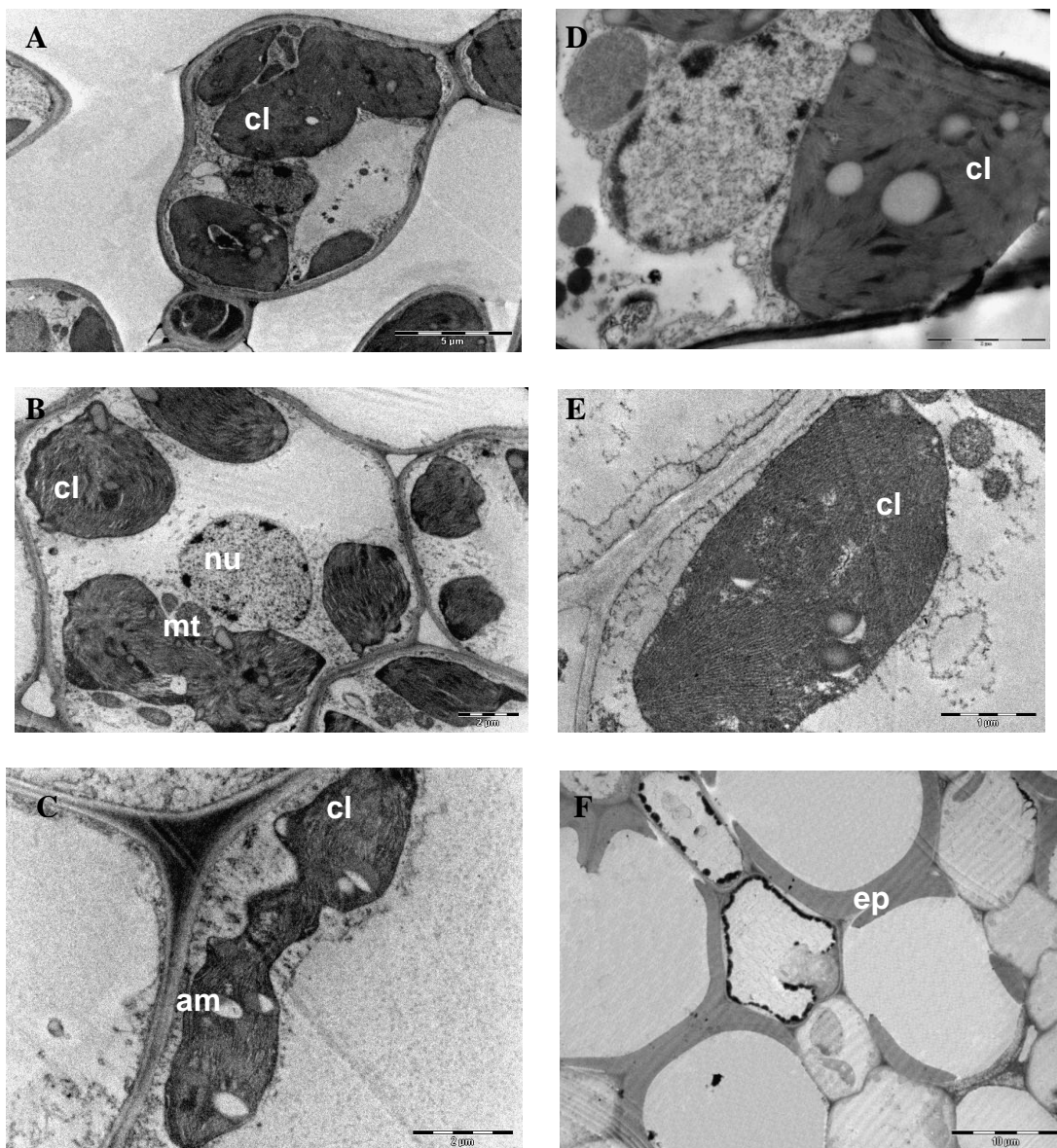
**Tabela 2** - Análise anatômica do mesofilo foliar de plântulas de progênes de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Cd aplicadas via seminal, 60 dias após a emergência das plântulas. A significância estatística interprogênes foi obtida por ANOVA seguida do t-test. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (n.s) não significativo. Médias intraprogênes seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores médios de três repetições ( $\pm$  EP). Ead- epiderme na face adaxial; Eab- epiderme na face abaxial; PP- parênquima paliçádico; PL-parênquima lacunoso; M- mesofilo total.

Progênie	Cd (mg L <sup>-1</sup> )	Ead ( $\mu$ m)	Eab ( $\mu$ m)	PP ( $\mu$ m)	PL ( $\mu$ m)	M ( $\mu$ m)
'Catongo' x 'Catongo'	Controle	19,4 $\pm$ 0,5 b (ns)	18,4 $\pm$ 0,43 b ***	20,8 $\pm$ 0,5 b ***	45,1 $\pm$ 1,0 a**	104,8 $\pm$ 0,7 a***
	8	21,7 $\pm$ 0,7 a (ns)	20,4 $\pm$ 0,40 a ***	19,1 $\pm$ 0,6 c (ns)	31,1 $\pm$ 1,9 b**	96,5 $\pm$ 3,6 b **
	32	20,0 $\pm$ 0,5 a ***	17,5 $\pm$ 0,39 c **	28,9 $\pm$ 0,6 a *	41,4 $\pm$ 1,4 ab*	102,6 $\pm$ 1,3 a***
CCN-10 x SCA-6	Controle	19,9 $\pm$ 0,6 b	13,0 $\pm$ 0,39 b	35,6 $\pm$ 0,7 a	49,3 $\pm$ 1,5 a	118,5 $\pm$ 2,7 a
	8	22,6 $\pm$ 1,1 a	13,1 $\pm$ 0,44 b	20,3 $\pm$ 0,9 c	39,9 $\pm$ 2,3 b	98,4 $\pm$ 1,3 b
	32	17,0 $\pm$ 0,7 c	14,6 $\pm$ 0,50 a	21,5 $\pm$ 0,6 b	36,4 $\pm$ 1,4 c	90,1 $\pm$ 1,7 c

#### 4.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na ausência de Cd, as progênes 'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6 apresentaram células do mesofilo foliar com aspecto normal, mantendo a integridade das membranas dos cloroplastos e núcleo, sem evidências de alterações (Figura 2 A e D, respectivamente). Porém, na presença do metal as progênes apresentaram mudanças nas ultraestruturas celulares do mesofilo foliar em função da concentração de Cd aplicada (Figuras 2B – C e 2E – F). A progênie 'Catongo' x 'Catongo' mostrou alterações estruturais dos cloroplastos tanto para a concentração de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> quanto para 32 mg Cd L<sup>-1</sup>. (Figura 2 B e C). Entretanto, na maior concentração do metal, observou-se aumento no teor de amido, em comparação com o controle, deformação do cloroplasto e dilatação de membranas tilacóidais. Por outro lado, nas células do mesofilo foliar de plântulas de CCN-10 x SCA-6, submetidas a concentração de 8 mg Cd L<sup>-1</sup>, não foram observadas alterações nos cloroplastos (Figura 2 E). Na concentração de 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, observou-se acúmulo de material eletrodense no parênquima lenhoso (Figura 2 F).

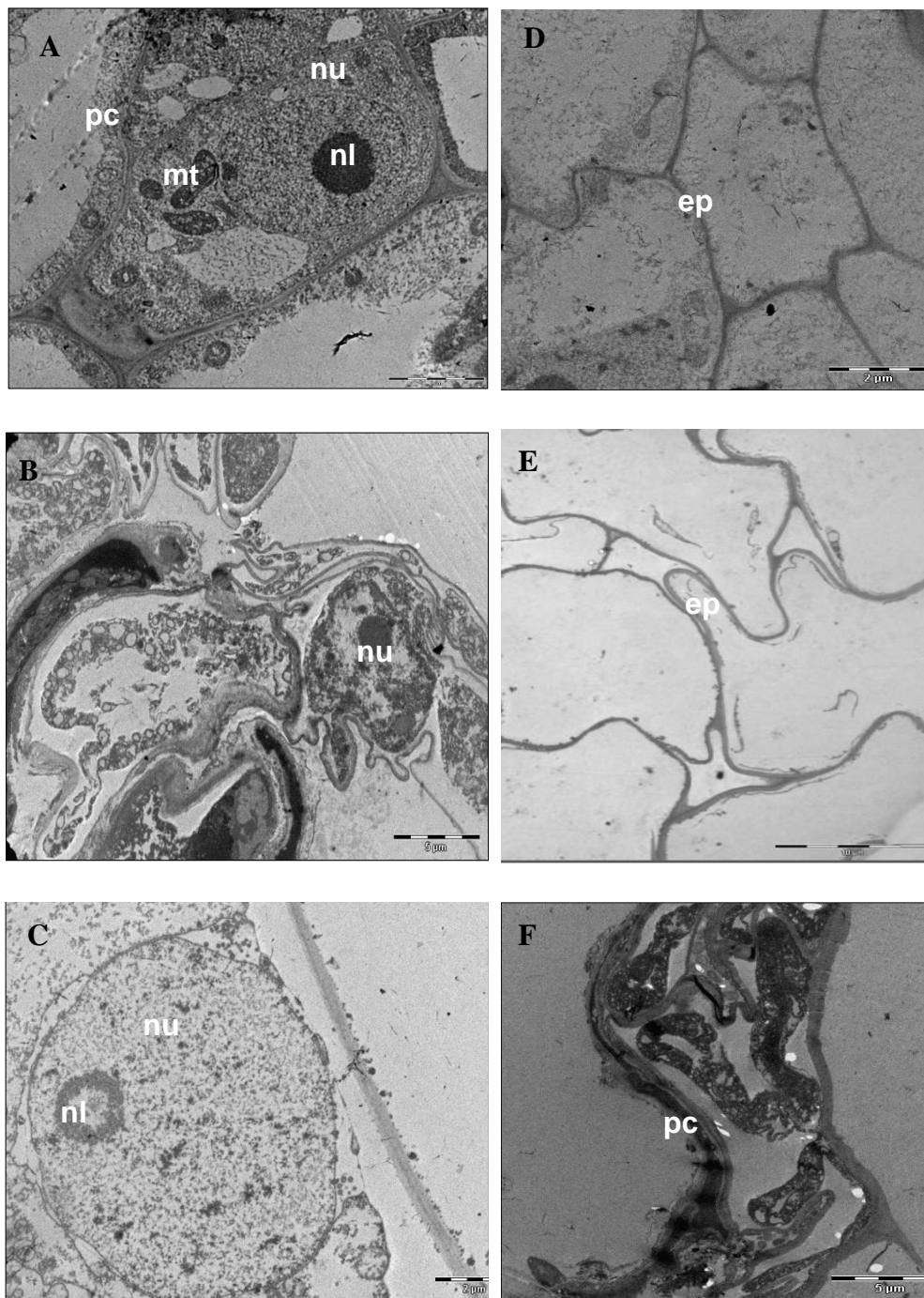




**Figura 2** - Eletromicrografias de células do mesofilo foliar das progênes 'Catongo' x 'Catongo' no controle [(A) (5  $\mu\text{m}$ )] e submetida às doses de 8  $\text{mg Cd L}^{-1}$  [(B) (2  $\mu\text{m}$ )] e 32  $\text{mg Cd L}^{-1}$  [(C) (2  $\mu\text{m}$ )] e CCN-10 x SCA-6 no controle [(D) (2  $\mu\text{m}$ )] e submetida às doses de 8  $\text{mg Cd L}^{-1}$  [(E) (1 $\mu\text{m}$ )] e 32  $\text{mg Cd L}^{-1}$  [(F) (10  $\mu\text{m}$ )] aplicadas via seminal, aos 60 dias após a emergência das plântulas. Cl- cloroplasto; mt- mitocôndrio; nu- núcleo; am- amido ep- epiderme.

Na ausência de Cd, em ambas as progênes de *T. cacao* avaliadas, as células dos tecidos radiculares se apresentaram com características ultraestruturais normais (Figuras 3 A e D). Por outro lado, foram observadas diversas alterações ultraestruturais na concentração correspondente a 32  $\text{mg Cd L}^{-1}$  (Figuras 3 B, E, G e H). Na maior dose do metal (32  $\text{mg L}^{-1}$ ) a progênie de 'Catongo' x 'Catongo' apresentou depósito de materiais eletrodensos na parede celular e no vacúolo,

deformação do núcleo, invaginação da membrana nuclear, importante alteração no núcleo com a condensação da cromatina e, com isso, possível desaparecimento do nucléolo (Figura 3 B e C). Em contrapartida, CCN-10 x SCA-6, na maior dose de Cd ( $32 \text{ mg L}^{-1}$ ), apresentou retração de membrana na epiderme e acúmulo de material eletrodense na parede celular (Figura 3 E e F). Na concentração intermediária de Cd ( $8 \text{ mg L}^{-1}$ ) não foram observadas alterações nas estruturas das células do tecido radicular de ambas as progênies de *T. cacao*.



**Figura 3** - Eletromicrografias de células de raízes das progênes 'Catongo' x 'Catongo' no controle [(2  $\mu\text{m}$ ) (A)] e submetida às doses de 32 mg Cd L<sup>-1</sup> [(5 e 2 $\mu\text{m}$ , respectivamente) (B e C) e CCN-10 x SCA-6 no controle [(2  $\mu\text{m}$ ) (D)] e submetida às doses de 32 mg Cd L<sup>-1</sup> [(10 e 5  $\mu\text{m}$ , respectivamente) (E e F) aplicadas via seminal, aos 60 dias após a emergência das plântulas. Em pc- parede celular, ep- epiderme, nu- núcleo, nl- nucléolo, mt- mitocôndrio.

#### 4.4. Expressão Gênica

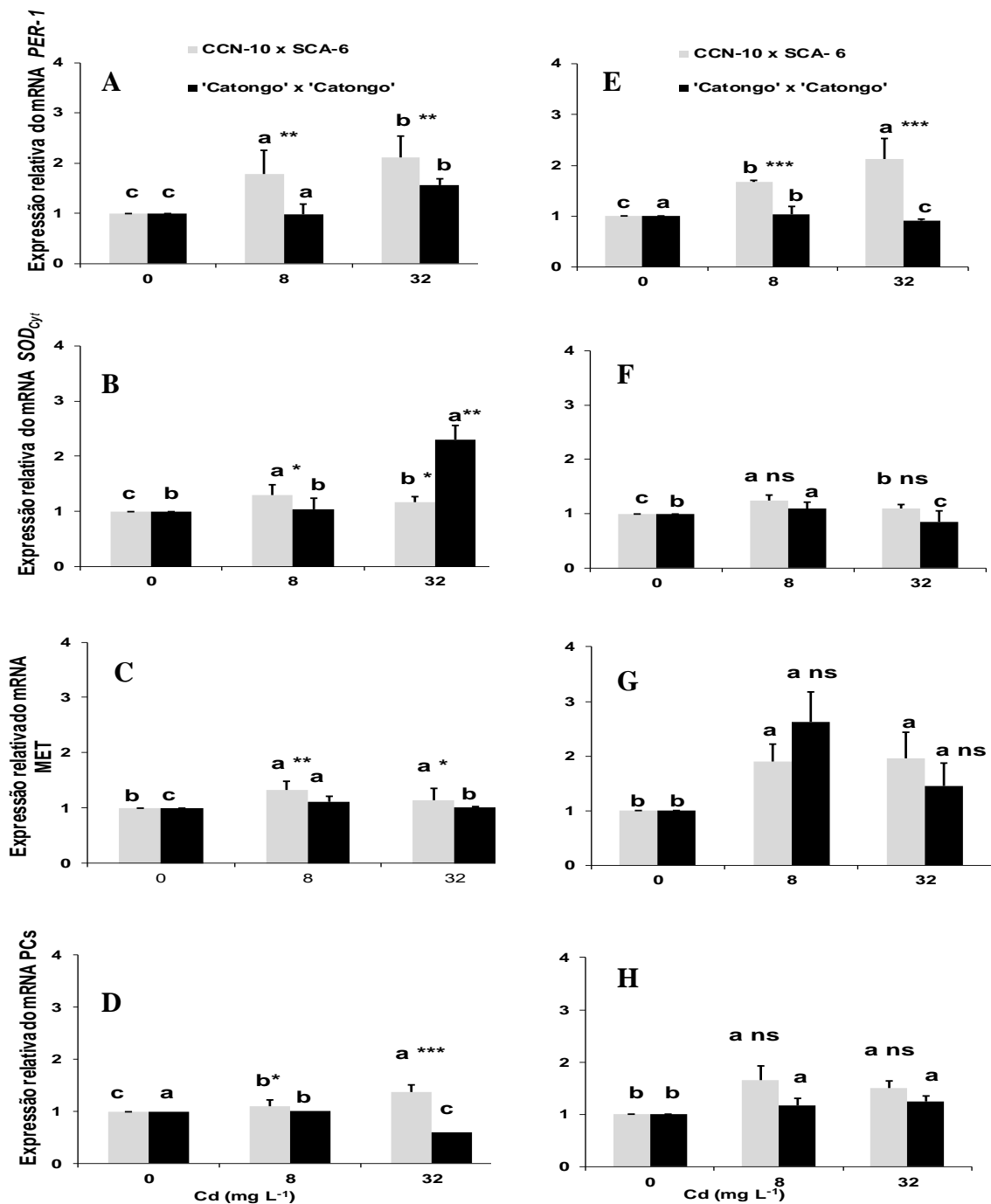
Houve expressão de genes associados à biossíntese de peroxidases (*PER-1*), em ambas as progênies de *T. cacao*. Em folhas, a expressão do gene de *PER-1* foi maior em CCN-10 x SCA-6 nas concentrações de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, cujos incrementos foram na ordem de 45 % e 26 %, respectivamente, quando comparado com 'Catongo' x 'Catongo' (Figura 4 A). O mesmo foi observado nas raízes, cujos aumentos foram de 38% e 57% nas concentrações de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 5 A). Houve também variações intraprogênies significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à expressão do gene *PER-1* em folhas de 'Catongo' x 'Catongo', em função do aumento da concentração de Cd, com incrementos de 1,5% e 36% para as concentrações de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 4 A). O mesmo fato foi, também, observado para CCN-10 x SCA-6, cujos incrementos foram de 44% e 53% para as concentrações de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente, ambos comparados com o controle. Além disso, no sistema radicular de 'Catongo' x 'Catongo' o incremento na expressão do gene *GPX*, na concentração 8 mg Cd L<sup>-1</sup>, foi de 4% em relação ao controle. Em contrapartida, na maior dose do metal, não houve expressão de *GPX* nas células da raiz desta progênie. Por outro lado, em CCN-10 x SCA-6 o incremento de *GPX*, em comparação ao controle, foi de 40% e 53% nas concentrações de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> e 32 mg Cd L<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 5 A).

Quanto à expressão dos genes associados à biossíntese de dismutase do superóxido citoplasmática (*SOD<sub>cyt</sub>*), houve aumento mais pronunciado em folhas de 'Catongo' x 'Catongo' na maior concentração do metal, cujo incremento foi de 45 % em comparação com o controle (Figura 4 B). Entretanto, não se verificou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à expressão deste gene nas raízes (Figura 5 B).

Houve diferença interprogênie para a produção de mRNA de gene codificante para a Metalotioneína (*MET*), sendo a maior expressão encontrada em folhas da progênie CCN-10 x SCA-6, quando comparada ao 'Catongo' x 'Catongo' (Figura 4 C). Ocorreu variação intraprogênie significativa ( $p < 0,05$ ) em raízes para a

expressão de MET, nas doses 8 e 32 mg Cd<sup>-1</sup> quando comparado com o controle (Figura 5 C).

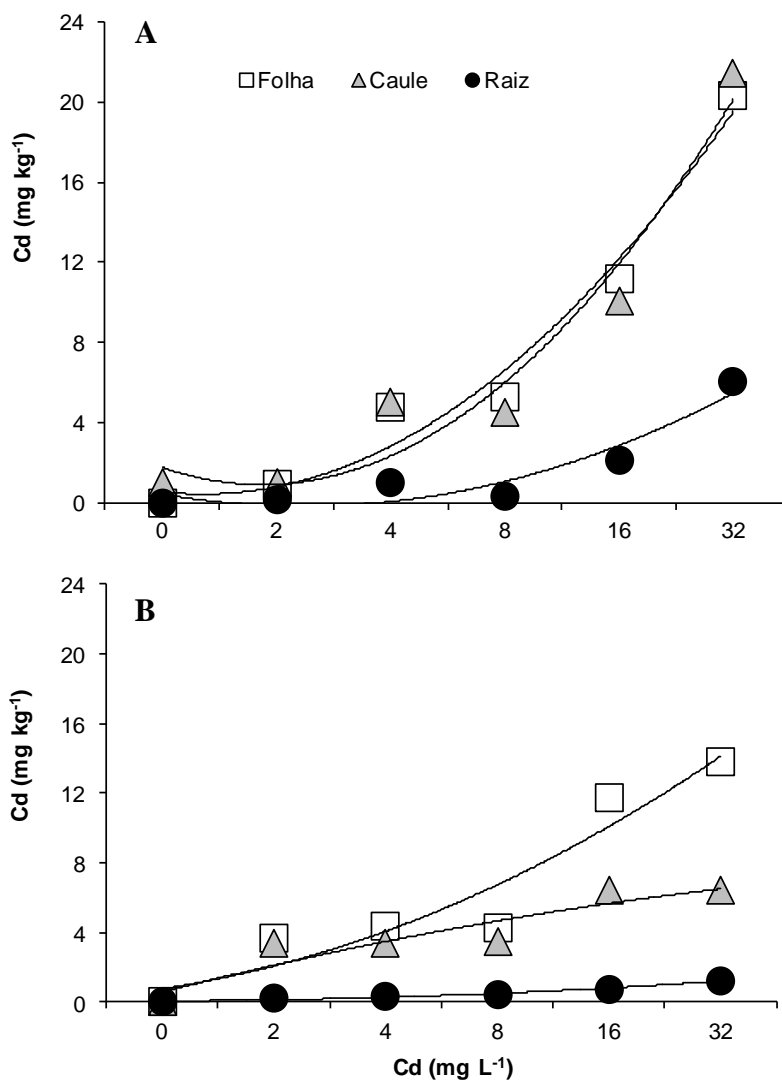
A progênie do cruzamento entre CCN-10 x SCA-6 apresentou incremento na expressão de genes associados à biossíntese de Fitoquelatinas (PCs), quando comparada com '*Catongo*' x '*Catongo*', tanto em folhas quanto em raízes. A produção de mRNA que codifica para PCs foi significativamente maior em folhas de CCN-10 x SCA-6, tanto na concentração de 8 mg Cd L<sup>-1</sup> (9,5%, p<0,01), quanto na de 32 mg Cd L<sup>-1</sup> (56%, p<0,001) (Figura 6 D e A). Entretanto, nas raízes, essa diferença não foi significativa estatisticamente (Figura 7 D). Além disso, verificaram-se, também, diferenças intraprogênie em relação à expressão de PCs, com o aumento das doses de Cd aplicadas via seminal, visto que em folhas de CCN-10 x SCA-6 houve um pequeno incremento (0,05%).



**Figura 4** - Expressão relativa dos genes que codificam para peroxidases (*PER-1*), dismutase do superóxido citoplasmática (*SOD<sub>Cyt</sub>*), metalotioneínas (*MET*) fitoquelatinas (*PCs*) em folhas (A – D) e raízes (E – H) de plântulas de progênes de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Cd, aplicadas 60 dias após a emergência das plântulas. Níveis de mRNA normalizados utilizando  $\beta$ -tubulina e a expressão relativa ao controle assumido como 1. A significância estatística interprogênes foi obtida por ANOVA seguida do *t*-test. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (n.s) não significativo. Médias intraprogênes seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores médios de quatro repetições ( $\pm$  EP).

#### 4.5 Análise de Cd, macro e micronutrientes minerais

Observaram-se comportamentos distintos e significativos ( $p < 0,05$ ) interprogênie quanto à absorção de Cd, macro e micronutrientes minerais, em resposta ao aumento da concentração de Cd aplicado via seminal (Figuras 8 - 10). A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou maior absorção de Cd, quando comparado com '*Catongo*' x '*Catongo*', em resposta ao incremento das concentrações de Cd. Em folhas da progênie CCN-10 x SCA-6, observou-se um incremento quadrático de 98% do controle à maior dose do metal; seguido de caule que apresentou incremento quadrático de 90%, ao passo que nas raízes o incremento foi de 99% (Figura 8A). O mesmo foi verificado em folhas de '*Catongo*' x '*Catongo*', cujo aumento quadrático do controle à maior dose foi de 97%, seguido de 90% e 99%, para caules e raízes, respectivamente (Figura 8B).

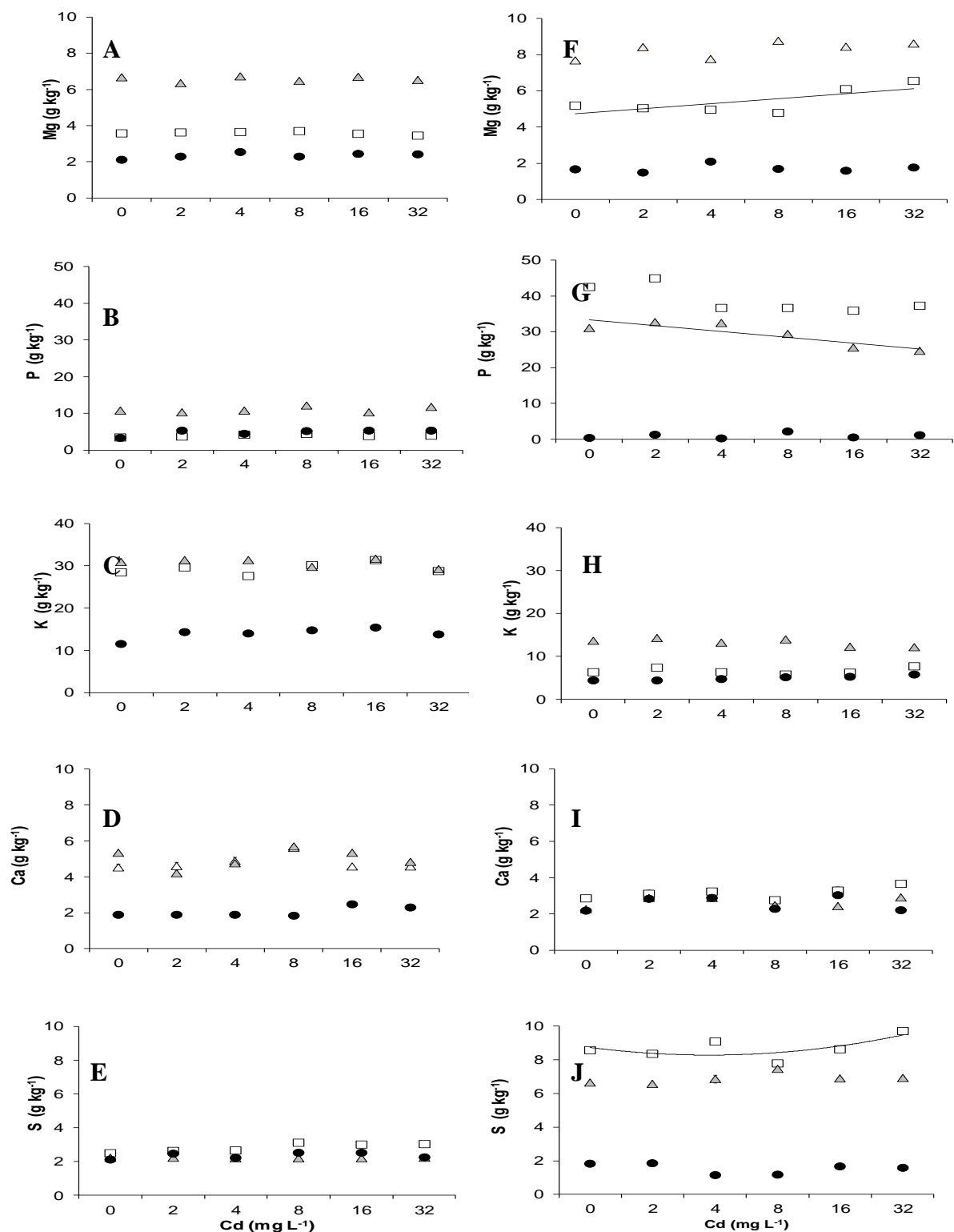


**Figura 5-** Acúmulo de Cd nas raízes (●), caules (Δ) e folhas (□) de duas progênes de *T. cacao* CCN-10 x SCA-6 (A) e '*Catongo* x '*Catongo*' (B) submetidos a doses crescentes de Cd, via seminal, 60 dias após a emergência das plântulas. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3.

O incremento da concentração de Cd aplicado via seminal promoveu um acúmulo diferencial de P, K, e S nos diferentes órgãos vegetativos das plântulas de ambas as progênes de *T. cacao* avaliadas. Não foram observadas diferenças significativas no acúmulo de Mg entre as progênes, porém para ambas o maior acúmulo foi em caule, seguido de folhas e o menor acúmulo nas raízes (Figura 6 F).

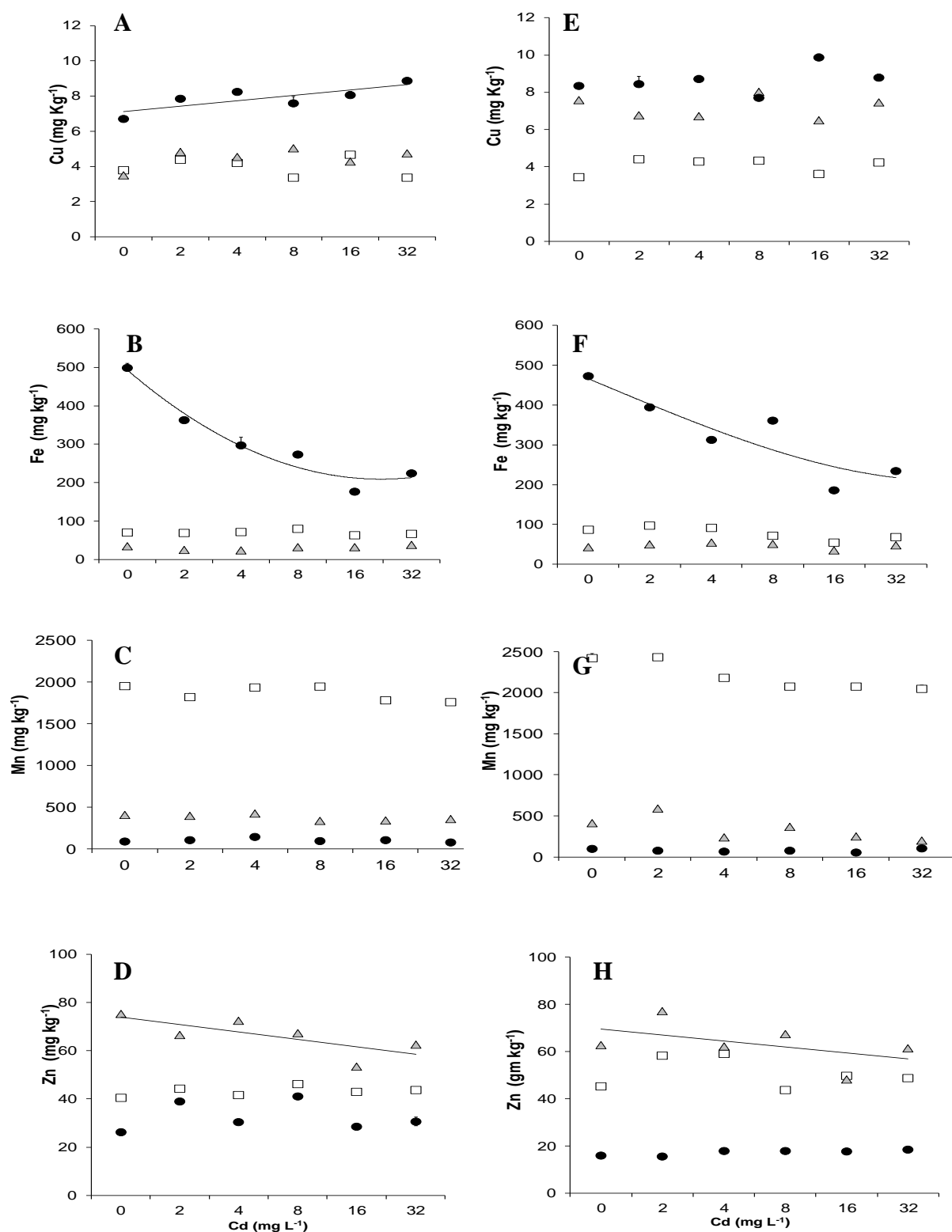


Houve maior acúmulo de P em folhas e caules da progênie '*Catongo*' x '*Catongo*', quando comparado com CCN-10 x SCA-6. Entretanto, em caules de '*Catongo*' x '*Catongo*' observou-se redução linear de 36% do teor de P com o incremento da concentração de Cd via seminal (Figura 6 G). Não foram verificadas alterações no acúmulo de P em CCN-10 x SCA-6, bem como nas folhas e raízes de '*Catongo*' x '*Catongo*' (Figura 9 B e F) com o incremento da concentração de Cd. CCN-10 x SCA-6 mostrou maior capacidade de acumular K em folhas e caules, quando comparado com '*Catongo*' x '*Catongo*' (Figura 6 C). Ambas as progênies não apresentaram alterações significativas no acúmulo de Ca, porém a progênie de CCN-10 x SCA-6 acumulou Ca em maior quantidade em folhas e caules. A progênie '*Catongo*' x '*Catongo*' apresentou maior acúmulo de S em folhas e caules, quando comparado com CCN-10 x SCA-6, sendo um incremento quadrático de 43% em folhas, CCN-10 x SCA-6, por outro lado, não mostrou alteração no acúmulo deste elemento em folhas, caules e raízes com o incremento da concentração de Cd. A progênie '*Catongo*' x '*Catongo*' mostrou maior acúmulo de S em folhas e caules, quando comparado com CCN-10 x SCA-6 (Figura 6 J).



**Figura 6-** Acúmulo de macronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T cacao*: CCN-10 x SCA-6 (A - E) e 'Catongo' x 'Catongo' (F – J) submetidas a doses crescentes de Cd, via seminal, 60 dias após a germinação. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3.

Em relação aos teores dos micronutrientes Cu, Fe, e Zn houve um acúmulo diferencial destes elementos com o incremento da concentração de Cd via seminal. A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou incremento linear de 14% no teor de Cu em raízes, ao passo que a progênie '*Catongo*' x '*Catongo*' manteve os teores de Cu constantes tanto em folhas, caules e raízes (Figura 7 A). Verificou-se, também, que teor de Fe foi significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente em raízes de ambas as progênies de *T. cacao*, com o aumento da concentração de Cd via seminal. Para CCN-10 x SCA-6 ocorreu redução quadrática de 90% do teor de Fe em raízes, enquanto '*Catongo*' x '*Catongo*', observou-se redução quadrática de 78%. Entretanto, os teores de Fe não apresentaram alterações em folhas e caules de ambas as progênies de *T. cacao* (Figura 7 B e F, respectivamente). Por outro lado, para o micronutriente Mn não foram detectadas alterações significativas nos teores em folhas, caules e raízes de ambas as progênies, com o aumento da concentração de Cd via seminal. Em CCN-10 x SCA-6 verificou-se redução linear de 31 % no teor de Zn em caules, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em '*Catongo*' x '*Catongo*' (Figura 7 D e H, respectivamente).



**Figura 7-** Acúmulo de micronutrientes minerais em folhas (□), caules (Δ) e raízes (●) de progênies de *T. cacao*: CCN-10 x SCA-6 (A - D) e 'Catongo' x 'Catongo' (E - H) submetidas a doses crescentes de Cd, via seminal, 60 dias após a germinação. Valores médios de nove repetições (± EP). A ausência de barras de erro indica que o tamanho do erro não excedeu o tamanho do símbolo. Equações das curvas de regressão na Tabela 3.

**Tabela 3** Equações das curvas de regressão para o teor de Cd, macro e micronutrientes minerais em folha, caule e raiz de progênies de *T. cacao* submetidas a doses crescentes de Cd, aplicadas via seminal, 60 dias após a germinação.

Nutriente	Órgão	Progênie	
		CCN-10 x SCA-6	'Catongo' x 'Catongo'
Equação			
<b>Mg</b>	Folha	$Y' = 3,59$	$Y' = 5,43$
	Caule	$Y' = 6,59$	$Y' = 8,09$
	Raiz	$Y' = 2,34$	$Y' = 1,69$
<b>P</b>	Folha	$Y' = 3,92$	$Y' = 37,04$
	Caule	$Y' = 10,75$	$Y' = 31,49 - 0,26x$ ( $R^2 = 0,82$ )
	Raiz	$Y' = 5,24$	$Y' = 0,80$
<b>K</b>	Folha	$Y' = 29,17$	$Y' = 6,34$
	Caule	$Y' = 31,13$	$Y' = 13,39$
	Raiz	$Y' = 14,15$	$Y' = 4,91$
<b>Ca</b>	Folha	$Y' = 4,59$	$Y' = 3,17$
	Caule	$Y' = 5,08$	$Y' = 2,68$
	Raiz	$Y' = 1,89$	$Y' = 2,55$
<b>S</b>	Folha	$Y' = 8,59$	$Y' = 1,95 + 0,11x - 0,002x^2$ ( $R^2 = 0,73$ )
	Caule	$Y' = 6,860$	$Y' = 6,56$
	Raiz	$Y' = 1,62$	$Y' = 1,55$
<b>Cu</b>	Folha	$Y' = 3,99$	$Y' = 4,25$
	Caule	$Y' = 4,64$	$Y' = 7,10$
	Raiz	$Y' = 7,42 + 0,04x$ ( $R^2 = 0,47$ )	$Y' = 8,60$
<b>Fe</b>	Folha	$Y' = 69,7$	$Y' = 78,75$
	Caule	$Y' = 31,92$	$Y' = 48,57$
	Raiz	$Y' = 422 - 25,14x + 0,59x^2$ ( $R^2 = 0,72$ )	$Y' = 451 - 23x - 0,5x^2$ ( $R^2 = 0,75$ )
<b>Mn</b>	Folha	$Y' = 1978$	$Y' = 2128$
	Caule	$Y' = 379$	$Y' = 309$
	Raiz	$Y' = 101$	$Y' = 72,52$
<b>Zn</b>	Folha	$Y' = 43,5$	$Y' = 49,25$
	Caule	$Y' = 66,77$	$Y' = 62,47$
	Raiz	$Y' = 30,52$	$Y' = 17,75$
<b>Cd</b>	Folha	$Y' = 0,2 + 0,74x - 0,004x^2$ ( $R^2 = 0,98$ )	$Y' = 0,65 + 0,84x - 0,01x^2$ ( $R^2 = 0,90$ )
	Caule	$Y' = 1,1 + 0,48x - 0,005x^2$ ( $R^2 = 0,97$ )	$Y' = 1,1 + 0,48x - 0,01x^2$ ( $R^2 = 0,77$ )
	Raiz	$Y' = 0,13 + 0,05x + 0,004x^2$ ( $R^2 = 0,96$ )	$Y' = 0,008 + 0,05x - 0,0004x^2$ ( $R^2 = 0,97$ )

## 5. Discussão

### 5.1 Peroxidase do guaiacol (GPX)

As peroxidases catalisam a redução do peróxido de hidrogênio ou outro peróxido orgânico, enquanto um doador de elétrons é oxidado. São abundantes em vários organismos, incluindo as plantas superiores, e possuem múltiplas isoformas sintetizadas e reguladas por estímulos diversos (LIMA et al., 1999). Além disso, são importantes no controle do crescimento, lignificação, biossíntese da parede celular e defesa contra patógenos (CHEN et al., 2001).

A exposição ao Cd pode promover a ocorrência do estresse oxidativo, resultando em diversas mudanças metabólicas, como nos mecanismos de proteção, a exemplo da alteração na atividade enzimática (GUIMARÃES et al., 2008). Assim, análise bioquímica pode ser utilizada como uma ferramenta criteriosa de avaliação da fitotoxicidade de metais pesados em plantas (SCANDALIOS, 1993; XIAO et al., 2008). Estudos têm mostrado que espécies tolerantes possuem mecanismos de defesa relacionados com a alteração na atividade de enzimas antioxidantes, que protegem várias vias dos processos fisiológicos contra os danos produzidos pelas EROs (PANDA; CHOUDHURY, 2005).

Nas raízes de CCN-10 x SCA-6 a elevação na atividade de GPX nas maiores concentrações de Cd, não observado em '*Catongo*' x '*Catongo*', mostra que pode ser um mecanismo de defesa desenvolvido por CCN-10 x SCA-6 para rapidamente detoxificar as células contra excesso de EROs produzido em resposta ao estresse por Cd (Figura 1 B). A maior atividade de GPX nas raízes de CCN-10 x SCA-6 pode estar, ainda, relacionada a outros possíveis mecanismos de defesa, como o impedimento da translocação do Cd para a parte aérea da planta: isso pode evitar que esse metal não cause danos nos orgânulos celulares responsáveis pelo funcionamento normal do metabolismo celular, como núcleos, mitocôndrios, cloroplastos, peroxissomos, dentre outros. Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram com os encontrados na literatura, uma vez que foi observado em diferentes espécies (*Avena sativa* L., *Brassica campestris* L. cv. Chinensis, *Lactuca sativa* L. cv. hanson) estressadas com Cd, maior atividade de GPX em

folhas e raízes, incluindo nos controles, quando comparados com os tratamentos (CORREA et al., 2006). Foram observadas diferenças significativas quanto à atividade de GPX tanto para 'Catongo' x 'Catongo' quanto para CCN-10 x SCA-6. Vale ressaltar a tendência natural de aumento na atividade de GPX da progênie intolerante ('Catongo' x 'Catongo') em relação à progênie tolerante (CCN-10 x SCA-6), pois tanto em folhas quanto em raízes de 'Catongo' x 'Catongo' houve atividade enzimática até mesmo no controle. Em folhas o incremento na atividade de GPX foi acompanhado pelo aumento nas concentrações de Cd, em ambas as progênies de *T. cacao* avaliadas, corroborando com LIMA et al. (2001), onde constataram tendência de aumento da atividade de peroxidases em cotilédones de *Phaseolus vulgaris*, em função do tempo de exposição em todos os tratamentos com cádmio. Já a maior atividade de GPX em folhas de 'Catongo' x 'Catongo' em relação a CCN-10 x SCA-6 mostra uma resposta tardia ao estresse, evidenciando um sistema de sinalização ao estresse menos eficiente quando comparado com CCN-10 x SCA-6. Logo, para ambas as progênies de *T. cacao*, observaram-se aumento na atividade de GPX em função do incremento na concentração de Cd, porém, com maior rapidez, em CCN-10 x SCA-6. Isso também foi verificado em outros estudos de estresse oxidativo e atividade enzimática devido a estresses bióticos e abióticos (NOJOSA et al., 2002; SMEETS et al., 2007).

## 5.2. Microscopia fotônica

A redução na espessura do mesofilo foliar de plântulas de 'Catongo' x 'Catongo' e CCN-10 x SCA-6, submetidas a duas concentrações de Cd aplicadas via seminal, foi devido, principalmente, à diminuição dos espessamentos de parênquima paliçádico (PP) e parênquima lacunoso (PL) em ambas as progênies. Principalmente na menor concentração de Cd o aumento na espessura da epiderme foliar nas faces adaxial (Ead) e abaxial (Eab) nas duas progênies de *T. cacao* mostra uma reação à exposição ao Cd, como ocorre em outras espécies (Gomes et al. 2011). Porém, ao contrário de 'Catongo' x 'Catongo', CCN-10 x SCA-6 apresentou incremento na espessura da Eab até na maior concentração de Cd, demonstrando ser esta uma das estratégias de sobrevivência da progênie mais tolerante à contaminação pelo Cd. Algumas espécies desenvolvem alterações morfológicas e anatômicas nos

tecidos do mesofilo foliar, possibilitando uma ampla plasticidade fenotípica a diferentes condições de estresse (Srighar et al. 2005). A maior compactação dos tecidos foliares, observado em 'Catongo' x 'Catongo', pode acarretar em diminuição da capacidade fotossintética na presença de Cd, como já foi relatado por outros autores (Chugh; Sawhney, 1999). As espécies vegetais podem responder diferentemente quanto às modificações estruturais em nível foliar e são descritas como específicas para cada metal (Shi; Caia, 2009). Além disso, os resultados deste estudo corroboram com os encontrados na literatura, onde se evidencia que o tratamento com metais tóxicos promove o aumento da espessura da epiderme foliar, (Gomes et al. 2011), e a redução no tamanho das células do mesofilo foliar (Malathi et al. 2001; McQuattie; Schier, 1993).

### 5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Verificou-se, nitidamente, diversas alterações ultraestruturais na maior concentração de Cd ( $32 \text{ mg L}^{-1}$ ), para a progênie oriunda do cruzamento 'Catongo' x 'Catongo', em comparação com a progênie CCN-10 x SCA-6, como (i) desorganização da estrutura dos cloroplastos; (ii) alterações no tamanho e número de grãos de amido; (iii) depósito de materiais eletrodensos na parede celular e no vacúolo; (iv) deformação do núcleo; (v) invaginação da membrana nuclear; (vi) e condensação da cromatina nuclear. Os cloroplastos são extremamente susceptíveis ao estresse oxidativo, resultante da elevação das concentrações de oxigênio, fluxo de elétrons e pela presença de íons metálicos em seu microambiente (DAUD et al., 2009). Por esse motivo, as alterações estruturais observadas nos cloroplastos da progênie mais suscetíveis ao estresse por metais ('Catongo' x 'Catongo') se deve, provavelmente, ao aumento das EROs resultando em severos danos nas estruturas dos cloroplastos, principalmente nas membranas tilacóides e *granum* (PARAMONOVA, et al., 2003). Fato também observado por Souza et al. (2011) na estrutura dos cloroplastos *Genipa americana* L., quando submetidos à toxidez por Cd.

Em estudo realizado com duas cultivares transgênicas de algodão (BR001 e GK30) e o respectivo genótipo selvagem (Coker, 312), submetidas a elevadas



concentrações de Cd (0,08; 0,9 e 8,9 mg L<sup>-1</sup>), pôde-se observar, também, alterações ultramorfológicas em função das concentrações do metal, destacando-se (i) as alterações na morfologia do cloroplasto; (ii) o aumento do número e tamanho dos grãos de amido e dos plastoglóbulos; e (iii) o armazenamento de materiais eletrodensos nos vacúolos e aderidos às paredes celulares (DAUD et al., 2009). A presença de material eletrodenso no parênquima de transporte do xilema corrobora com resultados encontrados por outros autores (CONN; GILLIHAM, 2010; SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008), uma vez que o transporte de Cd pode estar restrito ao xilema, sugerindo que o Cd não é facilmente translocado via floema.

#### 5.4 Expressão gênica

O aumento na biossíntese de peroxidases mais pronunciado em CCN-10 x SCA-6 em comparação com '*Catongo*' x '*Catongo*' tanto em folhas quanto em raízes, sugere um mecanismo de defesa desenvolvido por CCN-10 x SCA-6 para diminuir a ação danosa das EROs produzidas em função do estresse oxidativo causado pela fitotoxicidade do metal (XIAO et al., 2008).

Em raízes de ambas as progênies não houve expressão gênica de SOD<sub>cyt</sub> no material coletado, sugerindo que este gene pode ter sido expresso em outro momento anterior à coleta.

A progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou maior expressão de mRNA associado à produção de METs, quando comparado com a progênie '*Catongo*' x '*Catongo*', evidenciando mais uma estratégia desta progênie para tolerar a toxicidade causada pelo Cd. MTs são peptídeos que possuem regiões promotoras para o transporte de determinados elementos metálicos, além disso, em organismos expostos a metais tóxicos tem-se observado o acúmulo de MTs (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Esses peptídeos são conhecidos, principalmente, por sua função de desintoxicação de organismos contaminados por metais tóxicos, por meio da capacidade de se ligarem a íons metálicos livres ou metais associados a outros ligantes (ASSELMAN et al., 2012; JANSSENS et al., 2009). Em estudo realizado com *A. thaliana* e organismos geneticamente modificados de *Nicotiana tabacum*, observou-se, com a

introdução de genes MTs, que as espécies desenvolveram tolerância ao Cd e capacidade de acumular este elemento metálico (EAPEN; D'SOUZA, 2005).

Na presença de Cd, a progênie CCN-10 x SCA-6 apresentou maior produção de mRNA relacionado à biossíntese de PCSs, sendo que em raízes a produção foi ainda maior. Assim, como neste e em outros trabalhos, a expressão de genes que codificam para PCSs mostrou ser um mecanismo importante para a desintoxicação das células causada estressadas por Cd (GALLEGO et al., 2005). O aumento na produção de mRNA para a biossíntese de PCSs pode ser considerado uma ferramenta genética utilizada por espécies vegetais tolerantes para diminuir os efeitos fitotóxicos do Cd nas células, principalmente nas raízes, impedindo a sua translocação para a parte aérea, por meio da quelação de Cd e de sequestro nos vacúolos, e, dessa forma, mantendo a homeostase celular. Além do mais, verificou-se no presente trabalho, que na progênie de *T. cacao* suscetível a diversos tipos de estresses ('*Catongo*' x '*Catongo*') não houve expressão de PCSs. Logo, sugere-se que essa progênie não possui um sistema de sinalização ao estresse bem desenvolvido, o qual resultaria na ativação de moléculas de defesa, a exemplo da expressão de genes que codificam para PCSs.

### 5.5 Análise de Cd, macro e micronutrientes minerais

Foi observado grande mobilidade de Cd nas espécies de *T. cacao* avaliadas. A maior concentração de Cd foi observada na parte aérea de ambas as progênies. Isto é um alerta para o problema da contaminação por Cd, elemento metálico altamente tóxico, que pode chegar aos frutos e, assim, se inserir na cadeia produtiva do chocolate e outros produtos alimentícios derivados da amêndoa seca de *T. cacao*. CCN 10 x SCA 6 apresentou maior concentração de Cd em suas raízes quando comparado com '*Catongo*' x '*Catongo*'. Estudo mostra que durante o estresse por Cd ocorre um aumento na concentração de Cd nas raízes, entretanto, isso não é devido ao aumento da absorção desse elemento, mas sim pela diminuição do acúmulo de matéria seca (SOUZA, 2007). Embora haja uma alta concentração de Cd nas raízes, este elemento também é encontrado em folhas e caules, demonstrando que o Cd não é totalmente imobilizado nas raízes, mas pode ser translocado para parte aérea

como ocorre em outras espécies e como ocorreu para ambas as progênies deste estudo (SOUZA, 2007; UNTERBRUNNER et al., 2007). O fato de 'Catongo' x 'Catongo', acumular menores concentrações de Cd em seus tecidos quando comparado com CCN 10 x SCA 6, demonstra uma estratégia de sobrevivência da progênie na tentativa de impedir a absorção do elemento metálico nas raízes, sua translocação para a parte aérea e assim, evitar danos nos orgânulos celulares, principalmente os responsáveis pela fotossíntese. Logo, essas progênies de T. caco possuem a capacidade de translocar Cd para a parte aérea em níveis considerados tóxicos para as plantas (tabela 4), sendo 21 mg Cd kg<sup>-1</sup> em caules de CCN10 x SCA 6 e 14 mg Cd kg<sup>-1</sup> em folhas de 'Catongo' x 'Catongo'.

Tabela 4. Concentração de metais pesados em solos em plantas

Elemento	Teor normal no solo *	Concentração total crítica no solo**	Teor normal nas plantas *	Concentração crítica nas plantas	
				a	b
	-----mg kg <sup>-1</sup> -----				
<b>Cádmio</b>	0,01 - 2,0	3 - 8	0,1 - 2,4	5 - 30	4 - 200
<b>Chumbo</b>	2 - 300	100 - 400	0,2 - 20	30 - 300	-
<b>Cobre</b>	2 - 250	60 - 125	5 - 20	20 - 100	5 - 64
<b>Níquel</b>	2 - 750	100	0,02 - 5	10 - 100	8 - 220
<b>Zinco</b>	1 - 900	70 - 400	1 - 400	100 - 400	100 - 900

\*: (BOWEN, 1979);

\*\* e a: acima destes valores ocorre toxidez (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1992);  
b: valores capazes de diminuir em 10% o crescimento das plantas (MCNICHOL e BECKETT, 1985).

Estudos demonstram que o aumento na concentração de Cd provoca diminuição no acúmulo de Magnésio (Mg) em plantas. Em LIU et al. (2003) observou-se diminuição na absorção de Mg em raízes e folhas de 20 genótipos de *Oryza sativa* L., em função de concentrações crescentes de Cd. BARBOSA et al. (2007) também verificaram redução dos teores de Mg em *Genipa americana* L. em função do aumento das concentrações de Cd. Porém, neste trabalho apenas para folhas de 'Catongo' x 'Catongo' observou-se aumento linear nos teores de Mg. Além do papel do magnésio na atividade como co-fator em quase todas as enzimas do

metabolismo energético e na molécula de clorofila, este íon é requerido para a integridade dos ribossomos e contribui efetivamente para a estabilidade estrutural dos ácidos nucléicos e membranas (Taiz; Zeiger, 2004). Dessa forma, sugere-se que o aumento linear do teor de Mg em folhas observado em 'Catongo' x 'Catongo' pode ser uma estratégia de sobrevivência com o objetivo de manter a integridade celular evitar maiores danos causados pelo Cd que foi translocado para a parte aérea.

A redução linear no teor de P observada em caules e folhas de 'Catongo' x 'Catongo' corrobora com a literatura. ZORNOZA et al. (2002) em trabalho realizado com *Lupinus albus* L., cv. Multolupa cultivada em sistema hidropônico com diferentes concentrações de Cd na solução nutritiva observou redução no teor de P com o aumento das doses de Cd.

SOUZA et al. (2011) estudando respostas morfofisiológicas em *Genipa americana* L. submetidas ao estresse por Cd em solução nutritiva (0.5, 1, 2, 4, 8 e 16 mg L<sup>-1</sup>) também verificou maior acúmulo de K em função das crescentes doses de Cd, assim como aconteceu em CCN10 x SCA 6. A função do Potássio é de natureza catalítica e osmótica, sendo essencial para as diversas funções vitais na planta (Filho et al., 2007). Sua atividade catalítica refere-se a ativação enzimática, pois o K ativa cerca de 60 enzimas participando de reações de fosforilação, síntese de proteínas, metabolismo de N e carboidratos, transporte de carboidratos e outros produtos da respiração no floema e fixação simbiótica do nitrogênio. Participa ainda dos seguintes processos: promoção do crescimento dos tecidos meristemáticos, resistência à seca, geadas e à salinidade, resistência a doenças e ao acamamento (gramíneas), qualidade do produto: atua na cor, tamanho, acidez, resistência ao transporte e melhoria no valor nutritivo (N, Vitaminas e açúcares) (COELHO et al., 1973). Dessa forma, o aumento no teor de K em folhas e caules de CCN10 x SCA 6 demonstra uma estratégia de sobrevivência desenvolvida pela progênie contra os danos causados pela fitotoxicidade do Cd.

O aumento de S observado em folhas e caules de 'Catongo' x 'Catongo' está de acordo com os resultados verificados em *Pisum sativum* (PAIVOKE, 2002), onde a elevada concentração do metal provocou o aumento de S em nível foliar. Porém

em *Brassica oleracea* (SINHA, 2006), os autores observaram redução da concentração de S em função do aumento na dose do metal.

O incremento linear da absorção de Cu em raízes de CCN-10 x SCA-6, pode ser caracterizado como uma estratégia de sobrevivência desenvolvida por esta progênie tolerante para superar um momento de estresse causado pelo metal. Cu é um micronutriente essencial para a atividade catalítica de muitas enzimas, cuja absorção e o transporte são regulados e mediados por transportadores específicos (LUCHESE et al., 2004). Este elemento metálico desempenha a função de intermediário na sinalização para a produção de etileno (SILVA et al., 2012). O excesso de Cu é identificado por ligações com fatores de transcrição, ativando inúmeros mecanismos de defesa contra o estresse abiótico, como o aumento da expressão de metalotioneínas, fitoquelatinas e antioxidantes, que ajudam a remover o Cd "livre" e restaurar a homeostase iônica e redox celular (SOARES et al., 2007). Estes metais livres são potencialmente perigosos, e, portanto, sua absorção e concentração celular devem ser reguladas. O Cu tem elevada afinidade com grupos peptídicos, carboxílicos e fenólicos (SOARES et al., 2007). Acredita-se que a enzima dismutase do superóxido (SOD), que contém Cu/Zn, Fe ou Mn no seu centro de reação, desempenha um papel duplo na prevenção da toxicidade do metal (HIRT; SHINOZAKI, 2004).

A toxicidade de Cd em plantas pode influenciar na concentração de elementos minerais nos tecidos, prejudicando a sua nutrição mineral. A presença de Cd nas células pode afetar o conteúdo de cátions polivalentes por meio de competição por sítios de ligação de proteínas ou transportadores (SANDALIO et al., 2001). Estudos relatam diminuições do teor de Ca em diferentes espécies vegetais, quando cultivadas na presença de Cd (GUSSARSON et al., 1996), porém, isso não foi encontrado no presente estudo.

Outros estudos corroboram com os resultados deste trabalho, mostrando redução no teor de Fe, e Zn em espécies tais como *Betula pendula*, *Helianthus annuus* e *Pisum sativum* (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2009; GUSSARSON et al., 1996). Isso evidencia a possibilidade da competição desses íons pelo mesmo sítio

ativo do Cd na membrana plasmática, aliado a isso ocorre a diminuição da absorção de Fe e Zn, em contrapartida o aumento no acúmulo de Cd.

A redução no teor de Fe encontrado neste e em outros trabalhos se deve à competição do Cd com Fe pelo mesmo sítio de absorção na membrana plasmática (SANITA DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999). Essa competição resulta em clorose, que é um dos principais sintomas de toxicidade causada pelo Cd (SANITA DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999). Em altas concentrações de Cd, a clorose, provavelmente, está associada à diminuição da translocação de Fe para as folhas (WONG et al., 1984). Entretanto, outros estudos sugerem que a clorose induzida pelo Cd pode ocorrer devido a alterações na razão Fe/Zn e não à deficiência de Fe, uma vez que as plantas tratadas com Cd apresentam elevada concentração desse micronutriente. Assim, dependendo da espécie, o Cd pode provocar aumento (WONG et al., 1984), diminuição (GUSSARSSON, 1994) ou não afetar (SOUZA, 2007) a absorção de Fe em plantas.

## 6. Conclusões

Progênes de *T. cacao*, oriundas do cruzamento entre CCN-10 x SCA-6 e da autofecundação de 'Catongo' ('Catongo' x 'Catongo'), obtidas a partir da germinação de sementes, expostas por 24 h, em concentrações crescentes de Cd em solução, acumularam Cd em maior quantidade na parte aérea das plântulas. Dessa forma, o presente estudo classifica o Cd como um elemento móvel nas progênes de *T. cacao* avaliadas.

A atividade de peroxidases do guaiacol (GPX) em folhas e raízes de plântulas de *T. cacao* (CCN-10 x SCA-6 e 'Catongo' x 'Catongo'), desempenhou um papel importante, especialmente na progênie CCN-10 x SCA-6, mostrando ser um mecanismo de defesa desenvolvido pela progênie para destoxificar as células das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas em excesso, em resposta ao estresse por Cd.

O incremento das concentrações de Cd via seminal promoveu alterações ultraestruturais nas células dos tecidos foliares e radiculares, principalmente em 'Catongo' x 'Catongo', um dos motivos pelo qual essa progênie se mostra mais suscetível à toxicidade por Cd, devido às maiores alterações em orgânulos celulares importantes para a homeostase celular como cloroplastos e núcleos.

O aumento da expressão dos genes de SOD<sub>cyt</sub>, GPX, PCs e MET, promovido pelo incremento da produção de EROs induzido por Cd, contribuiu também para a tolerância de ambas as progênes de *T. cacao* à toxicidade por Cd, principalmente as oriundas do cruzamento entre CCN-10 x SCA-6.

Por meio das alterações morfológicas, moleculares e ultraestruturais induzidas por Cd, a progênie CCN-10 x SCA-6 se mostrou mais tolerante do que 'Catongo' x 'Catongo' em relação à toxicidade deste elemento metálico em plântulas seminais.

## 7. Referências

- AL-KEDHAIRY, A.A.; AL-ROKAYAR, S.A.; AL-MISUED, F.A. Cadmium toxicity on cells stress response. ***Pakistan Journal of Biology Sciences***, 4: 1046-1049, 2001.
- ALMEIDA, A.-A.F.; MIELKE, M.S.; GOMES, F.P.; GOMES, L.M.C.; MANGABEIRA, P. A. O.; VALLE, R. R. Handbook of Phytoremediation. In: Phytoremediation of Cd, Pb and Cr by Woody Plants. Nova Science Publishers, Environmental Science, ***Engineering and Technology***, 1: 529-550, 2010.
- ALMEIDA, A.-A.F.; VALLE, R.R. Ecophysiology of the cacao tree. ***Brazilian Journal of Plant Physiology***, 19 (4): 425-448, 2007.
- ALMEIDA, N.M. Respostas moleculares, bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais de plântulas de cacau à toxidez de alumínio (Al<sup>+3</sup>). Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, ***Dissertação***, 2013.
- ANDRADE, R.V. Análise do transcriptoma e da expressão diferencial de genes de micélio e levedura de *Paracoccidioides brasiliensis*. Universidade de Brasília ***Tese***, 2006.
- ASSELMANA, J.; GLAHOLTC, S.P.; SMITHD, Z.; SMAGGHEB, G.; JANSSENA, C.R.; COLBOURNED, J.K.; SHAWC, D.J.R.; SCHAMPHELAEREA, K.A.C. Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. ***Aquatic Toxicology***, 110: 54–65. 2012.
- ARGOUT et al. The genome of Theobroma cacao. ***Nature Genetics***, 43: 101–108, 2011.
- BARBOSA, R.M.T.; ALMEIDA, A.-A.F.; MIELKE, M.S.; LOGUERCIO, L.L.; MANGABEIRA, P.A.O.; GOMES, F.P. A physiological analysis of *Genipa americana* L.: A potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. ***Environmental and Experimental Botany***, 61: 264–271, 2007.
- BASZYN´SKI, T.; WAJDA, L.; KROL, M.; WOLIN´SKA, D.; KARUPA, Z.; TUKENDORE, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. ***Journal Plant Physiology***, 48: 365–370, 1980.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. ***Brazilian Journal of Plant Physiology***, 17: 21-34, 2005.
- BERNARD, A. Cadmium and its adverse effects on human health. ***Journal of Medical Research***, 128: 557–564, 2008.
- BENBRAHIM-TALLAA, L.; WATERLAND, R.; DILL, A.; WEBBER, M.; WAALKES, M. Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with overexpression of de novo DNA methyltransferase. ***Environmental Health Perspectives***, 115: 1454–145, 2007.



BIZARRO, V.G.; MEURER, E.J.; TATSCH, F.R.P. Teor de cádmio em fertilizantes fosfatados comercializados no Brasil. **Ciência Rural**, 38 (1): 247-250, 2008.

BARTLEY, B.G.D. The genetic diversity of cacao and its utilization. CABI Publishing, **Wallingford**, UK. 2005.

BOEIRA, R.C. **Impacto do uso de fertilizantes fosfatados sobre o teor de cádmio em solos**. 1995. Capturado em 24 abril, 2013. Online. Disponível na internet  
<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/impacto.html>

BOEKHOLD, A.E.; TEMMINGHOFF, E.J.M.; VAN DER, ZEE, S.E.A.T.M. Influence of electrolyte composition and pH on cadmium sorption by an acid sandy soil. **Journal of Soil Science**, 44: 85-96, 1993.

BOWEN, H.J.M. **Environmental chemistry of the elements**. London: Academic Press, 1979.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M.C.S.; DELITTI, W.B.C.; DOMINGOS, M. Variação sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (paubrasil). **Revista brasileira de Botânica**, 28 (4): 687-696, 2005.

CALLAHAN, L.D.; BAKER, A.J.M.; KOLEV, S.D.; WEDD, A.G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 11: 2–12, 2006.

CI, D.; JIANG, D.; DAI, T.; JING, Q.; CAO, W. Variation in Cadmium Tolerance and Accumulation and Their Relationship in Wheat Recombinant Inbred Lines at Seedling Stage. **Biological Trace Element Research**, 142: 807–818, 2011.

COBBETT, C.S. Phytochelatins and their roles in heavymetals detoxification, **Plant Physiology**, 1233: 825–832, 2000.

COSIO, C.; DESANTIS L.; FREY B.; DIALLO S.; KELLER C. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, 56:765-775, 2005.

CHEN, J.; ZIV, M. The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-culture Narcissus. **Plant Cell Reports**, 20: 22-27, 2001.

CHRISTENSEN, T.H. Cadmium soil sorption at low concentrations. **Water Air, Soil Polluted**. 44:71-82, 1989.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, 37(4): 297-303, 1999.

CORNEANU, G.C.; et al. Caracteristici structurale ale frunzei la Robinia pseudoacacia VAR. Oltenica, cultivata pe terenuri degradate (halde de estéril.), Analele Universității din Craiova, seria **Agricultură – Montanologie** – Cadastru 39, 2009.

COELHO, F.S. **Fertilidade do solo**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2: 384, 1973.

CONN, S.; GILLIHAM, M. Comparative physiology of elemental distributions in plants. **Annals of Botany**, 105: 1081- 1102, 2010.

CORREA, A.X.R.; RIGIA, L.R.R.; VERDINELLIA, M.A.; COTELLEB, S.; FERARDB, J-F.; RADETSKIA, C. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. **Science of the Total Environment**, 357: 120–127, 2006.

CUATRECASAS, J. Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus Theobroma. Contributions from the United States National herbarium, **Washington**, 6 (35): 379-614, 1964.

CUNHA, K.P.V.; NASCIMENTO, C.W.A.; PIMENTEL, R.M.M.; FERREIRA, C.P. Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a cadmium contaminated soil with and without liming. **Journal of Hazardous Materials**, 160: 228–234, 2008.

DANTAS, L.G.; GUERRA, M. Chromatin differentiation between *Theobroma cacao* L. and *T. grandiflorum* Schum. **Genetics and Molecular Biology**, 33 (1): 94-98, 2010.

DAYMOND, A.J.; HADLEY, P.; MACHADO, R.C.R. Genetic variability in partitioning to the yield component of cacao (*Theobroma cacao* L.). **HortScience**, 37: 799-801, 2002.

DAUD, M.K.; YUQIANG, S.; DAWOOD, M.; HAYAT, Y.; VARIATH, M.T.; WU, Y.X.; RAZIUDDIN; MISHKAT, U.; SALAHUDDIN; NAJEEB, U., ZHU, S.J. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars, **Journal of hazardous materials**, 161: (1) 463–473. 2009.

DECKERT, J. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? **BioMetals** 18: 475–481. 2005.

DESIKAN, R.; MACKERNESS, S.; HANCOCK, J.T.; NEILL, S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiology**, 127: 159-172, 2001.

DELMAILA, D.; LABROUSSEA, P.; HOURDINA, P.; LARCHER, L.; MOESCHB, C.; BOTINEAUA, M. Physiological, anatomical and phenotypical effects of a cadmium stress in different-aged chlorophyllian organs of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae). **Environmental and Experimental Botany**, 72: 174–181, 2011.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Multivariate genetic divergence and hybrid performance of cacao (*Theobroma cacao* L.). **Brazilian Journal of Genetics**, 20: 63-70, 1997.

DICKINSON, N.M.; PULFORD, I.D. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. **Environment International** 31: 609-613, 2005.

DURÁN, A.C.; ADAMS, M. cadmium content in cocoa almonds and soils from ocumare de la costa, venezuela. **Agrotrópica**, 11(3): 133-140, 1999.

EAPEN, S.; D'SOUZA, S.F. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. **Biotechnology Advances**, 23: 97–114, 2005.

EPSTEIN, E. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. São Paulo/Rio de Janeiro, **Livros Técnicos e Científicos**, 34, 1975.

ERNEST, W.H.O. Bioavailability of heavy metals and descontamination of soils by plants. **Applied Geochemistry**, 11: 163-167, 1996.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; GOLDSBROUGH, P. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 117: 673 – 677, 1992.

FILIPIC, M.; HEI, T.K. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research**, 546: 81-91, 2004.

FILHO, H.G. **Introdução à nutrição mineral de Plantas**. Disponível em: <http://www.solos.esalq.usp.br/arquivos.html>. Acesso em: 15 julho. 2013.

FOWLER, B.A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review, **Division of Toxicology and Environmental**, 238: 294–300, 2009.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, 58: 253-260, 2006.

GABE, U.; RODELLA, A. Trace elements in Brazilian agricultural limestones and mineral fertilizers. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 30 (5): 605-620, 1999.

GRATAO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.; AZEVEDO, R.A.; hytoremediation: green technology for the clean up of toxic etals in the environment, **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 17: 53–64, 2005.

GRECO, M.; CHIAPPETTA, A.; BRUNO, L.; BITONTI, M.B. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning **Journal of Experimental Botany**, 63 (2): 695–709, 2012.

GOERING, P.; WAALKES, M.; KLAASEN, C. Toxicology of cadmium. In: Goyer RA, Cherian MG, eds. Handbook of experimental pharmacology: toxicology of metals, biochemical effects, **Springer-Verlag**, 115: 189-214, 1994.

GODOY, P.R.E.; SOUZA, M.M.; ROZA, F.A.; LAWINSCKY, P.R.; ARAÚJO, I.S.; AHNERT, D. Performance polínica em cacauzeiros *Theobroma cacao* L. autocompatíveis e autoincompatíveis. **Revista Brasileira de Botânica**, 32 (3): 617-620, 2009.

GOMES, M.P.; MARQUES, T.C.L.L.S.M.; NOGUEIRA, M.O.G.N.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, 68 (5): 566-573, 2011.

GOMES, L.M.C.; GESTEIRA, A.S.; ALMEIDA, A.-A.F.; CASTRO, A.V.; DIAS, L.O.; PIROVANI, C.P.; GOMES, F.P. Changes in protein profile detected in seedlings of *Caesalpinia peltophoroides* (Fabaceae) after exposure to high concentration of cadmium. **Genetics and Molecular Research**, 11(3): 2694-707, 2012.

GUIMARÃES, M.A.; SANTANA, T.A.; SILVA, E.V.; ZENZEN, I.L.; LOUREIRO, M.E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. Rev. **Trópicos em Ciências Agrárias e Biológicas**, 3(1): 56, 2008.

GUSSARSON, M.A.S.P.; ADALSTEINSSON, H.S.; JENSÉN, P. Enhancement of Cd effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO). **Journal of Experimental Botany** 47: 211–215, 1996.

HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1–11, 2002.

HASAN, S.A.; FARIDUDDIN, Q.; ALI, B.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. **Journal Environmental Biology**, 30: 165–174, 2009.

HEBBAR, P.; BITTENBENDER, H.C.; O'DOHERTY, D. Farm and forestry production and marketing profile for cacao (*Theobroma cacao*). In: Elevitch, C.R. (ed.). Specialty croFS for Pacific Island agroforestry. **Permanent Agriculture Resources**, Honolulu, Hawai'i. <http://agroforestry.net/scFS>. 2011 (revised).

HECKATHORN, S.A.; MUELLER, J.K.; LAGUIDICE, S.; ZHU, B.; BARRETT, T.; BLAIR, B.; DONG, Y. Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. **American Journal of Botany**, 91:1312-1318, 2004.

HELL, R.; STEPHAN, U.W. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. **Planta**, 216: 541–551, 2003.

HIRT, H.; SHINOZAKI, K. *Plant responses to abiotic stress*. Berlin Heidelberg: **Springer**. 2004.

HASSINEN, V.H.; TERVAHAUTA, A.I.; SCHAT, H.; KARENLAMPI, S.O. Plant metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity? **Plant Biology**, 13:

225-232, 2011.

ICCO, INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistic. Londres, **ICCO**, 37 (1), Cocoa year 2010/11.

**ICCO – 2013.**

[http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/67-monthly-review-of-the-market-2013.html](http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/67-monthly-review-of-the-market-2013.html)  
Acesso em 13/05/2013

ICCO **Annual report**. 43, 2007.

INOUE, M. Phytochelatins. **Journal of Plant Physiology**, 17(1): 65-78, 2005.

JIANG, G.; XU, L.; SONG, S.; ZHU, C.; WU, Q.; ZHANG, L.; WU, L. Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells. **Toxicology**, 244: 49–55, 2008.

JIN, T.; WU, X.; TANG, Y.; NORDBEIG, M.; BERNARD, A.; YE, T.; KONG, Q.; LUNDSTROM, N.G.; NORDBERG G.F. Environmental epidemiological study and estimation of benchmark dose for renal dysfunction in a cadmium-polluted area in China, **Biomaterials**, 17: 525–530, 2004.

JIN, T.; LU, J.; NORDBERG, M.; Toxicokinetics and biochemistry of cadmium with special emphasis on the role of metallothionein, **Neurotoxicology**, 19: 529–535, 1998.

KABATA-PENDIAS, A., PENDIAS, H., Trace Elements in Soils and Plants, third ed. CRC **Press**, Boca Raton, USA, 2001.

KENNEDY, A.J. Cacao. In: Smartt J and Simmonds NW. Evolution of Crop Plants. **Longman Scientific and Technical**, 2: 472-475, 1995.

KRAMER, U. Metal Hyperaccumulation in Plants. **Annual Review of Biochemistry** 61: 517– 34, 2010.

KOPYRA, M.; GWOZDZ, E.A. The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, 26: 459- 472, 2004.

KUPPER, H.; LOMBI E.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *rabidopsis halleri*, **Planta**, 212: 75–84, 2000.

LABRA, M.; GIANAZZA, E.; WAITT, R.; EBERINI, I.; SOZZI, A.; REGONDI, S.; GRASSI, F.; AGRADI, E. *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments, **Chemosphere**, 60: 1234–1244, 2006.

LAUWERYS, R.R.; BUCHET, J.P.; ROELS, H.A.; BROUWERS, J.; STANESCU, D. Epidemiological survey of workers exposed to cadmium, **Archives of Environmental and Occupational Health** 28, 145–148. 1974.

LAEGREID, M. et al. **Agriculture Fertilizers environment**. Wallingford: CAB, 294, 1999.

LARCHER, W. Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. **Springer**, 3: 425, 1995.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, 56: 21-25, 1999.

LIU, J.G.; LIANG, J.S.; LI, K.Q.; ZHANG Z.J.; YU, B.Y.; LU, X.L.; YANG, J.C.; ZHU, Q.S. Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. **Environmental and Public Health Management**, 52 (9): 1467-1473, 2003.

LOGANATHAN, P.; et al. Effect of phosphate fertilizer type on the accumulation and plant availability of cadmium in grassland soils. **Nutrient Cycling in groecosystem**, 47: 169-178, 1997.

LUX, A.; VACULÍK, M.; MARTINKA, M.; LIŠKOVÁ, D.; KULKARNI, M.; STIRK, W. A.; STADEN, J.V. Cadmium induces hypodermal periderm formation in the roots of the monocotyledonous medicinal plant *Merwillia plumbea*. **Annals of Botany**, 107: 285, 2011.

LUCHESE, A.V.; JUNIOR, A.C.G.; LUCHESE, E.B.; BRACCINI, M.C.L. Emergência e absorção de cobre por plantas de milho (*Zea mays*) em resposta ao tratamento de sementes com cobre. **Ciência Rural**, 34(6): 1949-1952, 2004.

MAKSYMIEC, W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. **Acta Physiologiae Plantarum**. 29: 177–187, 2007.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of Nitric oxide in regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediating tolerance of plants to abiotic stress: A synergistic signalling approach. **Journal of Stress Physiology and Biochemistry**, 7 (2): 34-74, 2011.

MALATHI, N.; SARETHY, I.P.; PALIWAL, K. Effect of aluminum on hydroponically grown *Acacia nilotica* seedlings. **Journal of Plant Biology**, 28: 105–109, 2001.

McNICHOL, R.D.; BECKKETT, P.H.T. **Plant and Soil**, 85: 107-129, 1985.

McQUATTIE, C.J.; SCHIER, G.A. Effect of ozone and aluminum on pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings: needle ultrastructure. **Canadian Journal of Forest Research**, 23: 1375–1387, 1993.

MONTEIRO, W. R.; AHNERT, D. Melhoramento Genético do Cacaueiro. **Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro**, 1(2): 11-29, 2012.

SILVA, S.D.V.M.; LUZ, E.D.M.N.; PIRES, J.L.; YAMADA, M.M.; FILHO, L.P.S. Parent selection for cocoa resistance to witches'-broom. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, 45 (7): 680-685, 2010.

MOULIS, J-M.; THEVENOD, F. New Perspectives In Cadmium Toxicity: An Introduction. EDITORIAL, **Biometals**, 2010.

MORTVEDT, J.J.; BEATON, J.D.; in: H. Tiesen (Ed.), Phosphors in the Global Environment: Transfer, Cycles and Management, Wiley, **New York**, 93–106, 1995.

MILLER, G.; SHULAEV, V.; MITTLER, R. Reactive oxygen signalling and abiotic stress, **Plant Physiology**, 133: 481-489, 2008.

NAKAYAMA, L.H.I.; SOARES, M.K.M.; APPEZZATO, B. Contribuição ao estudo anatômico da folha e do caule do cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) **Scientia Agricola**, 53 (1): 73-73, 1996.

NAIDU, R.; BOLAN, N.S.; KOOKANA, R.S. TILLER, K.G. Ionic-strength and pH effects on the sorption of cadmium and the surface charge of soils. **European Journal of Soil Science**, 45: 419-429, 1994.

NORDBERG, G.F.; NOGAWA, K.; NORDBERG, M.; FRIBURG, L.T. Cadmium, in: Handbook on the Toxicology of Metals, **Academic Press**, 2: 445–487, 2007.

NOJOSA, G.B.A.; RESENDE, M.L.V.; AGUILAR, M.A.G.; BEZERRA, K.M.T.; ANHERT, D.E. Componentes Fenólicos e Enzimas Oxidativas em Clones de *Theobroma cacao* Resistentes e Suscetíveis a *Crinipellis perniciososa* . **Fitopatologia Brasileira**, 28: 148-154, 2003.

OUZOUNIDOU, G.; MOUSTAKAS, M.; ELEFThERIOU, E.P.; Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves, **Environmental Contamination and Toxicology**, 32: 154–160, 1997.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Journal Environmental and Experimental Botany**, 52: 199-223, 2004.

PALLARA, G.; TODESCHINI, V.; LINGUA, G.; CAMUSSI, A.; RACCHI, M.L. Transcript analysis of stress defence genes in a white poplar clone inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and grown on a polluted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, 63: 31-139, 2013.

PANDA, S.K.; CHOUDHURY, S. Chromium stress in plants. Braz. **Journal of Plant Physiolog.**, 17(1): 95-102, 2005.

PARAMONOVA, N.V.; SHEVYAKOVA, N.I.; SHORINA, M.V.; STETSENKO, L.A.; RAKITIN, V.Y.U.; KUZNETSOV, VL.V. The Effect of Putrescine on the Apoplast. **Plant Biology**, 12: 355–363, 2010.

PARAMONOVA, N.V.; SHEVYAKOVA, N.I.; SHORINA, M.V.; STETSENKO, L.A.; RAKITIN, V.YU.; KUZNETSOV, V.L.V. The Effect of Putrescine on the Apoplast ultrastructure in the Leaf Mesophyll of *Mesembryanthemum crystallinum* L. under Salinity Stress. ***Journal of Plant Physiology***, 50: 661–673, 2003.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. ***Environmental and Experimental Botany***, 52: 199-223, 2004.

PIETRINI, F.; ZACCHINI, M.; IORI V.; PIETROSANTI, L., FERRETTI, M.; MASSACCI, A. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. ***Plant Biology***, 12: 355–363, 2010.

PARK, O.K. Proteomic Studies in Plants. ***Journal of Biochemistry and Molecular Biology***, 37: 133-138, 2004.

PAL, R.; RAI, J.P.N. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification, Appl. ***biochemistry and biotechnology***, 160: 945-963, 2010.

PIERANGELI, M.A.P.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N.; SILVA, M.L.N.; OLIVEIRA, L.R.; LIMA, J.M. Efeito do pH na adsorção — dessorção de chumbo em Latossolos brasileiros. ***Revista Brasileira de Ciência do Solo***, 25: 269-277, 2001.

PERSSON, D.P.; HANSEN, T.H.; HOLM, P.E.; SCHJOERRING, J.K.; HANSEN, H.C.B.; NIELSEN, J.; CAKMAK, I.; HUSTED, S. Multi-elemental speciation analysis of barley genotypes differing in tolerance to cadmium toxicity using SEC-ICP-MS and ESI-TOF-MS. ***Journal of Analytical Atomic Spectrometry***, 32: 539–548, 2006.

POMBO, L.C.A. Sorção de cádmio em solos do estado do Rio Grande do Sul. R. ***Revista Brasileira de Ciência do Solo***, 19: 19-24, 1995.

PROCHNOW, L.I. et al. Bioavailability of cadmium contained in single superphosphates produced from different Brazilian raw materials. ***Communications in Soil Science and Plant Analysis***, 32: 283-294, 2001.

RASCIO, N.; DALLA, V.D.; FERRETTI, M.; MERLO, L.; GHISI R. Some effects of admium on maize plants, ***Archives of Environmental Contamination and Toxicology***, 25: 244–249, 1993.

REHEM, B.C., ALMEIDA, A-A.F.; MIELKE, M.S.; GOMES, F.P. Efeitos do alagamento do substrato no crescimento e na composição química de genótipos clonais de *Theobroma cacao*. ***Revevista Brasileira de Fruticultura***, 31(3): 805-815, 2009.

REHEM, B.C.; ALMEIDA, A-A.F.; SANTOS, I.C.; GOMES, F.P.; PIROVANI, C.P.; ROMERO, P.; BOTÍA, P. Daily and seasonal patterns of leaf water relations and gas exchange of regulated deficit-irrigated almond trees under semiarid conditions. ***Environmental and Experimental Botany***, 56: 158-173, 2011.



- REESE, R.N.; MCCALL, R.D.; ROBERTS, L.W. Cadmium-induced ultrastructural changes in suspension-cultured tobacco cell (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi), ***Environmental and Experimental Botany***, 26: 169–173, 1986.
- REIS, G. S. M. Toxicidade de Pb em plântulas de Theobroma cacao: respostas moleculares, bioquímicas, morfológicas e ultraestruturais. Universidade Estadual de Santa Cruz, **Dissertação**, 2013.
- ROSÁRIO, M. et. al. **Cacau: história e evolução no mundo**. Ilhéus: CEPLAC, 46 p. 1978.
- 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 Physiology***, 150: 229–243, 2009.
- SALT, D.E.; KRAMER, U.; RASKIN, I.; ENSLEY, B.D. Mechanisms of Metal Hyperaccumulation in Plants, *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, Eds., **New York**: Wiley and Sons, pp. 231–245, 2000.
- SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GOMEZ, M.C.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RIO, L.A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea Plants. ***Journal Environmental and Experimental Botany***, 52: 2115–2126, 2001.
- SEBASTIANI, L.; SCEBBA, F.; TOGNETTI, R. Heavy metal accumulation and growth responses in poplar clones Eridano (*Populus deltoides x maximowiczii*) and I-214 (*Populus deltoides x euramericana*) exposed to industrial waste. ***Environmental and Experimental Botany***, 52: 79-88, 2004.
- SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. ***Plant Physiology***, 101: 7-12, 1993.
- SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. ***Journal of Experimental Botany***, 53: 1351-1365, 2002.
- SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. ***Journal of Plant Physiology***, 55: 1–22, 2008.
- SHEVYAKOVA, N.I.I.; NETRONINA, A.; ARONOVA, E.E.; KUZNETSOV, V.L.V. Compartmentation of Cadmium and Iron in Mesembryanthemum crystallinum Plants during the Adaptation to Cadmium Stress. ***Journal of Plant Physiology***, 50 (5): 678–685, 2003.
- SHI, G.; CAIA, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. ***Environmental and Experimental Botany***, 67: 112-117, 2009.

SILVA, T. P. Fisiologia do desenvolvimento e senescência de flores de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Universidade Federal de Viçosa. **Tese**, 2012.

SMEETS, K.; RUYTINX, J.; SEMANEA, B.; BELLEGHEMC, F.V.; REMANSA, T.; SANDEN D,S.V.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. **Environmental and Experimental Botany**, 1832: 8-8, 2007.

SRIGHAR, B.B.M.; DIEHL, S.V.; HANC, F.X.; MONTS, D.L.; SUB, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, 54: 131-141, 2005.

SRESTY T.V.S.; RAO, K.V.M. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea, **Environmental and Experimental Botany**. 41: 3–13, 1999.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, 1(1): 9-9, 2007.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G.; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, 29: 175-183, 2005.

SOUZA, V.L.; LIMA, S.G.C.; CASCARDO, J.C.M.; SILVA, D.; MANGABEIRA, P.A. O.; GOMES, F.P. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **BioMetals**, 24 (1): 59-71, 2011.

SOUZA, V. L.; COSTA, D.S.; SANTANA, K.B.; MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A-A.F.; MANGABEIRA, P.A.O.; ROCHA, E.A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, 23(2): 343 - 354, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 5ª Ed. Sunderland: **Sinauer**. 670, 2013.

TAN, K.H. **Environmental soil science**. New York: Marcel DekkerInc. 2: 452, 2000.

TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **Plant Cell**, 14: 153–164, 2002.

WANG, K.; XING, B. Adsorption and desorption of cadmium by goethite pretreated with phosphate. **Chemosphere**, 48: 665-670, 2002.

WU, X.; YALOWICH, J.C.; HASINOFF, B.B. Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II, **Journal of Inorganic Biochemistry**, 105: 833–838, 2011.

WAALKES, M.; MISRA, R. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. In: Chang L, ed. **Toxicology of metals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 231–244, 1996.

WAISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, BEYERSMANN, B.D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium arcinogenesis. **Toxicology** 192: 95–117, 2003.

WASINGER, V.C.; CORDWELL, S.J.; CERPA-POLJAK, A.; YAN, J.X.; GOOLEY, A.A.; WILKINS, M.R.; DUNCAN, M.W.; HARRIS, R.; WILLIAMS, K.W.; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. **Electrophoresis**, 16: 1090-1094, 1995.

YAP, D.W.; ADEZRIAN, J.; KHAIRIAH, J.; ISMAIL, B.S.; AHMAD-MAHIR, R. The uptake of heavy metals by paddy plants (*Oryza sativa*). **Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, 6 (1): 16-19, 2009.

YANG, H.M.; ZHANG, X.Y.; WANG, G.X. Effets of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves. **Journal of Plant Physiology**, 51: 516 – 520, 2004.

UNTERBRUNNER, R.; PUSCHENREITER, M.; SOMMER, P. WIESHAMMER, G.; TLUSTOS, P.; ZUPAN, M.; WENZEL, W.W. Heavy metal accumulation in trees growing on contaminated sites in Central Europe. **Environmental Pollution**. 148:107-114, 2007.

VASSILEV, A.; VANGRONSVELD, J.; YORDANOV, I. Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, 28: 68-95, 2002.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Plant Biology**, 12: 364–372, 2009.

VITORIA, A.P.; RODRIGUEZ, A.P.M.; CUNHA, M.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Structural changes in radish seedlings (*Raphanus sativus*) exposed to cadmium. **Biologia Plantarum**, 47: 561–568, 2003.

VOLLENWEIDER, P.; COSIO, C.; GUNTARDT-GOERG, M.S.; KELLER, C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.).II. Microlocalization and cellular effects of cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, 58: 25-40, 2005.

XIAO, W. et al. Effects of lead on activities of photpchemical reaction and key enzymes of carbon assimilation in spinach chloroplast. **Biological Trace Element Research**, 126: 269-279, 2008.

XIONG, J.; AN, L.Y.; LU, H.; ZHU, C. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. **Plantarum**, 230: 755–765, 2009.

ZACCHINI, M.; PIETRINI, F.; MUGNOZZA, G.S.; IORI, V.; PIETROSANTI, L.; MASSACCI, A. Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. **Water, Air, Soil and Pollution**, 197: 23–34, 2009.

ZORNOZA, P.; VÁZQUEZ, S.; ESTEBAN, E.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; CARPENA, R. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40 (12): 1003-1009, 2002.