

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

José Francisco de Souza



**EFEITO DE METAIS PESADOS NO
DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS DE MILHO
(*Zea mays* L.) E RABANETE (*Raphanus sativus* L.)**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
José Francisco de Souza
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do título
de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	Unicamp
	So 892
V	EX
TOMBO BCI	55624
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/09/03
Nº CPD	

55624

CM00188932-B

Bib id 300082

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So89g

Souza, José Francisco de

Efeito de metais pesados no desenvolvimento de plântulas de milho (*Zea mays L.*) e rabanete (*Raphanus sativus L.*) / José Francisco de Souza.--

Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Angelo Luiz Cortelazzo

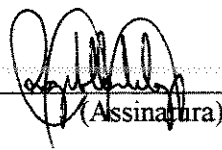
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Cadmio. 2. Zinco. 3. Niquel. I. Cortelazzo, Angelo Luiz.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Data da Defesa: 01/07/2003

Banca Examinadora

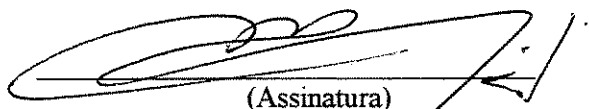
Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo (orientador)


(Assinatura)

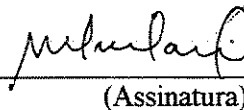
Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima

(Assinatura)

Prof. Dr. João Marcos de Araújo


(Assinatura)

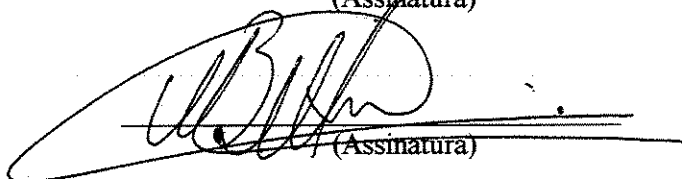
Prof. Dr. Pedro Roberto Furlani


(Assinatura)

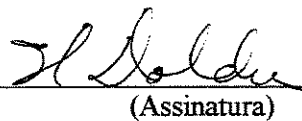
Profª. Dra. Thelma Regina Gabriel da Silva


(Assinatura)

Prof. Dr. Wagner Bettiol


(Assinatura)

Profª. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


(Assinatura)

100329935

.....

Dedico este trabalho a meus pais, Antônio e Lourdes, a meus irmãos, Zeli e Lucimar, e a todos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Acredito que não se faz ciência isoladamente, por isso pude contar com o apoio de muitas pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. A todas essas pessoas gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos, e em especial:

- Ao Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo pela orientação e aprendizado essenciais à minha formação acadêmica e principalmente pelo seu apoio e amizade nas horas mais difíceis durante a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Wilfried E. Rauser, da Universidade de Guelph, Canadá, pela sua orientação, dedicação e apoio durante o meu estágio sanduíche e à sua esposa Stephani, pelo apoio logístico.
- À Profa. Dra. Heidi Dolder, por suas sugestões e ensinamentos que em muito contribuíram para o engrandecimento deste trabalho e para a minha formação acadêmica.
- A todos os professores e colegas do Departamento de Biologia Celular e de Biologia Vegetal pela convivência agradável.
- Aos membros da banca e pré-banca pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para o engrandecimento deste trabalho.
- Aos meus pais pelo amor e apoio irrestrito em todos os momentos da minha vida e a meus irmãos, pelo apoio, compreensão e carinho.
- Aos meus sobrinhos, Clayton, Lioneide e Lucineide e ao meu afilhado, Luiz Felipe, por todo o carinho que me dedicam.
- A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes em todos os momentos, em especial aos meus dois amigos, companheiros de todas as horas, Roberto e Neuza.
- À minha querida tia Zefinha e aos primos Marluce, Jorge e família, pelo carinho e amizade.
- Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa sanduíche.

ÍNDICE

Resumo	01
Abstract.....	02
 CAPÍTULO 1	
Introdução e Objetivos.	
Introdução.....	03
Objetivos.....	09
 CAPÍTULO 2	
Revisão Bibliográfica.....	10
 CAPÍTULO 3	
Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways.....	23
Abstract.....	25
Introduction.....	26
Materials and methods.....	29
Results and Discussion.....	33
References.....	47
 CAPÍTULO 4	
Effect of excess Cadmium and Zn ions on roots and shoots of Maize	
seedlings.....	64
Abstract.....	65
Introduction.....	66
Materials and methods.....	67
Results and discussion.....	68
References.....	71

CAPÍTULO 5

Cellular changes in roots and shoots of radish seedlings during growth

with Cadmium, Zinc and Nickel ions excess.....	78
Abstract.....	79
Introduction.....	80
Materials and methods.....	82
Results and discussion.....	84
References.....	88

CAPÍTULO 6:

Comparação entre os efeitos causados por metais pesados

nodesenvolvimento de plântulas de rabanete e milho.....	99
Resumo	101
Introdução.....	101
Material e métodos	102
Resultados.....	104
Discussão	107
Referências.....	110

CAPÍTULO 7: Considerações Finais e Conclusões	119
--	------------

CAPÍTULO 8: Bibliografia.....	124
--------------------------------------	------------

Resumo

Algumas plantas são capazes de absorver e acumular metais pesados em grandes quantidades enquanto outras são muito sensíveis até mesmo para concentrações muito baixas dos mesmos, comprometendo a produção e/ou a qualidade desses vegetais para o consumo animal. Cádmio (Cd) é um dos metais pesados com maior toxicidade, mas mesmo elementos que são necessários ao desenvolvimento vegetal como o zinco (Zn) e o níquel (Ni), podem se tornar muito tóxicos em concentrações elevadas. Com o objetivo de conhecer melhor o efeito desses metais pesados, foram verificados os seus efeitos em duas espécies muito utilizadas na alimentação humana e de rápido desenvolvimento: milho e rabanete. Inicialmente, foram feitas análises de germinação e crescimento e ambas as espécies foram sensíveis aos tratamentos com níquel e cádmio. Zinco afetou apenas o crescimento para rabanete. O estudo da translocação desses elementos das raízes para as partes aéreas das plântulas foi realizado visando a determinação das fitoquelatinas envolvidas na quelação de Cd ou Zn e seu armazenamento no vacúolo ou citoplasma. Os resultados revelaram que o cádmio está compartimentalizado no vacúolo e, aparentemente, também o zinco. Os materiais foram também analisados quanto às alterações provocadas na estrutura e ultraestrutura, revelando que para as duas espécies analisadas, os efeitos foram mais drásticos para rabanete do que para milho e, dentre os metais utilizados, os maiores efeitos foram observados nos tratamentos com cádmio e níquel, seguindo-se o zinco. As principais alterações ultraestruturais ocorreram nos cloroplastos das células do parênquima foliar, alterando em diferentes escalas o sistema interno de membranas dos tilacóides, chegando em alguns casos à total destruição da organela. Externamente, as imagens obtidas ao microscópio eletrônico de varredura revelaram alterações nas células guarda dos estômatos para todos os materiais e elementos utilizados quando relacionados aos seus respectivos controles.

Abstract

Some plants are able to uptake and accumulate heavy metals in great quantities while others are very sensitive even to low concentrations, compromising the production and/or the quality of those plants for animal feeding. Cadmium (Cd) is one of the heavy metals with greater toxicity, but even for elements, such zinc (Zn) and nickel (Ni), that are necessary for plant development, when used in high concentration, they can become very toxic. Thus, with the aim of understanding further the effect of those heavy metals, their effects were verified in two species with fast development and very used for human consumption: maize and radish. Initially, analyses were made for germination and growth and both species being sensitive to nickel and cadmium. Zinc only affected radish growth. The study of the translocation of those elements from roots to shoots of the seedlings was accomplished by seeking the phytochelatin determination involved in Cd or Zn chelation and their storage in the vacuole or cytoplasm. The results showed that the cadmium is compartmentalized in the vacuole and, seemingly, zinc as well. The materials were also analyzed with relation to the alterations found in structural and ultrastructural levels, considering that in both species analysed, the effects were more drastic for radish than for maize and, among the used metals, the alterations were more drastic in cadmium and nickel treatments, followed by zinc. The main ultrastructural alterations were found in the chloroplasts of the leaf parenchyma cells, altering to a different degree the internal membrane systems of thylakoids, leading in some cases, to the total destruction of this organelle. On the leaf surface, analyses with scanning electron microscopy, found alterations in the stomata guard cells for all the materials independently of the element used, when compared to their respective controls.

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

Introdução

Metais pesados, como cádmio (Cd), zinco (Zn) e níquel (Ni), vêm cada vez mais representando uma classe de elementos que afeta a vida no planeta, seja por sua toxicidade, seja pela maneira como se acumulam na célula e este é, sem dúvida, o principal motivo pelo qual vem aumentando, a cada dia, o interesse por vegetações muitas vezes singulares que caracterizam solos contendo altas concentrações de metais pesados. Esses habitats podem ocorrer naturalmente como resultado de processos geológicos e da ação de intempéries na formação do solo ou serem resultantes da ação do homem, como acontece na mineração e com os resíduos que podem ser responsáveis pela contaminação do solo por metais pesados, como o cádmio, zinco, cobre e níquel. Esses metais podem ser absorvidos através do solo, ar e água principalmente através de efluentes industriais, mineração, queimadas, vazamento de resíduos, fertilizantes fosfatados por fosfato e adubação através do lodo de esgoto.

A maioria dos organismos vivos só precisa de alguns poucos metais e em doses muito pequenas para completar o ciclo de vida. Tão pequenas que costumamos chamá-los de micronutrientes, como é o caso do zinco, do manganês, do cobalto, do ferro e do níquel. Estes metais tornam-se tóxicos e perigosos, inclusive para a saúde humana, quando ultrapassam determinados limites de concentração. Ao contrário do zinco e do níquel, o cádmio, é um metal que não existe naturalmente em nenhum organismo, nem desempenha funções nutricionais ou bioquímicas em microorganismos, plantas ou animais e, portanto, sua presença em organismos vivos é prejudicial em qualquer concentração e torna-se ainda mais grave pelo fato de ser de natureza acumulativa. Atualmente sabe-se que existem espécies de plantas que apresentam estratégias comuns de tolerância a metais (Baker 1987), e algumas delas são capazes de acumular grandes quantidades na parte aérea (Brooks 1998), o que facilita a sua entrada na cadeia alimentar (Rauser & Meuwley 1995).

O homem é alvo de exposição a contaminantes que colocam em risco sua qualidade de vida, interferindo em sua saúde e sobrevivência (Mutti, 1996). O mais conhecido caso de envenenamento por via alimentar de seres humanos se deu em Toyama

no Japão, em 1947, onde moradores dessa região utilizando águas do rio Jintsu, que recebia os dejetos e resíduos industriais de uma fundição de Zn-Pb, morreram apresentando os mesmos sintomas: inicialmente, fortes dores nas pernas e costas e, com a evolução do quadro clínico, fraturas múltiplas no esqueleto, caracterizando assim a osteomalácia e a osteoporose, com mineralização inadequada da matriz óssea e redução de cálcio decorrente da poluição pelo cádmio (Oga, 1996).

Países em desenvolvimento estão expandindo a produção agrícola e esta expansão muitas vezes significa o uso de espaços próximos das cidades ou ainda o crescimento desordenado ocupando espaços rurais e causando um grande problema ecológico, principalmente devido à origem de metais pesados do lixo doméstico e industrial com conseqüente contaminação do sistema de drenagem (Flowers et al. 1977).

O problema é, antes de tudo, uma conseqüência do desenvolvimento econômico e industrial devido ao grande número de localidades urbanas e rurais em todo mundo que vem sofrendo transformações ambientais decorrentes do acúmulo de bens de consumo descartáveis, produção de lixo e resíduos industriais diversos, necessitando cada vez mais de áreas para vazadouros e aterros sanitários e gerando com isso graves conflitos de usos. Dentre as alternativas existentes, está o beneficiamento dos resíduos sólidos urbanos, com destaque para a compostagem. Vale ressaltar, que no Brasil a quantidade de lixo compostado não atingia 1% no início dos anos 90, enquanto que na Alemanha e na França, estes valores correspondiam respectivamente a 3% e 9% (Grossi, 1993). Como em nosso país os resíduos sólidos urbanos a serem compostados, não sofrem as segregações necessárias desde a fonte geradora, existe a possibilidade do composto orgânico beneficiado apresentar elevados teores de metais pesados. Neste sentido, é importante saber se o fertilizante orgânico encontra-se contaminado com substâncias químicas poluentes e/ou patogênicas.

Mecanismos legais não faltam para assegurar a proteção do meio ambiente e do ecossistema. No Brasil há atualmente dezenas de leis, decretos, resoluções, portarias e medidas provisórias que, apesar de estabelecerem punições muitas vezes severas, não bastam para proteger as nossas riquezas naturais. A atmosfera, as águas superficiais e subterrâneas, os estuários, o mar territorial, o solo, o subsolo e todos os elementos da biosfera continuam sendo alvo de destruição, muitas vezes para atender a grupos

econômicos e/ou políticos que não têm interesse na preservação do meio ambiente, pois isso diminuiria os seus lucros imediatos.

Deste modo, as principais fontes de metais pesados no ambiente são fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais, poluição atmosférica pelas metalúrgicas e queima de combustíveis fósseis, entre outros (Matthews, 1984). Cerca de 90% do Cd e 27% do Zn são perdidos na forma de gases e particulados quando queimados (Tavares & Carvalho, 1992; Egreja Filho, 1993). A mineração contribui com 50% dos metais no ecossistema e o restante provém de atividades industriais (catálise, fabricação de equipamentos elétricos, pintura e pesticidas). Estas substâncias tóxicas também são depositadas no solo ou em corpos d'água de regiões mais distantes, graças à movimentação das massas de ar. Assim, os metais pesados podem se acumular em todos os organismos que constituem a cadeia alimentar do homem. É claro que populações residentes em locais próximos a indústrias ou incineradores correm maiores riscos de contaminação.

Portanto, é de fundamental importância que se conheça os mecanismos pelos quais as plantas podem acumular o Cd e outros metais pesados uma vez que eles podem ser transferidos para a cadeia alimentar de animais e seres humanos (Wang et al., 1991) o que vem merecendo intensos acompanhamentos nos últimos anos (Helal et al. 1996).

São vários os mecanismos pelos quais os organismos podem reduzir a toxicidade causada por metais pesados. Dentre eles pode-se citar: produção de fatores e proteínas ligantes a metais pesados [metalotioninas, glutathione (GSH) e fitoquelatinas], exclusão desses metais pelas células através de transportadores seletivos de íons metálicos e excreção ou compartimentalização (Kaplan et al., 1995; Lee et al., 1996; Cohen et al., 1998; Guerinot 2000; Hu et al., 2001). Um mecanismo pelo qual muitas plantas e algas, aparentemente, detoxificam metais pesados é a produção de prolina (Shah & Dudgey, 1998; Verma, 1999). A acumulação de prolina em plantas estressadas está associada com a redução de danos nas membranas e proteínas (Shah & Dudgey, 1998; Verma, 1999). Síntese de prolina implica na elevação da acidez citoplasmática e pode manter a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ em valores compatíveis com o metabolismo (Hare & Cress, 1997).

Um dos maiores problemas dos mecanismos de defesa é inativar o metal pesado pela complexação do mesmo com compostos como metalotioneínas e fitoquelatinas (Steffens, 1990; Zenk, 1996). Fitoquelatinas são peptídeos ricos em cisteína que têm a capacidade de quelar metal pesado, incluindo Cd, Cu, Zn e Ag. O solo é a principal fonte de metais para plantas vasculares e a raiz é o principal órgão de entrada. Portanto é essencial que as plantas tenham mecanismos capazes de: (a) manter uma concentração interna de metais essenciais numa faixa entre o limite de deficiência e de toxicidade e (b) manter os metais não essenciais abaixo dos níveis tóxicos (Yang et al., 1996a, b; Rauser 1995; 1999; 2000). Plantas quando tratadas com íons metálicos como o Cu^{2+} , Cd^{2+} ou Zn^{2+} produzem peptídeos tióis ou fitoquelatinas $[(\gamma\text{GluCys})_n\text{Gly}]$, sintetizadas a partir de glutatona e que se ligam a metais extracelularmente participando da detoxificação desses elementos, possivelmente através de seu seqüestro para o vacúolo (Meuwly et al. 1995; Rauser, 1999).

Metais pesados, como Ni e Zn, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal de plantas uma vez que são constituintes de muitas enzimas e proteínas. No solo, elevadas concentrações de metais pesados tanto essenciais como não essenciais podem levar à toxicidade e à inibição do crescimento de muitas plantas (Hall, 2002) enquanto que outras sobrevivem, provavelmente pelo desenvolvimento de metabolismo adaptativo.

Há muitos estudos feitos para se observar a interferência do Cd, Zn e Ni em um grande número de processos fisiológicos associados com o crescimento normal em plantas. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos adversos desses metais como fatores de estresse oxidativo (De Vos, 1989; Luna et al. 1994; Weckx & Clijsters, 1996), pois os dados ainda são muito controversos. Desse modo, é cada vez mais necessário um melhor entendimento da nutrição vegetal, principalmente de micronutrientes como o Zn e o Ni, particularmente para o uso de plantas como remediadoras de solos poluídos e na regulação do fluxo desses elementos em plantas superiores. Sabe-se, por exemplo, que Ni e Zn apresentam efeitos fitotóxicos como a estimulação da peroxidação de peptídeos causando uma perda da função nas membranas. O Ni é um elemento carcinogênico às vias respiratórias e há quarenta anos tem sido demonstrado que a exposição ocupacional a esse elemento predispõe o homem ao câncer de pulmão, laringe e nasal (Cassaret & Doull's, 1996).

Estudos epidemiológicos realizados na Inglaterra em 1958, com trabalhadores expostos ao Ni demonstraram que eles apresentaram uma incidência 150 vezes maior de câncer nas vias respiratórias (Sunderman, 1989).

Cd, Ni e Zn estão entre os elementos encontrados em amostras de solos da margem de rodovias, longe, portanto, de áreas industriais. A origem desses metais é bem conhecida: Ni é proveniente da combustão de gasolina que contém esse elemento como aditivo; Cd e Zn são usados como lubrificantes, pneus e partes galvanizadas dos veículos. Tanto o xilema, como o floema, pode translocar Cd na forma de complexos os quais podem ser sintetizados pela reação do metal com pequenas moléculas orgânicas na raiz e daí serem transportadas para a parte aérea (Cabot et al., 1988; Poschenrieder et al., 1983, citados por Gatate et al., 1993).

No decorrer dos últimos anos, houve uma maior preocupação com os efeitos tóxicos de metais pesados, e um reflexo disso é o considerável aumento de trabalhos abordando esse tema em plantas, uma vez que elas são a principal fonte de entrada desses elementos na cadeia alimentar dos animais e seres humanos. Apesar de um número considerável de investigações dos efeitos citotóxicos e mecanismos de estresse de metais pesados, ainda há uma grande necessidade de cada vez mais aumentarem esses estudos a fim de que sejam elucidados vários fenômenos ligados a estes estresses, especialmente em termos metabólicos.

Dentre as plantas cultivadas pelo homem o milho é a mais abundante e, por isso, tem sido usado em muitos estudos de poluição e servido como modelo para o estudo das fitoquelatinas (PC). O rabanete é uma importante dicotiledônea cujos órgãos de estocagem de reservas se encontram em contato direto com o solo. A formação de complexos ligantes de Cd já foi estudada em várias mono e dicotiledôneas. Entretanto, rabanete não está incluído como pertencente àquelas onde o Cd apresenta toxicidade nas raízes (Inohue et al., 1994), apesar de apresentar maiores concentrações desse metal nesses órgãos (Jarvis et al., 1976). Os dados referentes à estocagem de Zn ainda são escassos e pouco esclarecedores (Sauvé et al., 2000), justificando a utilização dessas plantas e deste metal para o aprofundamento dos conhecimentos existentes a respeito até o momento.

Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

Avaliar o efeito do zinco e do cádmio no desenvolvimento inicial de plântulas de milho e rabanete, identificando nas mesmas a(s) região(ões) onde eles se acumulam;

Verificar a indução da formação de fitoquelatinas e a formação de complexos com estes peptídeos;

Verificar o efeito da interação entre Cd e Zn e se ela tem alguma influência na formação de complexos metais-fitoquelatinas;

Analisar as alterações morfológicas induzidas pelo Cd, Zn ou Ni nas duas plantas utilizadas, através da utilização da microscopia de luz e da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

São encontradas várias expressões para designar “metais pesados”: metais traço, elementos traço, micronutrientes, microelementos, entre outros. Definem-se como metais pesados os elementos que ocorrem em sistemas naturais em baixas concentrações e apresentam densidade igual ou acima de 5 g.cm^{-3} (Adriano, 1996; Povinelli, 1987; Egreja Filho, 1993).

Dentre os principais mecanismos de tolerância ou de escape à presença de metais pesados na planta podemos destacar a compartimentalização e a excreção. A compartimentalização caracteriza-se pelo seqüestro desses metais pesados tóxicos no vacúolo e/ou na parede celular (Lichtenberger & Neumann 1997) e parece ser comum em plantas conhecidas como tolerantes. Extracelularmente podemos citar o papel de micorrizas, paredes celulares e exsudados extracelulares. A tolerância pode também envolver a membrana plasmática, pela redução da absorção ou pela estimulação da bomba de efluxo de metais que entram no citossol. O efluxo de íons pela membrana plasmática ou o transporte para dentro do vacúolo são duas maneiras de reduzir os níveis tóxicos de metais no citossol e por isso são mecanismos potencialmente importantes para a tolerância da planta a esses metais (Salt et al. 1998; Sanità di Toppi & Gabbrielli 1999).

Estudos da localização de metais pesados em plantas eram raros no passado devido a dificuldades metodológicas e por isso, apenas há cerca de 70 anos, Prat (1934) iniciou estudos em plantas resistentes a metais pesados analisando o crescimento populacional de *Silene dioica* existente nas proximidades de uma mina de cobre (Cu) e mostrou que estas plantas eram incrivelmente resistentes ao metal quando comparadas às demais, invocando a evolução pela seleção natural como explicação para o fato. Cerca de vinte anos depois, Bradshaw (1952) deu início às pesquisas sobre a diferenciação ecofisiológica existente entre plantas de ambientes ricos em metais e de habitats não contaminados. Entretanto, foi apenas no final da década de 50 que Duvigneaud (1958), analisando vegetações de solos metalíferos na África Central, introduziu o estudo dos processos de especiação em plantas denominadas metalófitas.

Apenas após a aplicação da espectrofotometria de absorção atômica em materiais vegetais (Reilly, 1967) tornou-se possível a sua análise efetiva, dada a

difficuldade existente até então para a medição de pequenas quantidades destas substâncias nos tecidos.

As pesquisas dos anos 60 foram caracterizadas pelo estudo da compartimentalização (sub)celular dos metais, podendo-se citar aquelas referentes à ligação do zinco na parede celular de gramíneas (Peterson, 1969) e sobre o seu acúmulo e do cobre no vacúolo (Reilly, 1967). Foi também estudada a translocação de metais da raiz para a parte aérea das plantas e a sua acumulação em folhas de acordo com a idade das mesmas e a atividade de enzimas estimuladas por metais, as metaloenzimas. Tais estudos revelaram diferenças entre plantas resistentes e não resistentes, dando origem a vários modelos fisiológicos para a sua explicação (Ernest, 1975, Mathys, 1975).

Do início dos anos 70 em diante, houve um aumento do número de grupos envolvidos no estudo dos aspectos fisiológicos e genéticos de plantas resistentes a metais, quase todos voltados à comparação de populações distintamente tolerantes ou linhas isogênicas de uma única espécie à qual se diferenciava apenas na resistência de um ou mais metais (Schat & ten Bookum, 1992), uma vez que essas espécies poderiam servir como indicadoras de ambientes contaminados.

Nos últimos anos houve uma maior preocupação com os efeitos tóxicos de metais pesados, especialmente do cádmio, que aparece ocasionalmente em níveis fitotóxicos em alguns solos utilizados na agricultura, principalmente daqueles mais próximos de regiões industrializadas (Wagner, 1993). Apesar de um número considerável de investigações dos efeitos citotóxicos e mecanismos de estresse deste metal, ainda há a necessidade de elucidar vários fenômenos ligados ao mesmo, especialmente em seus aspectos celulares e metabólicos.

O Cd é encontrado na natureza como elemento traço cuja concentração na crosta terrestre varia de 0,15 a 0,20 mg/kg e a sua principal fonte é o mineral sulfeto de cádmio (CdS). A maior parte do Cd utilizado na indústria foi produzida nos últimos 20 anos (Alloway, 1990). É um elemento usado em alguns fungicidas, baterias, tratamento de borracha, produção de pigmentos e galvanoplastia (Moore & Ramamoorthy, 1984). É largamente usado em inúmeros processos, incluindo a industrialização de plásticos e de eletrodomésticos, bem como em processos de pigmentação (Alloway, 1995, Dudka & Adriano, 1997). Essas indústrias, juntamente com as de mineração e fundição são

responsáveis pela liberação de grandes quantidades do elemento no ambiente e isso vem crescendo a cada ano (Nriagu & Pacyna, 1988).

Hoje é bem aceito e conhecido que a exposição de plantas ao Cd induz a síntese de fitoquelatinas. Esses peptídeos se ligam a metais pesados no citossol e os sequestram para o vacúolo (Rauser, 1995). O tripeptídeo glutathione (GSH) desempenha um papel fundamental na detoxificação de Cd uma vez que é o precursor para a síntese de fitoquelatinas. O grau de tolerância a esse metal está correlacionado com os níveis de glutathione e a capacidade da célula em sintetizar compostos tiólicos (Xiang et al., 2001). Muitas espécies mostram inicialmente uma diminuição de GSH, provavelmente devido a um aumento da sua demanda para o processo de detoxificação (Rawser, 1995). A perda transitória de GSH pode ser um passo crítico pois é acompanhada pela diminuição abrupta da atividade da ascorbato peroxidase, catalase, e glutathione redutase e um significativo acúmulo de H_2O_2 (Schützendübel & Polle, 2002). Um modelo metabólico foi recentemente proposto por Polle (2001), sugerindo que essa perda na defesa antioxidativa explicaria o acúmulo de água oxigenada. A formação desse peróxido após a exposição ao Cd foi detectada em batata, células de tabaco em suspensão e raízes de pinheiro (Schützendübel et al., 2001). Esses dados indicam que apesar do Cd não ser um metal transitório, comumente causa estresse oxidativo em plantas. Visto que H_2O_2 é uma molécula sinalizadora que dispara, entre outras respostas, a morte celular programada, foi sugerido que o Cd pode afetar o sistema redox celular através do acúmulo de H_2O_2 , induzindo defesas comuns da planta e morte celular (Schützendübel et al., 2001).

O cádmio, ao contrário do zinco e do níquel, não apresenta nenhuma função biológica até agora descrita na literatura, portanto não é um elemento essencial para o crescimento vegetal e em ecossistemas naturais é extremamente tóxico tanto para plantas como para animais (Bazzaz et al., 1974; Salim et al. 1992), sendo encontrado em pequenas quantidades nas células humanas onde se acumula principalmente no fígado e rins (Schorroeder & Balassa, 1961), embora tenha sua via de entrada principal através dos pulmões (Hallenback, 1984). A planta absorve esse elemento pelas raízes via transportadores de metais (Lasat et al., 2000; Pence et al., 2000) e após uma prolongada exposição ele é parcialmente translocado para a parte aérea, diminuindo a taxa de crescimento por afetar vários processos fisiológicos da planta. Em várias espécies

vegetais o Cd diminui a assimilação de carbono (Krupa & Bazynski, 1995), pode desencadear estresse oxidativo (Schützendubel et al., 2001) e eventualmente resultar em murcha (Barcelò & Poschenrieder, 1990). Conforme salientado anteriormente a detoxificação é precedida da formação de fitoquelatinas (Grill et al., 1987), de um aumento na expressão de γ -glutamilcisteína sintetase (Haag-Kerwer et al., 1999) e, finalmente, do seqüestro em compartimentos celulares, como a parede celular e o vacúolo (Martinoia et al., 1993; Vogeli & Wagner, 1990).

O cádmio pode ser facilmente absorvido pela raiz e quando em excesso no tecido vegetal causa atraso no crescimento, freqüentemente acompanhado de sintomas de toxicidade tais como escurecimento e atrofiamento da raiz, clorose e necrose foliar, e como consequência pode causar um grande número de distúrbios estruturais e metabólicos (De Agazio & Zacchini, 2001).

As plantas, geralmente, absorvem prontamente os íons metálicos dissolvidos nas soluções do solo, seja na forma livre ou de complexos (K-Pendias & Pendias, 1992). A exposição a concentrações muito altas de Cd, por exemplo, pode reduzir a fotossíntese, inibir o crescimento (Kahle, 1993) e diminuir a absorção de água e nutrientes, podendo levar à morte (Sanità di Troppi & Gabbrielli, 1999). Em nível molecular, a toxicidade do Cd está associada com a formação e quebra das ligações de sulfidrilas e tiolatos metálicos, alterações na estrutura de proteínas secundárias e interferência com a absorção, transporte e metabolismo de nutrientes essenciais (Nies, 1999; Sandalio et al., 2001).

A primeira barreira contra o estresse provocado pelo Cd é, principalmente, a raiz que pode imobilizá-lo na parede celular (Nishizono et al. 1989) e em carboidratos extracelulares como a mucilagem e calose (Wagner, 1993). Entretanto, a importância desses mecanismos pode variar de acordo com a concentração do elemento e da espécie envolvida. Prevenir a entrada desse metal no citossol, através da ação da membrana plasmática poderia, teoricamente, representar o melhor mecanismo de defesa ou de escape. Em sementes de rabanete na fase inicial da germinação o Cd parece entrar na célula através de canais de cálcio da membrana plasmática (Rivetta et al. 1997). Em *Lactuca sativa* e *Lupinus albus* esse elemento provoca um aumento dos níveis de asparagina no exsudado da raiz. Costa et al (1997) relacionam esta resposta às alterações

na permeabilidade das membranas celulares do tecido e não a mecanismos específicos de indução de aminoácido visando a quelação direta do Cd. Não há dúvida de que um entendimento maior desses eventos será muito útil para expandir os conhecimentos sobre a exclusão desse metal em plantas superiores.

Geralmente o Cd tem uma alta afinidade pelo enxofre e seu primeiro efeito é na ATP-sulforilase (De Knecht et al. 1995) e adenosina S-fosfosulfato sulfotransferase (Nussbaum et al 1988). Uma vez dentro do citossol um outro sistema estritamente relacionado ao metabolismo do enxofre é prontamente ativado, resultando na produção das fitoquelatinas (Cobbett, 2000; Leustek et al., 2000). De fato, a exposição ao Cd induz a atividade de enzimas envolvidas na via de assimilação redutora de sulfato e produção de GSH. Outros trabalhos relatam que a indução de atividades enzimáticas envolvidas na produção de GSH, tais como síntese de γ -glutamyl-Cys (γ EC) em milho e glutathione sintetase em ervilha, indicam uma resposta celular para a depleção de GSH transitória durante essa biossíntese (Rüegsegger et al., 1990; Rüegsegger & Brunold, 1992). As bases moleculares dessa resposta foram recentemente resumidas em um estudo com mostarda indiana (*Brassica juncea*), onde o acúmulo de Cd^{2+} induziu uma regulação transcricional coordenada de genes envolvidos na assimilação de sulfeto (Heiss et al., 1999; Lee & Leustek, 1999) e síntese de GSH (Schäfer et al., 1998). Esse estudo mostrou que a ativação geral do metabolismo de enxofre induzido pelo Cd^{2+} está associada a uma diminuição na regulação de um transportador de baixa afinidade por sulfeto, que é provavelmente expresso no cilindro central da raiz e então, possivelmente, na translocação desse ânion. Outros autores sugerem que esse efeito poderia estar relacionado à necessidade de manter níveis altos de sulfeto na raiz e garantir uma alta taxa de assimilação de enxofre durante a síntese de fitoquelatinas (PC). A alteração geral da via metabólica do enxofre, induzida pelo Cd^{2+} , é uma possível sequência do aumento na demanda de GSH impulsionada por essa produção de PC. Em outras palavras, a exposição ao Cd poderia induzir uma “queda adicional” aumentando a necessidade por compostos tiólicos pelas células (Takendorf & Rauser, 1990; Heiss et al., 1999).

Fitoquelatinas foram isoladas e purificadas pela primeira vez por Grill et al. (1985), embora desde 1973 sua presença já vinha sendo observada em folhas de tabaco tratadas com mercúrio (Anelli et al. 1973; Pelosi & Galoppini 1973). Metais pesados, e

particularmente o Cd são capazes de ativar a síntese de fitoquelatinas. Fitoquelatinas formam vários complexos com Cd, devido a presença de grupos tiólicos de cisteínas, os quais quelam esse metal e, como resultado, previnem o citossol da circulação de Cd^{2+} livre (Grill et al. 1985).

Um mecanismo muito significativo na detoxificação e na tolerância ao Cd é desempenhado pela compartimentalização vacuolar, que previne a sua circulação livre no citossol através do seu aprisionamento em uma área limitada. A exposição ao Cd estimula a síntese de fitoquelatinas que rapidamente formam com ele um complexo de baixo peso molecular (LMW) (Vögeli-Lange & Wagner 1990; Abrahamson et al. 1992; Vögeli-Lange & Wagner 1996) e um complexo de médio peso molecular (MMW) caracterizado pela sua ligação preferencial a PC com um nível mais alto de polimerização (Kneer & Zenk 1992). Esses complexos adquirem íons sulfeto (S^{2-}) instáveis em meio ácido, talvez no tonoplasto, formando um complexo de alto peso molecular (HMW) (Speiser et al. 1992) que apresenta uma maior afinidade aos íons Cd.

É importante entender que a detoxificação do Cd parece está relacionada com a capacidade das fitoquelatinas em se ligarem rapidamente aos grupos S^{2-} e conseqüentemente, ao Cd livre. Portanto, particularmente o complexo HMW, altamente estabilizado pelos grupamentos S^{2-} parece ser decisivo na detoxificação (Cobbett & Goldsbrough 2002). Os complexos Cd-fitoquelatina são transportados contra um gradiente de concentração através do tonoplasto por meio de transportadores específicos e se acumulam dentro dessas vesículas em concentrações 38 vezes maiores às que ocorrem na solução do meio externo (Salt & Rauser 1995). O Cd livre, se presente, parece entrar no vacúolo por meio de um antiporte $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Salt & Wagner 1993; Gries & Wagner 1998). No entanto, devido ao pH ácido, os complexos dissociados de HMW e Cd podem ser complexados por ácidos orgânicos vacuolares como o citrato, oxalato e malato e, possivelmente, também por aminoácidos (Krotz et al. 1989).

Em animais, cianobactérias e fungos, Cd e outros metais pesados podem ser complexados e detoxificados por metalotioninas, um grupo de peptídeos rico em Cys (cerca de 30%) codificado geneticamente e geralmente ligado a aminoácidos aromáticos (Kägi 1991). Ainda não há nenhuma indicação na literatura da existência de metalotioninas induzidas por Cd em plantas superiores. Portanto, seu papel na

detoxificação, até o presente, parece ter uma importância secundária quando comparada a das fitoquelatinas e outras proteínas que respondem ao estresse.

As respostas ao cádmio em plantas superiores representam fenômenos altamente complexos. Realmente, se os níveis desse metal forem baixos ($\leq 1 \mu\text{M}$), mas se o tempo de exposição for longo (vários meses ou anos) elas podem responder a esse estresse crônico através de um processo homeostático celular geral, o qual pode também ser comum a outros metais e outros fatores de estresse. Se os níveis forem altos ou muito altos ($>$ ou $\gg 1 \mu\text{M}$) e a exposição for curta (horas, dias ou semanas) as plantas podem orientar esse estresse agudo induzindo uma resposta rápida para detoxificar esses íons e reparar eficientemente os danos causados (Vögeli-Lange & Wagner 1996).

Tem-se demonstrado que Cd induz a formação de espécies reativas a oxigênio (ROS) (Shützendübel et al., 2001). A sua interação com sistemas antioxidativos em microorganismos e animais tem sido estudada (Zikic et al., 1997), mas apenas recentemente tem-se verificado o seu efeito na atividade de enzimas como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR) em plantas (Cardoso et al., 2002; Ferreira et al., 2002; Pereira et al., 2002).

Embora a concentração tipicamente encontrada no ambiente seja baixa quando comparada com outros metais encontrados em traços como zinco e cobre, estudos recentes sugerem que o Cd pode ter efeitos não só na saúde, mas também na dinâmica populacional e na distribuição de espécies no ecossistema (Larison et al., 2000). Segundo Cataldo et al. (1983), o processo de absorção pela raiz pode ser ativo para concentrações acima de $0,5 \mu\text{M}$, ou passivo abaixo desses valores. Espécies vegetais variam na sua capacidade de acumular Cd. Como regra geral, o conteúdo é normalmente mais alto na raiz que na parte aérea, entretanto, espinafre e alface apresentam concentrações maiores na folha que na raiz (K-Pendias & Pendias 1984). Davies (1980) constatou que em gramíneas, 65 a 90% do total de Cd na planta estava concentrado na raiz.

Sabe-se que a diminuição de clorofila em plantas tratadas com Cd se deve à diminuição da fotossíntese e principalmente à deficiência de ferro (Vassilev et al., 1998). Küpper et al. (1996) relatam que o átomo de magnésio presente no anel pirrólico da clorofila pode ser substituído por metais pesados como mercúrio, cobre, cádmio, níquel, zinco ou chumbo afetando as funções fotossintéticas. A diminuição da troca

gasosa induzida por esse elemento pode ser explicada pela indução do fechamento dos estômatos, reduzindo a atividade fotossintética. Uma diminuição da transpiração ou um aumento da resistência estomática tem sido descrito em muitos estudos como resultado da exposição de plantas a concentrações tóxicas de Cd^{2+} (Barcelò & Poschenrieder, 1990). Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse fechamento estomático induzido não estão elucidados: ele poderia ser causado por uma interação direta com o metal nas células-guarda ou ser uma consequência do efeito tóxico em outros tecidos da planta, causando uma diminuição da disponibilidade de água nas folhas, o que sugere que a inibição da fotossíntese se deva principalmente à limitação do acesso ao CO_2 (Vassilev et al., 2002). Há outros autores que sugerem uma natureza mais complexa para explicarem os efeitos do metal na fotossíntese (Marchiol et al., 1996) e, por isso, mais estudos devem ser realizados para a total elucidação do assunto. Estudos ultraestruturais relatam a desorganização dos *grana* e aumento do número e tamanho dos plastoglôbulos no cloroplasto, bem como o aumento da célula e tamanho do vacúolo (Rascio et al. 1993).

O excesso de Cd pode induzir a deficiência e desbalanço de importantes nutrientes minerais como o Fe, Mn, Mg, K e Ca (Lindon & Henriques, 1993) através da redução da absorção e da translocação por competição, interferência nas membranas de células radiculares, efeito nas ATP-ases e outros transportadores, diminuição na respiração radicular, aumento de injúria na raiz retardando o seu crescimento e resultando numa diminuição do meristema apical e dano na permeabilidade das células da raiz (Greger et al., 1993). Por outro lado, a diminuição de nutrientes também é causada pela perda decorrente de injúria na raiz ou de uma imobilização dos elementos nela mesma, resultando numa deficiência desses nutrientes na parte aérea (Siedleska, 1995).

Os problemas causados pelo Cd são considerados muito sérios e, dentre muitos, podemos destacar as doenças cardiovasculares, anemias, lesões ósseas, cerebrais e nefropatias, aminoacidúria, glicosúria, hipercalcinúria e, acredita-se também que pode ter efeitos mutagênicos e teratogênicos (McCaul, 1971; Page & Bingham, 1973; Sirouver & Loeb, 1976; Hallenback, 1984; Foulkes, 1990; Waalkes et al., 1992; Carrol, 1996). Além disso, a exposição crônica ou tóxica do Cd em animais e seres humanos

pode induzir uma variedade de problemas, incluindo danos ao fígado (Hellstrom et al. 2001), atraso no desenvolvimento e câncer de próstata (Desi et al., 1998). Hoje, uma das grandes preocupações se refere à alimentação com vegetais pois sabe-se que 70% do Cd ingerido pelo homem é proveniente de sua dieta com produtos vegetais (Wagner, 1993).

Excesso de metais, simples ou em misturas, ocorrem em vários solos poluídos em regiões industrializadas em todo o mundo. Calculando o risco de Cd em ambientes agrícolas, Chaney (1993) enfatiza a necessidade de estudar o Cd juntamente com o Zn na razão geoquímica de 1 µg de Cd:100 µg de Zn. Interações entre Cd e Zn já são conhecidas: Zn reduz a absorção de Cd mais que Cd reduz a absorção de Zn (Jarvis et al., 1976; Cataldo et al., 1983). Fitoquelatinas são encontradas em raízes de *Acer pseudoplatanus* L. e *Silene cucubalus* Wibel em solos ricos em Zn e próximos a lixões. As raízes e as folhas de três plantas que cresceram próximas a lixos de mineração de cobre não continham complexos de alto peso molecular de PC, mesmo quando Cd e Zn apareceram quelados por ligante(s) de baixo peso molecular não identificado(s) (Leopold et al., 1999).

O Zn é um micronutriente essencial para todos os seres vivos, e sua entrada no organismo está também associada à dieta e, como todo nutriente, pode ser tóxico em altas concentrações (Wang et al., 1992). Mais de 200 metaloenzimas requerem Zn como cofator. A absorção excessiva desse metal pode levar a um quadro de intoxicação, onde os sintomas mais frequentes são vômitos, diarreias e cólicas. A inalação de vapores de Zn produzidos nos processos de solda e fabricação de ligas pode causar grande irritabilidade e lesões no sistema respiratório (Brito Filho, 1988). Ele participa da formação de auxinas, pois é essencial à síntese do aminoácido triptofano, precursor do AIA (Ácido Indol Acético). Portanto, plantas deficientes em zinco, são menores, raquíticas e com internódios curtos, com cloroses internervais, folhas lanceoladas, botões florais reduzidos, com pequena produção de frutos os quais são menores. Os passos metabólicos da síntese de lipídios como substância de reserva em sementes são catalisados pela enzima aldolase na presença de zinco, possibilitando com isso maior granulação que refletirá no aumento de peso e obviamente no rendimento da cultura. A deficiência de Zn está geralmente relacionada com seu baixo teor em nossos solos, o que dificulta sua absorção pelas plantas.

A manifestação dos efeitos tóxicos do Zn está associada à dose e pode distribuir-se por todo o organismo, afetando vários órgãos, alterando os processos bioquímicos, organelas e membranas celulares. A maior parte dos efeitos tóxicos do zinco está relacionada à sua combinação com outros metais pesados e contaminação durante os seus processos de extração e concentração. As cinzas do metal nunca são completamente puras, podendo estar misturadas a outros metais como cádmio e níquel. Seus efeitos fitotóxicos começam a se fazer sentir quando as folhas apresentam cerca de 300-1000 μg de Zn.g^{-1} de matéria seca, diminuindo drasticamente a produtividade da cultura (Chaney, 1993). Devido à galvanização industrial e uso agrícola como fertilizante, o Zn vem sendo extensamente disperso causando uma concentração fitotóxica em algumas áreas. Com a diminuição do pH do solo, esse micronutriente torna-se muito mais solúvel e disponível para a planta absorver, aumentando o risco de fitotoxicidade (Chaney, 1993). Em curto prazo, o desenvolvimento de sistemas de produção vegetal não afetado pela fitotoxicidade do Zn pode fazer com que se tenha uma opinião favorável ao uso desses solos como potencialmente agrícolas. Em longo prazo, entretanto, a descontaminação é a alternativa mais desejada para se prevenir a dispersão da poluição e sua transferência para a cadeia alimentar e recursos hídricos. As principais fontes poluidoras de Zn no solo são as atividades de mineração, uso agrícola de lodo de esgoto ou biossólido e materiais compostados, bem como o uso de agroquímicos, tais como fertilizantes e pesticidas que contêm zinco. Cd e Zn reagem de uma maneira similar nos sistemas biológicos (Nieboer & Richardson 1980) sugerindo que os mecanismos de regulação da absorção de elementos essenciais são os mesmos daqueles para metais não essenciais com similaridade químicas (Turunen, 1985). O controle da taxa de absorção de Zn pode ser um fator crítico para a sobrevivência e desenvolvimento de plantas em ambientes contaminados por metais pesados. A transição do Zn tem um papel essencial no metabolismo da planta, animais e fungos. Algumas plantas resistentes são capazes de atuar como hiperacumuladoras e, conseqüentemente, podem ser usadas como remediadoras de áreas poluídas por excesso de Zn. O mesmo pode ser dito em relação às plantas hiperacumuladoras de Cd.

Há uma vasta literatura sobre plantas resistentes a altas concentrações de Zn (Woolhouse, 1983, Baker, 1987). Essa resistência pode se dar através da exclusão ou pela

via de tolerância interna do Zn (Taylor, 1987). Há relatos sobre o papel da compartimentalização do Zn em folhas como um mecanismo de evitar os efeitos tóxicos desse metal na parte aérea (Brune *et al.* 1994).

O fato de que a concentração total de Zn aumenta quando se aumenta o seu suprimento, tanto em plantas tolerantes como em plantas não tolerantes, sugere uma fraca regulação da taxa de absorção desse micronutriente. Clarkson e Lüttge (1989) apontam dois fatores principais de controle da sua concentração: o potencial de membrana que permite um alto acúmulo de cátion mesmo a partir de soluções diluídas e a baixa solubilidade do fosfato de zinco no pH citoplasmático. O Zn pode estar presente como um ligante orgânico tanto no solo como dentro da planta (Norvel & Welch 1993), embora a sua absorção seja devida ao balanço cooperativo entre vários processos (Wirén *et al.* 1996) como, por exemplo, influxo, efluxo ou ambos simultaneamente.

Os elementos são ditos essenciais quando a sua total ausência no organismo provoca sérios e irreversíveis danos. O níquel (Ni) é um nutriente para organismos superiores encontrando-se, no homem, em maiores concentrações nos pulmões, rins e tecidos produtores de hormônios. Ocupa a 24ª posição em abundância na crosta terrestre e suas principais fontes são os minérios na forma de sulfeto (McGrath & Smith, 1990) e é usado, principalmente, na produção de ligas, na indústria de galvanoplastia, fabricação de baterias (Ni-Cd), indústria de petróleo, pigmentos e catalizadores (Lester, 1987). Entre as fontes que contribuem para a elevação do Ni nos solos, estão os minerais agrícolas como fertilizantes fosfatados que possuem uma pequena porção de níquel, a deposição atmosférica resultante da queima de combustíveis e óleos, combustão de carvão, fundição, mineração e aplicação de lodo de esgoto no solo (McGrath & Smith, 1990; Malavolta, 1994).

A planta absorve o níquel, particularmente de solos ácidos (Farago & Cole 1988). Ele é um componente de várias enzimas de bactérias, incluindo urease e certas desidrogenases. Em níveis elevados, o níquel interfere na absorção de ferro e inibe o seu metabolismo (Agarwala *et al.*, 1977), bloqueia a atividade respiratória e desnatura o protoplasma celular em repolho (Niethammer, 1931), aumenta o conteúdo de pectina em raízes de aveia (Crooke, 1958), diminui a concentração de clorofila em folhas de café (Pavan & Bingham, 1982), diminui a atividade da catalase, ao concorrer com o ferro na

sua posição no grupo protoporfirínico da enzima (Granick, 1951), aumenta a atividade da peroxidase e provoca distúrbios mitóticos nas pontas das raízes de algumas plantas (Mishra & Kar, 1974).

Dentre os aspectos positivos do níquel para a planta, destacam-se a sua participação na estrutura e funcionamento da enzima urease (Dixon et al., 1975), enzima que atua na hidrólise da uréia; a influência na hidrogenase, presente no bacterióide que realiza a fixação de nitrogênio em leguminosas (Klucas et al., 1983) e a participação na síntese de fitoalexinas, que melhoram a resistência das plantas às doenças (Walker et al., 1985). Por apresentar-se quelatizado no lodo de esgoto, torna-se facilmente disponível para as plantas, podendo, então, ser altamente fitotóxico (K-Pendias & Pendias, 1984).

Algumas plantas têm a particularidade de concentrar teores elevados de certos elementos. Este fator pode revelar-se de suma importância na recuperação de solos com elevada concentração de metais ou no estudo do metabolismo de organismos vivos. Conhecem-se atualmente seis enzimas que requerem níquel para a catálise. São elas a urease (Jabri et al., 1995), superóxido dismutase (SOD) (Youn et al., 1996), NiFe hidrogenases (H_2 ase) (Volbeda et al., 1995), metil coenzima M redutase (MCR) (Ermler et al., 1997), dehidrogenase de monóxido de carbono (CODH) e acetil coenzima A sintase (ACS). Adicionalmente, existem proteínas que servem para "entregar" e "montar" os íons níquel nos seus sítios ativos em algumas dessas proteínas.

Por todo o exposto, muito ainda deve ser feito para que se conheça de maneira detalhada a forma como os metais pesados são absorvidos e as efetivas razões de sua toxicidade. Por se tratarem de resíduos ou subprodutos das atividades industriais humanas, o controle de sua dispersão e a descoberta de mecanismos que auxiliem na biorremediação de solos contaminados tem merecido investimentos cada vez maiores. Isto vem possibilitando, cada vez mais, a realização de inúmeros projetos de suma importância para os ecossistemas em geral e para a melhoria da saúde das espécies animais, em especial a do homem.

Capítulo 3

**Maize and radish sequester excess cadmium and zinc
in different ways**

Aceito: Plant Science

1 Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways

2

3 J. Francisco Souza^a, Wilfried E. Rauser^{b*}

4 ^a *Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas,*
5 *SP, Brazil.*

6 ^b *Department of Botany, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1 Canada*

7

8

9 Address for proofs: Dr. W.E. Rauser

10 18 Elginfield Drive

11 GUELPH, Ontario

12 N1E 4E6 Canada

13

14

15 * Corresponding author. Tel.: 519 821-0303; fax: 519 767-1991

16 *E-mail address:* (W.E. Rauser)

17

18 Received

19

Abstract

The aims were to compare the reactions of radish and maize to excess cadmium (Cd), zinc (Zn) and Cd+Zn in terms of metal extractability and the amounts of metal in roots and shoots bound through phytochelatins. Seedlings were grown in hydroponics and exposed to 1 μ M Cd, 50 μ M Zn and their combination for 10 and 15 days. Tissues were extracted with buffer followed by acid. Buffer soluble metal was resolved by small-scale gel filtration.

Six buffer extracts removed 87 to 95% of the Cd from roots of radish and maize, 43 to 57% of the Zn in their roots, yet 71 to 86% of the Cd and Zn in shoots. Acid removed most of the remaining metal. Buffer soluble Cd yielded three peaks including a prominent high molecular weight phytochelatin-based complex and the low molecular weight counterpart. In radish these complexes accounted for 69% of the Cd in the roots and 42% of the Cd in shoots, for maize 88% in the roots and 27% in the shoots. Most buffer soluble Zn (83-87%) from radish and maize roots and shoots eluted close to the total volume of the gel filtration column. A small Zn peak (4-7%) corresponding to the high molecular weight Cd-binding complex was found in maize, not in radish. Phytochelatins were not prominent ligands for Zn in maize and not at all in radish. The ligands for most of the Zn remain unidentified.

Keywords: *Raphanus sativus* L.; *Zea mays* L.; cadmium; zinc; complexes; phytochelatins

1 **1. Introduction**

2 Exposure to excess metals causes production of phytochelatins (PCs) in a variety of
3 plants and algae [1]. Of the various metals tested, cadmium (Cd) was the most effective
4 in promoting PC production, others such as copper, zinc (Zn), silver and mercury were
5 less effective in the same species [1,2]. Root tips of maize exposed to Zn produced PCs
6 [3], however, cultured tobacco cells exposed to Zn did not form the peptides found with
7 Cd exposure [4]. Phytochelatins are synthesized from glutathione (GSH, γ ECG) by the
8 constitutive enzyme PC synthase [1]. Bis(glutathionato)-Cd and GSH are the initial
9 substrates for the enzyme to form Cd-PC₂ or Cd(γ EC)₂G [5]. The product Cd-PC₂ and
10 further GSH are the substrates for chain extension into the next higher order. Cd-PCs of
11 various lengths form Cd-binding complexes in vivo. Cytosolic low molecular weight
12 (LMW) and vacuolar high molecular weight (HMW) PC-based Cd-binding complexes
13 were present in cultured plant cells [6] and whole tissues [2,7,8,9,10]. PC synthase also
14 uses bis(glutathionato)-Zn to form Zn-PC₂ [5]. Therefore, like the situation for Cd, it is
15 predicted that Zn-binding complexes form with various PCs. However, the evidence for
16 Zn-PC complexes in vivo is weak. The Zn complex from cultured cells of *Rauvolfia*
17 *serpentina* Benth. easily lost Zn [11]. Root cultures of *Rubia tinctorum* L. produced PCs
18 with 11 metals yet the only PC-based complexes found in vivo were with Cd, Ag and Cu,
19 not with Zn [2]. High molecular weight Cd-binding complexes were found in cabbage
20 leaves and cultured cells of tomato and *Silene vulgaris* (Moench) Garke, yet Zn did not
21 elute with Cd, rather it appeared later with unidentified ligand(s) [12,13,14]. Attempts to
22 exchange Zn for Cd failed with Cd-binding peptide from tobacco [4].

1 The dominant view is that PCs function to bind excess metals intracellularly, thus
2 detoxifying them and protecting cellular metabolism [1]. How much of the metal in cells
3 or tissues is actually sequestered as PC-based complexes has received attention only
4 recently. One way of assessing such a particular function is to fully extract metal-binding
5 complexes with buffer, partition the combined buffer extracts into PC-based complexes
6 and calculate how much of the tissue metal is in that form. Such information is available
7 only for Cd in maize seedlings [8,9]. Six sequential buffer extractions solubilized 93 to
8 96% of the Cd in roots and 86% of that in shoots. The LMW and HMW PC-based
9 complexes together accounted for 70 to 88% of the Cd in roots, 29% of the Cd in shoots.
10 At the low external concentration of 0.1 μM Cd and with exposures less than 4 days the
11 proportion of root Cd as PC-based complexes was less than that reported above [9].
12 These data suggested that under particular circumstances PCs functioned in the predicted
13 way in maize roots but in a lesser manner in shoots, as if cellular constituents other than
14 PCs bound appreciable quantities of Cd. Equivalent data for other species and metals
15 such as Zn are not available.

16 Excess metals, either singly or in mixtures, occur in variously polluted soils in
17 industrialized regions worldwide. In assessing the risk of Cd in agricultural environments
18 Chaney et al. [15] emphasized the need to study Cd along with Zn in the normal
19 geochemical ratio of 1 μg Cd: >100 μg Zn. Interactions between Zn and Cd are known.
20 Zinc reduced Cd uptake more than Cd reduced Zn uptake [16,17]. Phytochelatins were
21 found in roots of *Acer pseudoplatanus* L. and *Silene cucubalus* Wibel growing in a Zn-
22 enriched mine dump, however, the PC concentrations were low compared to the Zn in the
23 tissues [18]. The roots and leaves of three plants growing on a medieval copper mining

1 dump did not contain HMW PC-complex, rather Cd and Zn appeared chelated by
2 unidentified LMW ligand(s) [14].

3 Maize is a common and important agricultural crop worldwide that has been used in
4 many studies of elemental pollution and has served as a model system for studies on PCs.

5 ~~Radish is an important, common dicotyledonous vegetable whose storage root-stem~~
6 portion is in direct contact with soil. Like many other species Cd concentrations in radish
7 were greater in roots than shoots [16]. Formation of Cd-binding complexes were studied
8 in several mono- and dicotyledonous plants, however, radish was not included beyond
9 establishing Cd toxicity to roots [19]. The critical tissue concentration of Cd in radish
10 leaves was similar to that in maize shoots, equivalent data for Zn in radish were not
11 available [20]. Radish belongs to the Brassicaceae, as does *Brassica juncea* shown to
12 contain LMW and HMW PC-based Cd-binding complexes [10] and *Arabidopsis thaliana*
13 for which the mechanisms of PC synthase activation by Cd and Zn are known [5].

14 The purpose of this study was to evaluate the commonalities and differences in the
15 reactions of radish and maize seedlings to 1 μ M Cd, 50 μ M Zn and their combination. A
16 dose response curve with radish established a workable concentration of excess Zn for
17 comparison to the relatively Zn-insensitive maize. The objectives were to evaluate the
18 extractability of Cd and Zn with buffer from roots and shoots, how buffer soluble Cd and
19 Zn were partitioned by small-scale gel filtration, which metal-binding complexes were
20 based on PCs, and to quantify the amount of Cd and Zn bound by PCs in roots and shoots
21 of radish and maize. The interactions between Cd and Zn, at the μ M ratio of 1 Cd:50 Zn,
22 were evaluated through metal concentrations in roots and shoots and the quantity of tissue
23 metal bound through PC-based metal-binding complexes.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Radish seeds (*Raphanus sativus* L. cv. redondo vermelho) and maize grains (*Zea mays* L. cv. AG 303) were imported commercial cultivars from Brazil. Radish and maize were planted in a row near one edge of a moist paper towel, covered with another moist paper towel and rolled loosely into a scroll. Several scrolls with radish or maize at the top were placed vertically in a semitransparent polypropylene container (28 cm x 17.5 cm x 12.3 cm deep) and covered with another. Radish was germinated in a controlled environment room at 22 to 23 °C, maize in an illuminated incubator at 28 °C. After 5 days, uniform seedlings were transplanted into aerated nutrient solution containing: 2.5 mM KNO₃, 2.5 mM Ca(NO₃)₂, 1 mM MgSO₄, 10 µM KCl, 23.1 µM H₃BO₃, 4.57 µM MnCl₂, 0.39 µM ZnSO₄, 0.06 µM H₂MoO₄, 18 µM FeSO₄, and 0.2 µM NiSO₄. Excess Cd and Zn were added as the sulfate salts. Solutions were prepared with domestic deionized water, initial pH ranged from 5.2 to 5.8. The plants were kept in a controlled environment room at 22 to 23 °C. Daylight fluorescent tubes and incandescent bulbs on a 16h/8h light/dark cycle provided photosynthetic active radiation (400-700 nm) of 100 to 170 µE m⁻² s⁻¹ at plant height for short and tall containers, respectively. Two types of containers were used. For the dose-response curve and uptake of metals four seedlings were grown in 2 l of nutrient solution in a polyethylene bag held in a 24 cm tall x 10 cm square opaque polyvinylchloride container. The lowermost part of radish hypocotyls was held in a slit of a narrow 2 cm diameter foam plug wedged into a 17 mm diameter hole in 10 cm square opaque polyvinylchloride lids. Maize seedlings were held in a similar way but around the topmost part of the primary root. For production of larger amounts of plant material, 30

1 or 50 radish seedlings and 30 maize seedlings were held by foam plugs in 20 x 30 cm
2 opaque polyvinylchloride lids over 4 l of nutrient solution in polypropylene tanks covered
3 with two layers of black plastic. Nutrient solutions were replaced every other day during
4 10- and 15-day exposures.

5 At harvest the intermeshed radish roots were cut from the hypocotyls and desorbed for
6 10 min in 5 l of ice-cold 5 mM CaCl_2 and blotted. The roots of 4 to 6 maize seedlings
7 were desorbed in the same way while attached to their shoots, excised and blotted. For
8 the dose response curve and the study of metal uptake, the blotted roots were placed in
9 pre-weighed glass test tubes, weighed, dried at 80 °C for 24 hours in a forced air oven,
10 reweighed and then wet ashed. Shoots were treated similarly in 50 ml beakers. For
11 extraction and analysis of complexes, blotted roots and shoots were weighed in aluminum
12 pouches, frozen in liquid N_2 and stored at -75 °C until further use.

13 *2.2. Extraction and small-scale gel filtration*

14 Frozen roots and shoots were extracted with buffer and acid [9]. Briefly, the tissue was
15 homogenized with N_2 -purged 100 mM Hepes pH 8.6, 1 mM phenylmethylsulfonyl
16 fluoride and 0.2% (v/v) Tween 20 using 1 ml of buffer per gram fresh weight (FW) of
17 tissue. After centrifugation the volume of supernatant was measured, sampled for metal,
18 and frozen immediately in liquid N_2 . The pellet was suspended in a volume of
19 reextraction buffer (10 mM Hepes, pH 8.6, 0.04% Tween 20) 1.5 times that of the tissue
20 FW, centrifuged and the supernatant added to the first one and frozen. A total of five
21 reextractions with buffer were followed by three extractions of the pellet with 100 mM
22 HCl. The plant residue was ashed overnight at 425 °C.

1 Samples of lyophilized buffer extracts were chromatographed on a Superdex® Peptide
2 column (HR 10/30, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Baie d'Urfé, Que.) using a
3 metal-free high performance liquid chromatograph (HPLC) pump (model BioLC, Dionex
4 Corp. Sunnyvale, CA) and PEEK (polyetheretherketone) tubing [9]. The equilibrating
5 and developing solvent was helium-sparged 10 mM Hepes pH 8 and 300 mM KCl at
6 ambient temperature and flowing at 0.5 ml/min. Fractions for Cd and/or Zn analysis were
7 collected at 1.2 min intervals over 54 min. The column was then washed and equilibrated.

8 *2.4. Analytical methods*

9 Dried root samples were ashed with 5 ml ultra pure HNO₃ at ~125 °C until clear. Dried
10 shoots were allowed to soak in 10 ml acid and were heated when frothing had subsided.
11 Digested ash was dissolved in 0.4 M HNO₃ and transferred quantitatively into a 10.0 ml
12 volumetric flask. Cd and Zn were analyzed by flame atomic absorption spectrometry
13 (model SpectrAA-200, Varian, Inc., Walnut Creek, CA). Samples of standard spinach
14 leaf reference material 1570a (National Institute of Standards and Technology,
15 Gaithersburg, MD) were digested alongside radish and maize samples. Cd was analyzed
16 at 81-88% of the standard, Zn at 91-97%. No corrections were made to the radish and
17 maize data because Cd and Zn concentrations in the standard material were greatly
18 exceeded by those in the samples from excess metal treatments (8- to 171-fold higher in
19 the case of Cd, 9- to 35-fold higher for Zn).

20 Phytochelatins and related thiols were analyzed by HPLC and continuous postcolumn
21 reaction with 1.8 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB); peaks were identified
22 according to established patterns [21]. Frozen root and shoot samples were homogenized
23 with N₂-purged ice-cold 100 mM HCl and 5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid in a

1 cold mortar and pestle under a stream of N₂. One gram of tissue was homogenized with 1
2 ml extractant. The homogenate was sedimented twice for 5 min in a microcentrifuge. The
3 supernatant was passed through a 0.45 µm filter and 700 µl of filtrate was injected onto
4 the HPLC. Two hundred and fifty µl of filtrate was measured into an amber vial and
5 frozen for later determination of monothiols.

6 Monothiols were measured in acid extracts of tissues and in sub samples of peak III
7 from Superdex[®] gel filtrations. The details of preparing sub samples of peak III material
8 have been described [9]. All samples were derivatized with monobromobimane at 45 °C
9 for 30 min in the reagents used by Rijstenbil & Wijnholds [22]. Twenty-five to 50 µl of
10 derivatized thiols were separated on the same HPLC column used for PCs and related
11 thiols. For this application three mobile phases were used: aqueous 10% (v/v) acetonitrile
12 (ACN) 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), aqueous 20% ACN 0.1% TFA, and 100%
13 ACN 0.1% TFA. The column was developed with the following linear profiles: 10 to
14 16% ACN in 20 min, 16 to 100% ACN in 1 min, holding at 100% ACN for 2 min, 100 to
15 10% ACN in 1 min, and equilibration with 10% ACN for 15 min prior to injection of the
16 next sample. The flow rate was 1 ml/min, the column at 37 °C. Fluorescence was detected
17 with a dual monochromator instrument (Model FL-45A, Bioanalytical Systems, Inc.,
18 West Lafayette, IN) with excitation at 380 nm and emission at 470 nm through 8 nm slits.
19 Signals were captured with a model 4290 integrator (Varian, Inc., Walnut Creek, CA).
20 The molar responses were linear up to 3,000 pmol monothiols and indistinguishable for
21 standard γGluCysGly, γGluCys and γGluCysGlu, yet 12% lower for cysteine.

22 The pots and the larger containers for bulk samples of treatments were placed
23 randomly on the table in the growth room. Analysis of variance was performed with

1 SigmaStat v 2.03. The data on thiols, the gel filtration profiles and the quantitative
2 histograms are representative of two independent experiments.

3 **3. Results and Discussion**

4 *3.1 Radish seedlings are relatively sensitive of excess zinc*

5 One μM Cd was a concentration known to elicit measurable biochemical effects in
6 maize [9]. It was postulated that the same would occur in radish. To assess Cd+Zn
7 effects, the intention was to compare the response of radish and maize to 1 μM Cd and
8 200 μM Zn or 1 μg Cd:116 μg Zn as suggested for Cd+Zn co-pollution [15]. In a
9 preliminary experiment dry weight (DW) yields of roots and shoots of maize were the
10 same or slightly larger than those of controls for seedlings grown for 15 days with 200
11 μM Zn, either alone or along with 1 μM Cd (data not shown). However, radish seedlings
12 were severely stunted by 200 μM Zn. A workable concentration of excess Zn was derived
13 from a dose response curve (Fig. 1A). The yields of radish roots and shoots from
14 seedlings were stimulated or unchanged by Zn up to 25 μM . Fifty μM Zn depressed dry
15 matter yields of roots by 28% and of shoots by 24%, higher concentrations of Zn were
16 progressively more toxic. At the time of transplanting the first true leaf was in bud, by the
17 end of the 15-day exposure true leaves contributed 63 to 75% of the shoot dry mass with
18 Zn treatments up to 50 μM yet only 15% with 200 μM Zn.

19 The choice was to use 50 μM Zn because growth was not hampered excessively and
20 Zn concentrations in the tissues were elevated (Fig. 1B). All further comparisons between
21 radish and maize used 1 μM Cd and 50 μM Zn either alone or in combination. One μM
22 Cd + 50 μM Zn gave a ratio of 1 μg Cd:29 μg Zn, about 4-fold lower than the usual
23 geochemical ratio of 1 μg Cd:>100 μg Zn found in several co-pollution situations [15].

3.2 Accumulation of Cd and Zn in roots and shoots and distribution of metal

Dry weight yields of radish roots and shoots in seedlings exposed to 1 μM Cd or 50 μM Zn were not significantly changed from controls, however, the Cd+Zn treatment significantly depressed DW yield of roots (Table 1). The three metal treatments did not affect DW yields in maize seedlings.

Roots of seedlings were desorbed for 10 min in 5 mM CaCl_2 in an effort to remove Cd and Zn from root surfaces and cell walls. For maize and the fine roots of the grass *Agrostis gigantea* it was predicted that such desorption removed 90% of the Cd from cell walls and no significant amount from the Cd-binding peptide fraction [23]. It was assumed that the same applied to Cd in the fine roots of radish. In the absence of equivalent information on Zn desorption from roots of either species, it was assumed that the Zn concentrations in roots (Table 1) reflected, at a minimum, the removal of nutrient solution Zn from their surfaces. Since shoots were not desorbed the concentrations of metals reflected Cd and Zn adsorbed to cell walls and present within cells.

The concentrations of Cd and Zn were elevated in roots and shoots of seedlings presented excess Cd, Zn or Cd+Zn (Table 1). In radish seedlings treated with excess Cd+Zn, the presence of 50 μM Zn markedly decreased Cd concentrations in roots and shoots, however, the presence of 1 μM Cd decreased Zn concentration somewhat only in roots. The same patterns were evident for maize seedlings. That Zn reduced tissue Cd more than Cd reduced tissue Zn matched interactions reported previously [16,17]. The distribution of metal between roots and shoots was assessed as the proportion of plant metal retained by roots. Retention of Cd by radish roots was reduced from 47 to 55% in seedlings growing in basal Zn (0.39 μM) to less than 38% for those grown with 50 μM

1 Zn (Table 1). In contrast, maize roots showed high retention of plant Cd (up to 88%) for
2 seedlings grown in basal or excess Zn. Less than 35% of the plant Zn was retained in
3 roots of radish seedlings exposed to excess Zn alone or with Cd. Two-fold higher
4 retention (64-71%) of plant Zn occurred in roots of maize seedlings grown with excess
5 Zn alone or with Cd. The lower retention of Zn by radish roots compared to maize
6 resulted in 2-fold higher Zn concentrations in shoot tissues and perhaps greater biological
7 stress from the elevated Zn.

8 *3.3 Cadmium is a better inducer of phytochelatin-type peptides than Zn*

9 Monothiol and polythiol were measured by HPLC in acid extracts of roots and
10 shoots of radish (Table 2) and maize (Table 3) seedlings after 15-day exposures to control
11 nutrient solution and excess Cd, Zn, and Cd+Zn. The HPLC separations with detection by
12 DTNB did not allow reliable determination of cysteine, and in some cases glutathione
13 (γ ECG) and γ EC were not integrated separately. For these reasons the monothiol were
14 measured as the fluorescent biman derivatives. Since the samples were reduced prior to
15 derivatization, the glutathione concentrations shown represent both glutathione +
16 glutathione disulfide originally present in the tissue.

17 Exposure to Cd caused radish roots to produce PC_2 or $(\gamma EC)_2G$ and the related
18 polythiol $(\gamma EC)_2$, $(\gamma EC)_2E$, variant $(\gamma EC)_3$, and $(\gamma EC)_3$ (Table 2), much like the reaction
19 in maize (Table 3). In radish the reaction was stronger in roots than shoots, a feature not
20 found in maize. The variant $(\gamma EC)_3$ was most abundant in radish roots, whereas in another
21 member of the Brassicaceae, *Brassica juncea*, the di- and trithiol were 8-fold more
22 concentrated and PC_4 was most abundant after three days of 1.8 μM Cd [24]. The

1 accumulations of PCs and related peptides in roots of maize cv. AG303 (Table 3) were
2 consistent with another cv. of maize [21].

3 Excess Zn elevated concentrations of PC₂ and (γEC)₂ in roots of radish more than in
4 maize seedlings (Tables 2,3). In a study with maize, PC_{2,3,4} were elevated in 1 cm root
5 apices of seedlings exposed to 500 μM Zn [3]. It seems that the production of thiols
6 depends on both the dose of Zn (i.e. time of exposure and concentration used) and the
7 root tissue sampled (i.e. root tips versus entire root systems as in this study). The shoots
8 of both species produced fewer PCs than did roots when seedlings were exposed to
9 excess Zn (Tables 2,3). Perhaps PCs were not important ligands of Zn in shoots. The
10 combination of Cd+Zn fostered production of di- and trithiols in both species to
11 concentrations like those with Cd alone. However, the low concentrations of polythiols in
12 shoots precluded an important role as ligands of Zn in this tissue. Four unknown Ellman-
13 positive peaks were found in radish roots and/or shoots (R1, R2, R3, R4) and three in
14 maize shoots (M1, M2, M3) (Tables 2,3). Identification of these components, perhaps
15 through mass spectrometry, would establish whether they are true thiol(s). In a rough
16 estimation, division of the sum of identified polythiols by typical concentrations of tissue
17 Cd and Zn (from the per fresh weight data of the samples presented in Table 1), showed
18 that, mole for mole, Cd was a better inducer of polythiols than Zn in roots and shoots of
19 both radish and maize (Tables 2,3). These observations are consistent with the same
20 conclusion for cultured plant cells exposed to unequal concentrations of excess Cd or Zn
21 [1,2].

22 The monothiols cysteine, glutathione, γEC and γECE were measured because they
23 might sequester metal. Cadmium and Zn form complexes with glutathione [25], cysteine

1 was a ligand for Co in several cultured plant cells [26]. Concentrations of glutathione in
2 Cd-treated radish were lower than in control roots and shoots; excess Zn elevated them in
3 roots and lowered them in shoots (Table 2). In maize excess Cd reduced glutathione
4 concentrations in roots yet elevated them in shoots (Tables 3). Excess Zn also raised
5 concentrations of glutathione in maize roots but not as markedly as in radish. Shoot
6 concentrations of glutathione in maize were not affected by excess Zn alone but were
7 raised with excess Cd+Zn, reactions opposite to those in radish shoots. The
8 concentrations of cysteine, γ EC and γ ECE were elevated above those of control roots in
9 radish seedlings treated with excess Cd, Zn or Cd+Zn. Excess metals had little effect on
10 concentrations of cysteine in maize roots or shoots; γ EC and γ ECE were elevated
11 principally in roots (Table 3). Glutathione is a precursor to PCs [5]. Whether γ EC and
12 γ ECE serve a precursor function for their respective polythiols or are degradation
13 products of PC metabolism remains unclear. Elevated cysteine by Cd in radish could
14 have been through stimulation of the transcription and activity of two enzymes
15 transforming sulfate into cysteine as found for *B. juncea*, another member of the
16 Brassicacea [27]. No precedent is available for the stimulation by excess Zn. The pattern
17 of elevated cysteine in roots and not in shoots of radish must be a species-specific effect
18 because the opposite occurred in *Canavalia lineata* exposed to 1 μ M Cd for 15 days [28].

19 3.4 Extractability of Cd and Zn differ between roots and shoots of radish and maize

20 The accumulation of PCs in metal-exposed tissues has been interpreted as evidence for
21 sequestration and detoxification of the metal [1]. The focus of this study was to ascertain
22 the quantitative validity of this common deduction for Cd and Zn in radish compared to
23 maize. A prerequisite for quantitative estimation of metal-binding complexes was

1 maximal extraction of the metal with buffer for subsequent small-scale gel filtration [8,9].
2 The patterns of Cd and Zn extraction from roots and shoots of seedlings exposed to
3 excess metal for 15 days are shown in Fig. 2; those for 10-day exposures were nearly
4 identical (data not shown). Buffer extracts B1 and B2 removed much of the buffer soluble
5 Cd and Zn, the following four extractions with buffer completed removal of this form of
6 metal from both radish and maize tissues (Fig. 2).

7 In radish, six extractions with buffer accounted for 82 to 87% of the Cd in roots
8 containing considerable Cd (Fig. 2A) and 65 to 67% with lower concentrations of Cd
9 (Fig. 2D). In shoots buffer extracted 79 to 89% of the Cd irrespective of Cd concentration
10 (Figs. 2A,D). Zn in radish was extracted much more readily with buffer from shoots (86-
11 89%) than from roots (42-46%) (Figs. 2B,C). Acid was less effective in removing the
12 remaining Cd and Zn from roots than from shoots (Figs. 2A-D). In maize a higher
13 proportion of tissue Cd was extracted with buffer from roots (94-95%) than shoots (70-
14 71%, Fig. 2E) and Zn more readily from shoots (76-79%) than roots (49-65%, Fig. 2F,G).
15 The greater extractability of Cd from roots than shoots in maize cv. AG303 (Fig. 2E)
16 mimicked the situation in another cv. of maize [9]. The small amounts of Cd in the
17 Cd+Zn treatment (Fig. 2H) were extracted a little better from maize roots than shoots,
18 opposite to that from radish seedlings (Fig. 2D). Three extractions with acid effectively
19 removed the remaining metal from homogenized maize tissues (Figs. 2E-H).

20 The differences in extractability of Cd suggested a broad partitioning into two forms:
21 buffer soluble Cd associated largely with PCs (see below), and acid soluble Cd associated
22 with other ligands in vivo. Buffer extracts from leaves were green, as if some Cd-
23 chlorophyll complexes had been solubilized. Cadmium can displace Mg from

1 chlorophylls [29]. Acid soluble Cd could be from two sources: Cd-chlorophyll complexes
2 remaining in the green residue of homogenized tissue and Cd associated with oxalate
3 crystals. Cadmium can displace some Ca from oxalate crystals [30]. Head cells of
4 tobacco leaf trichomes contained Cd-Ca oxalate crystals [31]. Some of the oxalate in
5 leaves was soluble in hot water and some was insoluble as crystals extractable with acid
6 [32], which could be represented in radish and maize by some of the buffer soluble Cd
7 and some acid soluble Cd (Fig. 2).

8 Zn was also broadly partitioned into two forms: buffer soluble Zn and acid soluble Zn
9 (Fig. 2). The extent of Zn removal with buffer differed markedly from that of Cd in both
10 radish and maize, as if Cd and Zn were in different molecular environments in vivo.
11 Differences in buffer extractability of Zn and Cd may be caused by i) unique buffer-
12 soluble ligand(s) for each metal, ii) production of different quantities of the same
13 ligand(s) with either Cd or Zn treatment, or iii) a combination of the two. Production of a
14 common peptide ligand for both Cd and Zn in radish and maize is inconsistent with the
15 finding that tobacco Cd-binding peptides, now known as PCs, did not bind Zn [4].
16 Extracellular Zn associated with cell walls [33,34] may be a source of buffer soluble Zn.
17 In the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* cell walls were estimated to bind 30%
18 of the Zn in roots and 12% in shoots [33]. The green buffer extracts from shoots may
19 have contained Zn-chlorophyll complexes [29]. Soluble Zn complexes with citrate
20 (dominant) and oxalate were predicted for tobacco vacuoles [35]. Some acid soluble Zn
21 (Figs. 2B,C,F,G) may be that remaining in cell walls after extraction with buffer. Acid
22 soluble Zn could be from Zn-chlorophyll complexes remaining in the green residue of

1 homogenized shoots but not likely from solid Zn-oxalate which was not predicted for
2 tobacco vacuoles where solid Ca-oxalate was expected (35).

3 *3.5 The high molecular weight phytochelatin-based complex occurs with Cd in radish*
4 *and maize, yet sparingly with Zn in maize and not in radish*

5 The functioning in vivo of PCs is expressed as the production of metal-binding
6 complexes generally documented through gel filtration. Figure 3 shows the small-scale
7 gel filtration profiles for roots and shoots of radish and maize seedlings exposed to excess
8 Cd, Zn, and Cd+Zn for 15 days. Qualitatively similar profiles were found for buffer
9 extracts from 10-day exposures (data not shown). The buffer soluble Cd from radish roots
10 and shoots was resolved into peaks I, II and III (Figs. 3A,B,E) as it was for maize (Fig.
11 3F,G,J). The Cd in peak I at the void volume has traditionally been ascribed to non-
12 specific adsorption of Cd to proteins. PCs were absent in the Cd peak at the void volume
13 of a Superdex® Peptide column used to fractionate extracts from four plant species,
14 including maize, and monitored continuously for ^{114}Cd by ICP-MS [36]. Peak I was a
15 prominent component in shoots, a small one in roots. The Cd of peak II in radish was
16 designated the HMW PC-based Cd-binding complex as found in various plants
17 [2,6,7,8,9,10]. Cadmium peak II in radish contained PCs (Table 4). However, the
18 quantities were low in comparison to those of Cd-binding peak II in maize (Table 4) even
19 though Cd caused radish to produce PCs like in maize (Tables 2,3). Perhaps there was
20 incomplete protection of PCs by Cd during isolation of the radish peak II or incomplete
21 reduction of thiols prior to PC analysis. Corrections for reduced efficiency of DTNB
22 reaction with PCs [37] were not possible in the absence of standards for all the polythiols
23 and would have applied equally to samples from radish and maize. It was assumed that

1 peak III in radish was the LMW PC-based Cd-binding complex equivalent to the LMW
2 complex of maize [8,9]. Several gel filtrations of radish gave insufficient peak III
3 material for PC analysis by the method used. Formation of the LMW complex precedes
4 that of the HMW complex [9]. Peaks II and III did not appear in extracts of radish grown
5 without Cd, a sample of CdSO₄ eluted after 21-24 ml (data not shown).

6 Buffer soluble Zn from roots and shoots of radish eluted as peaks I and III (Figs. 3C,
7 D). The absence of peak II in the Zn treatment was not due to the performance of the gel
8 filtration column because a root sample containing both Cd and Zn from the Cd+Zn
9 treatment clearly showed Cd as peak II (Fig. 3E). Furthermore, the loadings of Zn
10 exceeded those of Cd by 3- to 4-fold (Figs. 3C,D,E, versus Figs. 3A,B) or 23-fold in Fig.
11 3E. The distributions of Zn and Cd from radish shoots from the Cd+Zn treatment (data
12 not shown) were similar to that from roots (Fig. 3E). The Zn from extracts of maize roots
13 appeared principally (84-86%) as peak III with a small (4-7%) peak II (Fig. 3H,J) that
14 coincided with peak II of Cd (Fig. 3J). Whether the Zn in peak II of maize roots was the
15 Zn counterpart to the HMW PC-based Cd-binding complex requires the sensitive
16 characterization possible through mass spectrometry. For maize shoots the Zn extracted
17 with buffer eluted as peaks I and III (Fig. 3I). The material in Zn peak III from both
18 radish and maize roots contained small quantities of mono- and dithiols (Table 4). These
19 measurements were despite providing 6- to 10-fold more material, based on the quantity
20 of Zn, than was present in the Cd samples (Table 4). Although elution of Zn peak III
21 coincided with that of Cd peak III it was deduced that monothiols and PCs were not
22 major ligands for Zn in peak III. The abundant Zn in peak III from both radish and maize
23 was not free Zn that eluted at 21-26 ml.

1 The weak evidence of Zn sequestration by PCs in radish and maize (Fig. 3, Table 4)
2 agrees with the lack of similar evidence in roots of *Rubia tinctorum* [2]. Several other
3 LMW ligands for Zn did not account for Zn binding in lettuce leaves [38]. Identifying
4 various candidate ligands in peak III and associating them with Zn sequestration is
5 insufficient. The preference would be simultaneous analysis for Zn and ligand perhaps by
6 isotope distribution and tandem mass spectrometry. Such techniques usually require the
7 absence of Na⁺, K⁺ and Cl⁻. The Superdex® Peptide column developed with 300 mM
8 NH₄HCO₃ separated soluble Zn from maize into peaks I, II and III similar to Fig. 3H
9 (data not shown). Preliminary investigation of such peak III material by electrospray
10 ionization tandem mass spectrometry gave no indication of Zn associated with a ligand.
11 Perhaps the extraction, chromatography and sample preparation destroyed Zn complexes
12 that occurred in vivo. Examination of frozen roots and shoots of *T. caerulea*, where
13 the possible appearance of metal complexes as artifacts of the extraction and separation
14 process were minimal, showed that 70% of the Zn in roots was associated with histidine
15 while 16%, 38% and 9% of the Zn in shoots was associated with histidine, citrate and
16 oxalate, respectively, while 26% was aqueous Zn [33].

17 The resolution of low quantities of Cd (Figs. 3E,J) opened the possibility of
18 characterizing the low quantities of Zn from radish and maize seedlings growing in
19 control nutrient solution supplied with 0.39 µM Zn. Zinc eluted as peaks I and III in
20 extracts from both roots and shoots of radish and maize (Fig. 4). With the exception of
21 radish roots, buffer extracted 58% or greater of the tissue Zn (histograms Fig. 4). The
22 partitioning of Zn by gel filtration was related to the total Zn in the tissue based on a
23 procedure devised for Cd [9]. For each gel filtration the amount of Zn found as peak III

1 was calculated as a percentage of the Zn recovered from the column. This percentage was
2 then applied to the total buffer soluble Zn as shown in the histograms of Fig. 4. The
3 concentrations of Zn as peak III in radish roots and shoots were somewhat greater than in
4 maize roots (6-6.6 $\mu\text{g Zn/g FW}$ versus 4.7 $\mu\text{g Zn/g FW}$, respectively), and lowest in
5 maize shoots (2.6 $\mu\text{g Zn/g FW}$). No measurements of PCs were attempted for the material
6 from peak III. Control roots and shoots displayed low or trace concentrations of PCs
7 (Tables 2,3), as if these compounds were not important ligands for Zn. Up to 67% of the
8 Zn in radish roots from control seedlings (histogram Fig. 4A), or 58% for those growing
9 in 50 $\mu\text{M Zn}$ (Fig. 2B,C), was not extracted with buffer, as if the majority of Zn in these
10 roots was sequestered particularly tenaciously. The reason for the strong binding of Zn in
11 radish roots particularly is not understood.

12 *3.6 Phytochelatin-based complexes bind a high proportion of Cd in roots, less in leaves,*
13 *and little or no Zn in radish and maize*

14 The complete extraction of buffer soluble Cd and/or Zn combined with partitioning of
15 such material into peaks I, II and III by gel filtration allowed quantitative estimates of
16 how much of the tissue Cd or Zn was sequestered as PC-based complexes. This approach
17 has only been taken with Cd in maize [8,9]. Figure 5 shows the concentrations of Cd and
18 Zn in four forms derived from radish and maize seedlings exposed to excess Cd or Zn for
19 10 and 15 days. Two forms, the concentrations of metal in buffer extracts and acid
20 extracts + ash, were taken from the extractability curves for 15-day exposures shown in
21 Fig. 2 and for 10-day exposures from data not shown. The concentrations of metals
22 appearing as two further forms, peaks II and III during gel filtration, were derived for 15-

1 day samples from the distributions shown in Fig. 3 and for 10-day exposures from gel
2 filtration profiles not shown.

3 The concentrations of total Cd and Zn recovered by buffer and in the acid soluble +
4 ash fraction increased between 10 and 15 days for both radish and maize, indicating that
5 excess metals had not yet saturated the roots and shoots. Of the buffer soluble material,
6 Cd-binding PC-based complexes as peaks II and III bound 67 to 69% of the Cd in radish
7 roots (28 and 42 $\mu\text{g Cd/g FW}$ on days 10 and 15, respectively) and 42 to 43% in the
8 shoots (6 and 8 $\mu\text{g Cd/g FW}$ on days 10 and 15, respectively) (Figs. 5A,B). In maize (Fig.
9 5E) the equivalent PC-based complexes bound a higher proportion of root Cd (88-89%)
10 than did radish, the concentrations involved were somewhat less (33 and 37 $\mu\text{g Cd/g FW}$
11 for 10- and 15-day exposures, respectively) than the highest for radish. Because maize
12 seedlings retained a high proportion of Cd in roots (Table 1) the shoots had low
13 concentrations of Cd and low concentrations of PC-based complexes ($\sim 2 \mu\text{g Cd/g FW}$)
14 that accounted for 27% of the tissue Cd (Fig. 5F). The overall importance of PC function
15 in binding excess Cd intracellularly was supported by estimates that 88 to 89% of the Cd
16 in roots of maize was found as PC-based HMW and LMW complexes (Fig. 5E). The
17 importance of PC-based sequestration, however, was less in radish roots (Fig. 5A) and
18 much less in shoots of both species (Figs. 5B,F). From the fact that maize shoots
19 contained greater concentrations of most PCs than did roots (Table 3), yet sequestered
20 only small proportions of Cd, it was concluded that determining PC concentrations alone
21 did not necessarily assess their function in Cd sequestration. Other cellular ligands, either
22 buffer soluble or extractable with acid, served a more or less important role along with
23 PCs in Cd sequestration in roots and shoots.

1 The concentrations of Zn as peak III in radish roots (~50 µg Zn/g FW) represented
2 about half of the tissue Zn (Fig. 5C). The larger proportions of buffer soluble Zn in shoots
3 than roots were associated with larger proportions of Zn as peak III in shoots (75%) than
4 in roots (34-44%) (Figs. 5C,D). Like in radish roots, less Zn was extracted with buffer
5 from maize roots and lower proportions of Zn occurred as peak III (Fig. 5G). The only
6 evidence for Zn in the form of peak II, putatively equivalent to the PC-based HMW Cd-
7 binding complex, was found in maize roots and represented only 2% of the tissue Zn
8 (Fig. 5G). The proportion of Zn as peak III material was lower in the shoots of maize than
9 of radish (46% versus 75%, respectively; Figs. 5D,H).

10 Both radish and maize clearly sequestered Zn and Cd differently (Fig. 5). Only maize
11 had a small amount of Zn associated with what might be HMW PC-based complex (Fig.
12 5G), none was found for radish. In all cases most of the Zn appeared as LMW material
13 (Figs. 5C,D,G,H) that contained low concentrations of monothiols and polythiols (Table
14 4). These thiols could not account for much sequestration of Zn. The identity of other
15 possible ligands involved was not established. As mentioned earlier, extraction with
16 buffer and gel filtration may not have maintained the Zn complexes found in vivo.
17 Examination of frozen roots of *T. caerulescens* showed that 70% of the tissue Zn was
18 associated with histidine with other ligands participating additionally in shoots [33].

19 Figure 6 shows the concentrations of Cd and Zn in four forms derived from radish and
20 maize seedlings exposed to 1 µM Cd + 50 µM Zn for 10 and 15 days. Fifty µM Zn
21 reduced Cd concentrations in roots and shoots of both radish and maize (Table 1; Figs.
22 6A,B,E,F) compared to the 1 µM Cd treatment alone (Table 1; Figs. 5A,B,E,F). Despite
23 the lower concentrations of tissue Cd, fractionation of Cd into peaks II and III in the

1 Cd+Zn treatments remained essentially similar to the treatments with Cd alone (Figs.
2 5A,B,E,F versus Figs. 6A,B,E,F, respectively). Excess Zn did not affect the partitioning
3 of Cd. The partitioning of Zn into buffer and acid extractable forms, and peaks II and III
4 during gel filtration (Figs. 6C,D,G,H), was essentially the same as for the treatments with
5 Zn alone (Figs. 5C,D,G,H). The presence of Cd did not alter the partitioning of Zn. As for
6 the metal treatments alone, the concentrations of total Cd and Zn recovered as buffer and
7 acid soluble + ash increased between 10 and 15 days for both radish and maize,
8 indicating that excess metals in the Cd+Zn treatment had not yet saturated the roots and
9 shoots. The essential repetition of the Zn data in the Cd+Zn treatments (Fig. 6) with the
10 Zn alone treatments (Fig. 5), demonstrated the reproducibility of the biological response,
11 shown throughout by one repetition of two independent experiments.

12 *3.7 Overall Conclusion*

13 Radish and maize seedlings reacted differently to excess Cd and Zn resulting in
14 contrasting metal partitioning between roots and shoots, extractability with buffer, and
15 separation during gel filtration. Phytochelatins were prominent ligands for Cd in maize,
16 less so in radish, weakly so for Zn only in maize roots, and not at all in radish. Other
17 unidentified cellular constituents in the seedlings, perhaps in cell walls and within cells,
18 participated to varying degrees in sequestering some of the Cd and most of the Zn.

19 **Acknowledgements**

20 This work was supported through a scholarship to J.F.S. from CAPES (Coordenação
21 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil. Operating grant No. 2491
22 from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada to W.E.R.
23 supported the work.

1

2 **References**

3 [1] M.H. Zenk, Heavy metal detoxification in plants – a review. *Gene* 179 (1996) 21-30.

4 [2] T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, T. Yamada, The composition of metals bound to class
5 III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in
6 root cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* 110 (1996) 1145-1150.

7 [3] A. Tukendorf, Phytochelatin synthesis in maize seedlings in response to excess zinc.
8 *Biol. Plantarum* 38 (1996) 137-140.

9 [4] R.N. Reese, G.J. Wagner, Properties of tobacco (*Nicotiana tabacum*) cadmium-
10 binding peptide(s). *Biochem. J.* 241 (1987) 641-647.

11 [5] O.K. Vatamaniuk, S. Mari, Y.-P. Lu, P.A. Rea, Mechanism of heavy metal ion
12 activation of phytochelatin (PC) synthase Blocked thiols are sufficient for PC synthase-
13 catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J. Biol. Chem.* 40
14 (2000) 31451-31459.

15 [6] P.J. Jackson, E.J. Roth, P.R. McClure, C.M. Naranjo, Selection, isolation, and
16 characterization of cadmium-resistant *Datura innoxia* suspension cultures. *Plant Physiol.*
17 75 (1984) 914-918.

18 [7] R. Howden, P.B. Goldsbrough, C.R. Andersen, C.S. Cobbett, Cadmium-sensitive,
19 *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* 107
20 (1995) 1059-1066.

21 [8] W.E. Rauser, Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two
22 complexes. *J. Plant Physiol.* 156 (2000) 545-551.

- 1 [9] W.E. Rauser, Phytochelatin-based complexes bind various amounts of cadmium in
2 maize seedlings depending on the time of exposure, the concentration of cadmium, and
3 the tissue. *New Phytol.* 158 (2003) 269-278.
- 4 [10] D.M. Speiser, S.L. Abrahamson, G. Banuelos, D.W. Ow, *Brassica juncea* produces a
5 phytochelatin-cadmium-sulfide complex. *Plant Physiol.* 99 (1992) 817-821.
- 6 [11] E. Grill, Phytochelatins in plants, in: D.H. Hamer, D.R. Winge, (Eds.), *Metal Ion*
7 *Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry*, Alan R. Liss, Inc., 1989, pp. 283-300.
- 8 [12] G.J. Wagner, Characterization of a cadmium-binding complex of cabbage leaves.
9 *Plant Physiol.* 76 (1984) 797-805.
- 10 [13] I. Leopold, D. Günther, Investigation of the binding properties of heavy-metal-
11 peptide complexes in plant cell cultures using HPLC-ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.*
12 359 (1997) 364-370.
- 13 [14] I. Leopold, D. Günther, J. Schmidt, D. Neumann, Phytochelatins and heavy metal
14 tolerance. *Phytochem.* 50 (1999) 1323-1328.
- 15 [15] R.L. Chaney, J.A. Ryan, Y.-M. Li, R.M. Welch, P.G. Reeves, S.L. Brown, C.E.
16 Green, Phyto-availability and bio-availability in risk assessment for Cd in agricultural
17 environments. *Proc. OECD Cadmium Workshop*, Stockholm, Sweden (1995) 1-28.
- 18 [16] S.C. Jarvis, H.P. Jones, M.J. Hopper, Cadmium uptake from solution by plants and
19 its transport from roots to shoots. *Plant Soil* 44 (1976) 179-191.
- 20 [17] D.A. Cataldo, T.R. Garland, R.E. Wildung, Cadmium uptake kinetics in intact
21 soybean plants. *Plant Physiol.* 73 (1983) 844-848.
- 22 [18] E. Grill, E.-L. Winnacker, M.H. Zenk, Occurrence of heavy metal binding
23 phytochelatins in plants growing in a mining refuse area. *Experientia* 44 (1988) 539-540.

- 1 [19] M. Inohue, S. Ninomiya, H. Tohoyama, M. Joho, T. Murayama, Different
2 characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation
3 between mono- and dicotyledonous plants. *J. Plant Res.* 107 (1994) 201-207.
- 4 [20] R.D. MacNicol, P.H.T. Beckett, Critical tissue concentrations of potentially toxic
5 elements. *Plant Soil* 85 (1985) 107-129.
- 6 [21] W.E. Rauser, P. Meuwly, Retention of cadmium in roots of maize seedlings Role of
7 complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiol.* 109 (1995) 195-
8 202.
- 9 [22] J.W. Rijstenbil, J.A. Wijnholds, HPLC analysis of nonprotein thiols in planktonic
10 diatoms: pool size, redox state and response to copper and cadmium exposure. *Marine*
11 *Biol.* 127 (1996) 45-54.
- 12 [23] W.E. Rauser, Compartmental efflux analysis and removal of extracellular cadmium
13 from roots. *Plant Physiol.* 85 (1987) 62-65.
- 14 [24] D.A. Salt, R.C. Prince, I.J. Pickering, I. Raskin, Mechanisms of cadmium mobility
15 and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.* 109 (1995) 1427-1433.
- 16 [25] D.D. Perrin, A.E. Watt, Complex formation of zinc and cadmium with glutathione.
17 *Biochim. Biophys. Acta* 230 (1971) 96-104.
- 18 [26] M. Oven, E. Grill, A. Golan-Goldhirsh, T. M. Hutchan, M.H. Zenk., Increase of free
19 cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochem.* 60 (2002) 467-
20 474.
- 21 [27] S. Lee, T. Leustek, The affect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in
22 *Brassica juncea*. *Plant Sci.* 141 (1999) 201-207.

- 1 [28] H.R. Choi, I.D. Hwang, C.-H. Lee, Y.M. Kwon, Phytochelatins in cadmium-treated
2 seedlings of *Canavalia lineata*. Mol. Cells 6 (1996) 451-455.
- 3 [29] H. Küpper, F. Küpper, M. Spiller, Environmental relevance of heavy metal-
4 substituted chlorophylls using the example of water plants. J. Exp. Bot. 47 (1996) 259-
5 266.
- 6 [30] E. van Balen, S.C. van de Geijn, G.M. Desmet, Autoradiographic evidence for the
7 incorporation of cadmium into calcium oxalate crystals. Z. Pflanzenphysiol. 97 (1980)
8 123-133.
- 9 [31] Y.-E. Choi, E. Harada, M. Wada, H. Tsuboi, Y. Morita, T. Kusano, H. Sano,
10 Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals
11 containing cadmium and calcium through trichomes. Planta 231 (2001) 45-50.
- 12 [32] E. Zindler-Frank, R. Hönow, A. Hesse, Calcium and oxalate content of the leaves of
13 *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal
14 formation. J. Plant Physiol. 158 (2001) 139-144.
- 15 [33] D.E. Salt, R.C. Prince, A.J.M. Baker, I. Raskin, I.J. Pickering, Zinc ligands in the
16 metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption
17 spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 713-717.
- 18 [34] H.-G. Heumann, Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant *Armeria*
19 *maritima* ssp. *Halleri* by autometallography. J. Plant Physiol. 159 (2002) 191-203.
- 20 [35] J. Wang, B.P. Evangelou, M.T. Nielsen, G.J. Wagner, Computer-simulated
21 evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles
22 II. Zinc. Plant Physiol. 99 (1992) 621-626.

1 [36] V. Vacchina, K. Połec, J. Szpunar, Speciation of cadmium in plant tissues by size-
2 exclusion chromatography with ICP-MS detection. J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999)
3 1557-1566.

4 [37] F.E.C. Sneller, L.M. van Heerwaarden, P.L.M. Koevoets, R. Vooijs, H. Schat, J.A.C.
5 Verkleij, Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to
6 arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and
7 monobromobimane. J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 4014-4019.

8 [38] C.D. Walker, R.M. Welch, Low molecular weight complexes of zinc and other trace
9 metals in lettuce leaf. J. Agric. Food Chem. 35 (1987) 721-727.

10

1 Fig. 1. Growth of roots and shoots of radish can be affected adversely by excess Zn. Dry
2 matter yield (A) and concentration of Zn (B) in roots and shoots of radish were
3 determined after 15 days of growth in nutrient solutions containing 0.39 to 200 μM Zn.
4 There were four seedlings per pot, means of two replicates.

5 Fig. 2. The extractability of Cd and Zn with buffer varies with roots and shoots of radish
6 and maize seedlings. Panels A through D are for radish, panels E through F are for maize
7 exposed to excess metal for 15 days. Panels A and E: 1 μM Cd, B and F: 50 μM Zn, and
8 C, D, G and H: 1 μM Cd+50 μM Zn. The tissues were extracted six times with buffer,
9 extracts B1 through B6, followed by three extracts with acid, A1 through A3, and the
10 residue ashed. The concentration of Cd or Zn in the roots and shoots is given in each
11 panel.

12 Fig. 3. Buffer soluble Cd and Zn are partitioned by gel filtration. Panels A through E are
13 for radish and panels F through J for maize seedlings exposed to excess metal for 15
14 days. Panels A and F are for roots of seedlings exposed to 1 μM Cd, panels B and G for
15 the shoots. Panels C and H are for roots of seedlings exposed to 50 μM Zn, panels D and
16 I for the shoots. Panels E and J are for roots of seedlings exposed to 1 μM Cd+50 μM Zn,
17 where Zn is the solid line and Cd the dotted line. The quantity of Cd or Zn
18 chromatographed is given in each gel filtration profile. The column characteristics of
19 exclusion volume (V_o) and total volume (V_T) shown in panel A apply to all gel
20 filtrations.

21 Fig. 4. Buffer soluble Zn from tissues of control seedlings is partitioned into two major
22 peaks. Panel A is for roots and B is for shoots of radish, C is for roots and D is for shoots
23 of maize seedlings growing for 15 days in control nutrient solution containing 0.39 μM

1 Zn. The histograms associated with each gel filtration profile show the concentrations of
2 Zn extractable with buffer, acid and in the ash, and that appeared as peak III during gel
3 filtration. The percentage of the tissue Zn found as peak III is given. The quantity of Zn
4 chromatographed is given in each gel filtration profile.

5 Fig. 5 Extractability of Cd and Zn and partitioning of the buffer soluble metal through gel
6 filtration differ between roots and shoots of radish and maize seedlings. Panels A through
7 D are for radish, panels E through H are for maize seedlings exposed to excess metal for
8 10 and 15 days. Panels A and E are for roots of seedlings exposed to 1 μ M Cd, panels B
9 and F for the shoots. Panels C and G are for roots of seedlings exposed to 50 μ M Zn,
10 panels D and H for the shoots. In the Cd treatments the percentages refer to the
11 proportion of tissue Cd appearing as peaks II and III during gel filtration (panels A,B,
12 E,F). In the case of Zn treatments the percentages refer to the proportion of tissue Zn
13 appearing as peak III during gel filtration (panels C,D,G,H). The metal profiles shown in
14 Fig. 3 provided the quantitative data for the 15-day exposures.

15 Fig. 6. Extractability of Cd and Zn and partitioning of the buffer soluble metal through
16 gel filtration from radish and maize seedlings exposed to 1 μ M Cd+50 μ M Zn. Panels A
17 through D are for radish, panels E through H for maize seedlings exposed to Cd+Zn for
18 10 and 15 days. Panels A,E,C and G are for roots, panels B,F,D and H for shoots. In the
19 case of Cd the percentages refer to the proportions of tissue Cd as peaks II and III, in the
20 case of Zn they refer to the proportions of tissue Zn found as peak III.

Table 1. Yield, metal concentration and metal retention by roots of four seedlings of radish and maize exposed to excess Cd and Zn for 15 days. The concentration of Zn in control nutrient solution was 0.39 μM . Mean $\pm$ SE of 4 replicates, NS not significant.

Treatment	Dry weight yield mg		$\mu\text{g Cd/ g dry weight}$		$\mu\text{g Zn/ g dry weight}$		Percentage of metal in	
	roots	shoots	roots	shoots	roots	shoots	Cd	Zn
Radish								
Control	119 $\pm$ 13	382 $\pm$ 58	3.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.1	245 $\pm$ 35	129 $\pm$ 18	72 - 82	27 - 49
1 $\mu\text{M Cd}$	147 $\pm$ 14	468 $\pm$ 48	493.8 $\pm$ 42.4	151.8 $\pm$ 10.9	342 $\pm$ 20	63 $\pm$ 2	47 - 55	57 - 68
50 $\mu\text{M Zn}$	107 $\pm$ 6	371 $\pm$ 14	6.6 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.1	2130 $\pm$ 302	1411 $\pm$ 47	72 - 94	18 - 35
1 $\mu\text{M Cd} + 50 \mu\text{M Zn}$	89 $\pm$ 7	325 $\pm$ 13	64.1 $\pm$ 7.5	39.9 $\pm$ 1.1	1508 $\pm$ 100	1411 $\pm$ 45	23 - 38	20 - 26
Cd x Zn interaction P 0.04								
Maize								
Control	404 $\pm$ 33	823 $\pm$ 46	0.4 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.03	103 $\pm$ 8	122 $\pm$ 9	39 - 53	22 - 33
1 $\mu\text{M Cd}$	377 $\pm$ 20	728 $\pm$ 31	463.1 $\pm$ 24.5	82.8 $\pm$ 10.1	66 $\pm$ 3	89 $\pm$ 5	70 - 77	26 - 32
50 $\mu\text{M Zn}$	375 $\pm$ 22	767 $\pm$ 50	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.02	2837 $\pm$ 17	689 $\pm$ 55	55 - 64	64 - 71
1 $\mu\text{M Cd} + 50 \mu\text{M Zn}$	383 $\pm$ 51	753 $\pm$ 58	248.7 $\pm$ 25.0	23.3 $\pm$ 2.2	2673 $\pm$ 54	721 $\pm$ 40	77 - 88	65 - 71
Cd x Zn interaction P NS								
NS								
NS								

Table 2. Monothiol and DTNB-reactive materials in acid extracts of roots and shoots of radish seedlings exposed to excess Cd and Zn for 15 days. The monothiols* were measured as the fluorescent bimane derivatives. All materials are reported as thiol equivalents calibrated with glutathione or γ ECG. Unknowns R1 through R4 are listed in order of elution during HPLC. Trace peaks were too small to be integrated. The thiols were extracted from frozen tissues with 100 mM HCl and 5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid. The abbreviations for amino acids are: E, glutamic acid; C, cysteine; G, glycine.

constituent	nmol thiol/g FW							
	control		1 μ M Cd		50 μ M Zn		1 μ M Cd + 50 μ M Zn	
	root	shoot	root	shoot	root	shoot	root	shoot
cysteine*	43.9	19.7	111.2	17.3	124.4	15.9	89.3	21.1
γ ECG*	139.4	153.1	59.7	118.0	243.6	115.0	187.7	99.3
γ EC*	13.7	17.7	63.7	20.5	49.0	14.4	49.0	27.4
R1	128.7	22.0	85.6	8.4	43.1	31.2	56.3	28.4
γ ECE*		0.5	37.1	1.5	28.0	1.1	35.0	1.3
(γ EC) ₂ G		trace	28.7	14.1	95.9	trace	43.3	1.9
(γ EC) ₂	2.2	trace	23.7	2.4	42.1	trace	24.9	1.0
(γ EC) ₂ E			7.7		8.7		9.8	
R2	tr.	7.5	25.0	50.8	33.5	7.5		33.8
variant (γ EC) ₃			52.3				20.7	
(γ EC) ₃ G		4.2		4.9		6.4	43.0	6.7
(γ EC) ₃			1.5		trace		1.2	
R3	11.5	trace	5.7	2.5	35.8	trace	14.7	trace
R4		45.6		37.3		52.5		53.8
Sum of identified thiols nmol/g FW			113.9	21.4	146.7	6.4		
Estimated nmol metal/g FW			390	100	3400	1730		
nmol thiol/nmol metal			0.3	0.2	0.04	0.004		

Table 3. Monothiol and DTNB-reactive materials in acid extracts of roots and shoots of maize seedlings exposed to excess Cd and Zn for 15 days. The monothiols* were measured as the fluorescent bimeane derivatives. All materials are reported as thiol equivalents calibrated with glutathione or γ ECG. Unknowns M1 through M3 are listed in order of elution during HPLC. Trace peaks were too small to be integrated. The thiols were extracted from frozen tissues with 100 mM HCl and 5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid. The abbreviations for amino acids are: E, glutamic acid; C, cysteine; G, glycine.

nmol thiol/g FW									
constituent	control		1 μ M Cd		50 μ M Zn		1 μ M Cd + 50 μ M Zn		
	root	shoot	root	shoot	root	shoot	root	shoot	
cysteine*	3.9	5.3	4.7	15.5	7.2	6.8	12.5	7.1	
γ ECG*	90.3	84.5	66.3	231.0	100.6	86.6	107.9	113.2	
γ EC*	5.4	3.9	25.5	40.7	7.1	5.9	15.9	10.1	
γ ECE*	2.0	5.8	12.7	2.9	23.1	3.5	58.8	5.4	
(γ EC) ₂ G	3.0	1.8	9.0	32.3	10.5	3.4	23.6	5.6	
(γ EC) ₂	0.7		25.1	41.5	5.8		24.1	trace	
(γ EC) ₂ E			7.2	6.3	0.6		4.3		
variant (γ EC) ₃			4.2	3.4			20.1		
(γ EC) ₃ G			4.7						
(γ EC) ₃			5.8	5.4			6.2		
(γ EC) ₃ E			2.3						
M1		20.9		33.0		16.6		23.1	
M2		25.1		46.6		21.5		30.6	
M3		8.4	1.1	9.5		8.2		8.9	
Sum of identified thiols/g FW			58.3	88.9	16.9	3.4			
Estimated nmol metal/g FW			300	64	3160	880			
nmol thiol/nmol metal			0.2	1.4	0.005	0.005			

Table 4. Monothiol and DTNB-reactive materials in peaks II and III from Superdex® gel filtrations of root extracts from radish and maize seedlings exposed to 1 μ M Cd, 50 μ M Zn and 1 μ M Cd + 50 μ M Zn for 15 days. The monothiol* were measured as the fluorescent bimane derivatives. Glutathione or γ ECG was the thiol standard. The sulfide is the residue after unknown losses during sample preparation. The compounds are listed in the order of elution during HPLC. Trace peaks were too small to be integrated. One or two further independent analyses were performed for each treatment. The abbreviations for amino acids are: E, glutamic acid; C, cysteine; G, glycine.

		nmol thiol/100 nmol metal					
		Radish			Maize		
		Cd	Zn	Cd + Zn	Cd	Zn	Cd + Zn
constituent		II	III	III	II	III	III
cysteine*			0.56	0.59		0.07	0.11
S ⁼		>2.5	>0.5	>0.39	>0.6		trace
γ ECG*		0.19	0.16	0.09	trace	0.21	0.16
γ EC*		0.34	0.41	0.49	trace	0.05	0.02
R1		0.90	0.55	0.53			
γ ECE*					trace		
(γ EC) ₂ G		1.53	0.21	0.20	0.44	trace	0.04
(γ EC) ₂		trace	0.29	0.08	1.25		
(γ EC) ₂ E			trace		0.13		
variant (γ EC) ₃	0.83				12.03		
(γ EC) ₃ G		1.02			11.80		
(γ EC) ₃		trace			20.33		
(γ EC) ₃ E					20.21		
nmol metal in thiol sample analyzed							
DTNB	Cd 103	Zn 849	1018	Cd 123	Zn 732	710	
Bimane		Zn 431	437		Zn 319	297	

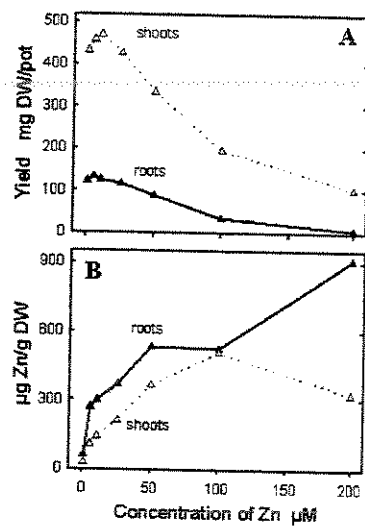


Figure 1 Souza and Rauser

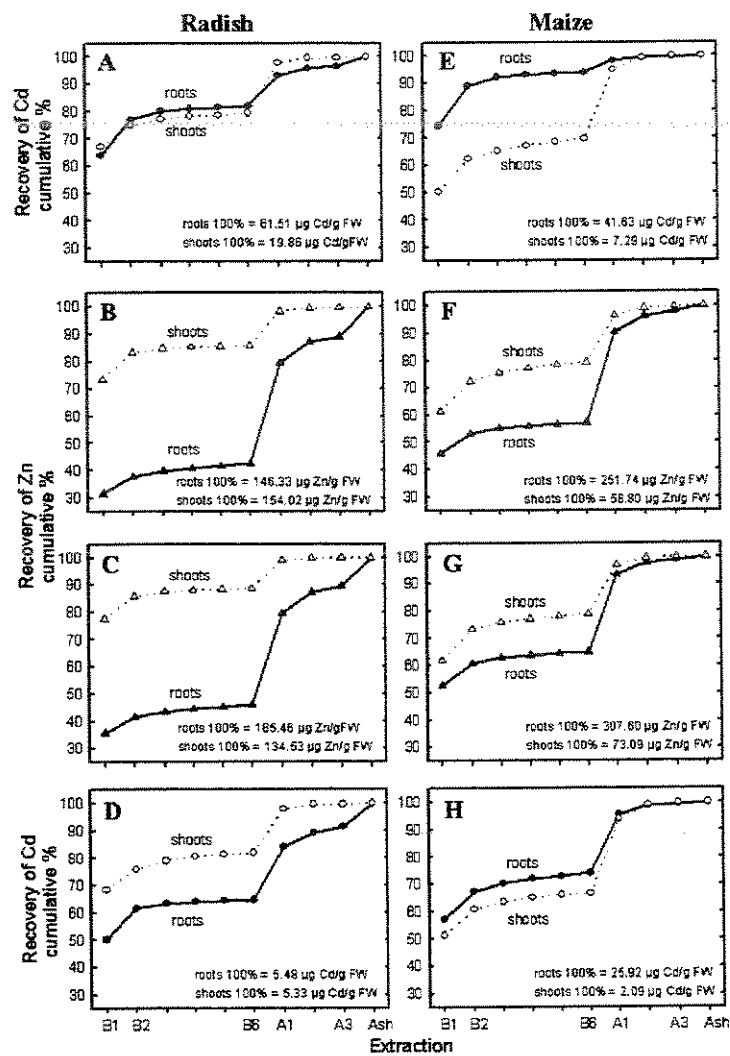


Figure 2 Souza and Rauser

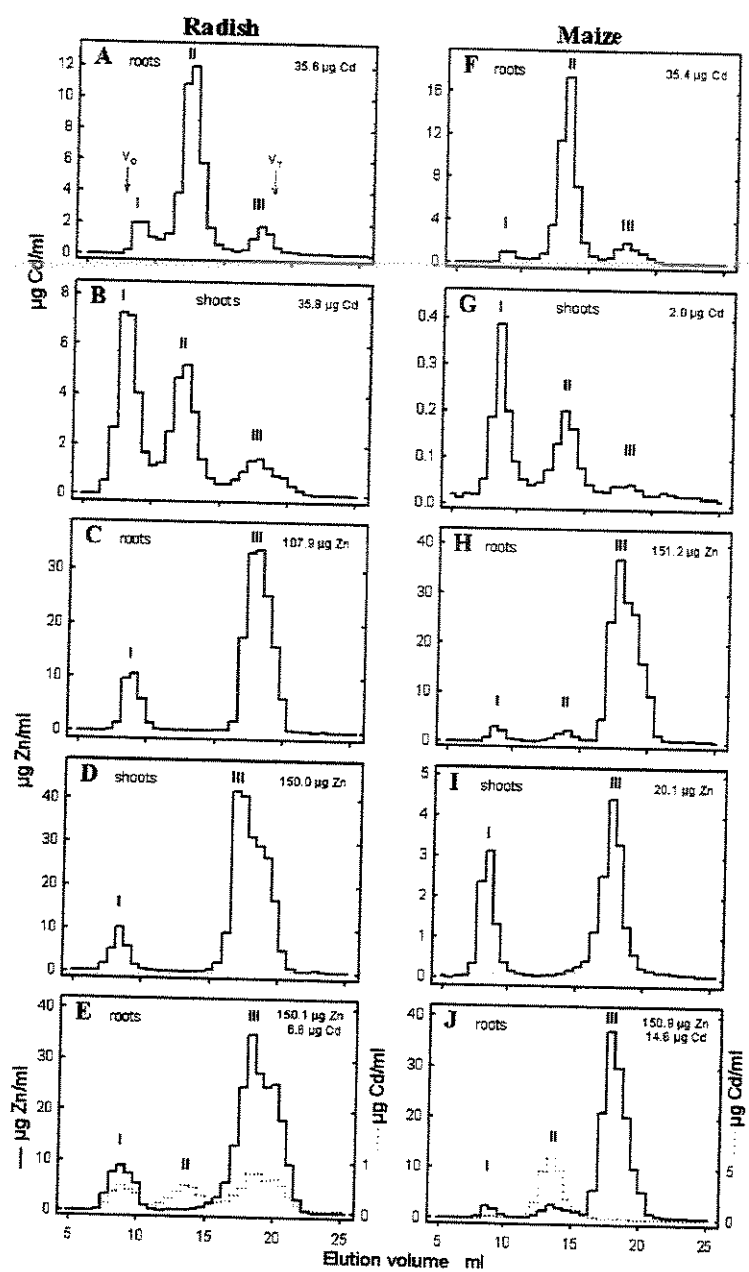


Figure 3 Souza and Rauser

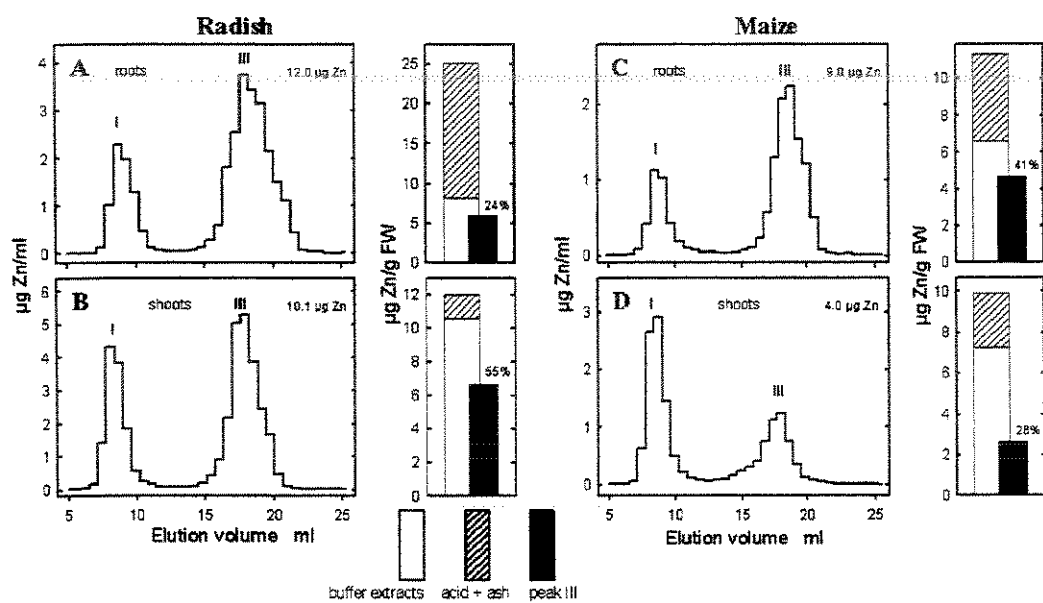


Figure 4 Souza and Rauser

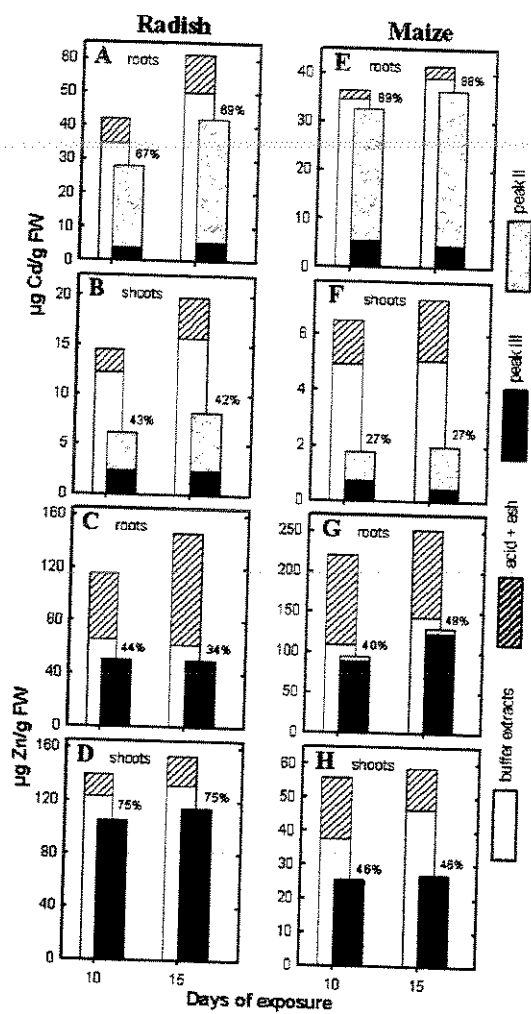


Figure 5 Souza and Rauser

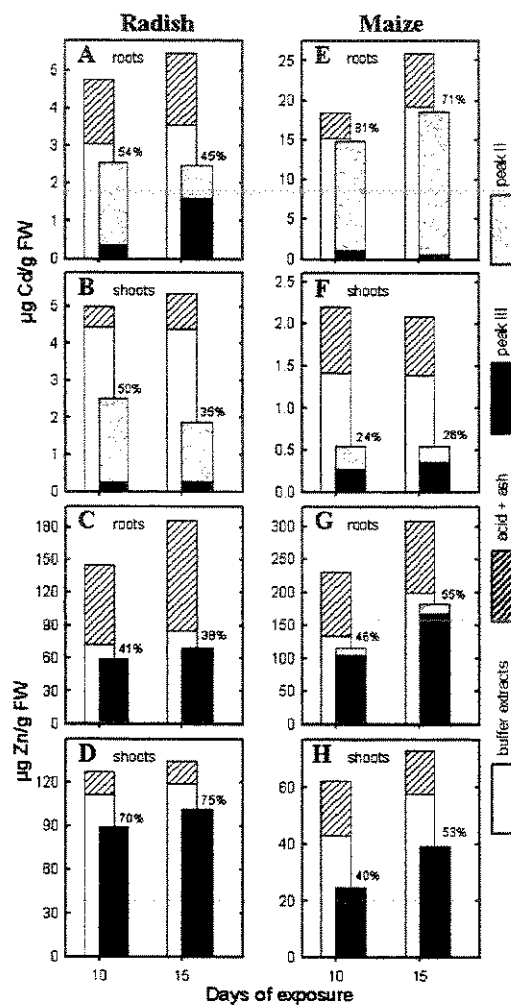


Figure 6 Souza and Rauser

Capítulo 4

Effect of excess cadmium and zinc ions on roots and shoots of maize seedlings

Submetido: Journal of Plant Nutrition

EFFECT OF EXCESS CADMIUM AND ZINC IONS ON ROOTS AND SHOOTS OF MAIZE SEEDLINGS¹

José F. Souza, Heidi Dolder and Angelo L. Cortelazzo²

Department of Cell Biology, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP
6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

1. Part of JFSouza PhD Thesis;

*2. To whom correspondence should be addressed. E-mail: jofransou@hotmail.com or
angelo@unicamp.br*

ABSTRACT

This study was undertaken to examine the effect of cadmium (Cd) or zinc (Zn), frequent pollutants found in the soil. These elements were added as 1 mM solutions to nutrient solution used for roots and shoots of maize seedlings, investigated 8 days after germination. The results showed that Cd inhibits root growth more strongly than the shoots and more effectively than Zinc ions. The results of scanning electron microscopy revealed changes in the leaf surface, particularly in the guard cells of the stomata. The analyses of the parenchyma mesophyll cells showed extensive chloroplast disorganization, mainly affecting the thylakoid membranes and grana.

Key words: heavy metals, cadmium, zinc, maize

INTRODUCTION

Plants present a dilemma, like all organisms, in that metal ions such as Ca^{2+} and Zn^{2+} are essential nutrients taking part in redox reactions, electron transfer, a multitude of enzyme catalyzed reactions, and structural functions in nucleic acid metabolism (1), whereas other metal ions can damage your metabolism. Certain plants are able to grow in soils with high metal content and have developed effective mechanisms to resist excessive metal in the soil. Cadmium and Zinc, widely occurring pollutants, are readily taken up by plants and can be phytotoxic (2). Individually, cadmium or zinc affect growth (3,4) by altering several physiological processes (5,6).

Cadmium and zinc are assumed to react in a similar way in biological systems. It has been suggested that the mechanisms regulating the absorption are chemical similar for both essential and non-essential metals. From the point of view of plant physiology, Cd and Zn are very different elements. The first is not necessary for plant metabolism, whereas the second is an essential microelement, being a structural and catalytic component of proteins and enzymes.

Non-essential metals, such as Cd, are thought to enter plant cells due to their chemical and physical similarity to plant nutrients, for instance through Calcium channels. Cadmium is a trace metal and potential toxin that causes concern when transferred to plant products included in the human diet (7) and it is widely recognized that vegetable foods are the main sources of this toxic metal in the food chain (8). The Cd accumulation in biotic systems, as a consequence of human activities, is becoming a major environmental problem, particularly in agricultural ecosystems, where it may endanger crop productivity (9).

During recent years, research on toxic effects of heavy metals, specially cadmium, on crop plants is receiving considerable attention (10). Translocation of Cd from root to shoot has been studied in several plant species, showing that it is likely to occur via the xylem and to be driven by leaf transpiration (11). The transition metal zinc plays several essential roles in the metabolism of plants, animals and fungi (4).

The purpose of this study was to investigate the effects after 8 days exposure to Cadmium and Zinc in maize seedlings, mainly in their root system.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Seeds of maize (*Zea mays* L. cv. Ag 303) were disinfected with 2.5% sodium hypochlorite for 15 min and washed thoroughly with distilled, autoclaved water and grown in moist rolled paper towel in complete nutrient solution with the major nutrients at the following mM concentrations: $\text{KNO}_3=5$; $\text{NH}_4\text{NO}_3=2$; $\text{CaCl}_2=1.5$; $\text{MgSO}_4=1.5$; and $\text{KH}_2\text{PO}_4=1$; and the minor nutrients at the following μM concentrations: $\text{FeEDTA}=9.22$; $\text{H}_3\text{BO}_3=25$; $\text{MnSO}_4=2$; $\text{CuSO}_4=0.5$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4=0.5$. Treatments were supplemented with 1 mM ZnSO_4 or CdCl_2 . The plants were kept at $30\pm 2^\circ\text{C}$ with a 16h/8h light/dark regime and pH 5.6. Seedlings were harvested after 8 days, measured and samples of roots and shoots were processed for transmission and scanning electron microscopy as described below.

Growth Measurement

The growth measurements were made after 8 days of germination for 10 seedlings. Each experiment was repeated at least 5 times.

Transmission Electron Microscopy

Plant segments with *circa* 1mm³ were fixed for 18h according to Karnovsky (12), followed by 4h postfixation in 1% OsO₄, at 4°C. They were then dehydrated using a graded series of acetone and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were obtained with a LKB Ultracut microtome equipped with a diamond knife, placed on formvar-carbon coated grids, stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate solutions and examined with a Jeol LEO 906 electron microscope.

Scanning Electron Microscopy

The materials were fixed as described above and, after dehydration, processed in the critical point dryer in a CPD 030 (Balzers). The plant materials were mounted on aluminium holders, gold sputtered with a 1 mBar argon atmosphere at 40mA for 2min (Balzers SCD 50) and observed with a JEOL JSM- 5800 LV scanning microscope, operated at 10kV.

RESULTS AND DISCUSSION

Cadmium and zinc effects were analyzed in roots and shoots of 8 days old maize seedlings. When we compared root and shoot growth, we observed that negative effects of

Cd (17.3cm) are stronger than those of Zn (27.2 cm) and the control material (27.9cm). Therefore, Zinc did not inhibit the growth of maize seedlings, verified in the shoots that presented the same values as the control material (Fig. 1A-B). Influence of heavy metals on plant metabolism has been studied for many years, mainly the effect of plant exposition to a single heavy metal (13) and the inhibitory effect of Cd^{2+} on plant growth is known for many species, including maize (14).

Examination of *Zea mays* material with scanning electron microscopy (Fig. 2A) showed that the treatment with ZnSO_4 presented a significant difference in leaf surface and stomata (Fig. 2B). The effect of Cd was more evident on both the surface and the stomata, showing the higher toxicity of this metal (Fig. 2C). Root alterations in relation to the control material (Fig. 2D) were not observed with Zn treatments (Fig. 2E), but Cd clearly affected vascular bundle disorganization (Fig. 2F). Root growth disorders have also been noticed with elevated levels of Cd in mulberry plants (15). Several studies of heavy metals have already been reported in which the distribution of mineral nutrients in plants might be modified by the presence of Cd (16), affecting their productivity (17).

As mentioned before, we did not observe Zn toxicity symptoms in the roots when analyzed with scanning electron microscopy, but in the leaves, the effects were clear, mainly altering the shape of the stomata. This suggests that the metal is translocated to the shoots more efficiently or that roots present a mechanism to exclude Zinc more efficiently than the shoots. On the other hand, the Cd effect was clearly evident in roots and shoots, being stronger in the former, suggesting that Cd is accumulated more in roots than in shoots, therefore less Cd is transported to the shoots than Zn (Fig. 1). Moreover it was observed in our experiments that Cd presents stronger toxicity symptoms than Zn even at ultrastructural levels (Fig.3).

The chloroplast ultrastructure (Fig. 3A-B) showed differences in size when treated with Zn (Fig. 3C) and was drastically affected by Cd addition, including thylakoid disorganization (Fig. 3D-G), modifications in shape and size (Fig. 3E-F), which clearly differs in comparison with untreated cells.

Ultrastructural investigations of maize leaves have provided useful information, improving the understanding of toxicity symptoms for both heavy metals. The results confirm that the effect of Cadmium is more drastic than that of Zinc (Fig. 1-3). The present investigation has shown that the chloroplast is drastically affected by Cd mainly in relation to thylakoid organization, double membranes and chloroplast shape. Chloroplasts are generally arranged in one row along the lateral cell walls. The presence of starch grains was also more evident in the Cd treated chloroplast (Fig. 3E arrow), indicating that the translocation of this polysaccharide throughout the organelle membrane was changed. In the controls, the grana and thylakoids are perfectly organized (Fig. 3A-B), while after Zn and Cd treatments, these structures were very disorganized.

Heavy metal toxicity is one of the major current environmental health problems, potentially dangerous due to bioaccumulation through the food chain and in plant products for human consumption (7). The Cd toxicity is well established and several plant metabolic processes may be altered by its presence, such as photosynthesis (5,18), water relations (19), cell respiration and enzyme activity (5).

Although not essential for plant growth, Cd is readily taken up by roots and translocated to the aerial organs of many species (20). The cadmium inhibitory effect on plant growth has been recognized for a long time, but the physiological nature of its negative effects is not fully understood despite the fact that analyses of plants treated with Cd have been made (6, 21, 22). In the present research, the disorganization of the cell and

its organelles demonstrates the toxicity symptoms for these metals and should contribute to expand our knowledge of plant cell biology in relation to heavy metal responses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank CAPES and CNPq Brazilian agencies to support this work and JF Souza PhD thesis.

REFERENCES

1. Zenk, M.H. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* **1996**, *179*, 21-30.
2. Page, A.L.; Bingham, F.T.; Change, A.C. Cadmium. In: *The effect of heavy metal pollution on plants*; N.W. Lepp Ed.; Applied Sci. Publ. Lond.: London, 1981; Vol. 1, 77-100.
3. Leita, L.; Cotin, M.; Maggioni, A. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Sci.* **1991**, *77*, 139-147.
4. Santa-Maria, G.E.; Cogliatti, D.H. The regulation of zinc uptake in wheat plants. *Plant Sci.* **1998**, *137*, 1-12.
5. van Assche, F.; Clijsters, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* **1990**, *13*, 195-206.
6. Rauser, W.E. Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two complexes. *J. Plant Physiol.* **2000**, *156*, 545-551.

7. Rauser, W.E.; Meuwly, P. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 185-202.
8. Wagner, G.H. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* **1993**, *51*, 173-212.
9. Hernandez, L.E.; Losano-Rodriguez, E.; Garote, A.; Carpena-Ruiz, R. Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. *Plant Sci.* **1998**, *132*, 139-151.
10. Boussama, N.; Ouariti, O.; Suzuki, A.; Ghorbal, M.H. Cd stress on nitrogen assimilation. *J.Plant Physiol.* **1999**, *155*, 310-317.
11. Hart, J.J.; Welch, R.M.; Novell, W.A.; Sullivan, L.A.; Kochian, L.V. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* **1998**, *116*, 1413-1420.
12. Karnovsky, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J.Cell Biol.* **1965**, *27*, 137A.
13. Siedlecka, A.; Krupa, Z. Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* **1999**, *36*, 321-331.
14. Lizaso, J.I., Melendez, L.M. and Ramirez, R. Early flooding of two cultivars of tropical maize. I. Shoots and roots growth. *J. Plant Nutr.* **2002**, *24(7)*, 979-995.
15. Prince, W.S.P.M.; Kumar, P.S.; Doberrschutz, K.D.; Subburam, V. Cadmium toxicity in mulberry plants with special reference to the nutritional quality of leaves. *J.Plant Nutr.* **2002**, *25*, 689-700.
16. Costa, G.; Morel, J.L. Efficiency of H⁺-ATPase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *J. Plant Nutr.* **1994**, *17*, 627-637.

17. Dudka, S; Piotrowska, M.; Terelak, H. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contained soil to crop plants. A field study. *Environm. Pollut.* **1996**, *94*, 181-188.
18. Krupa, Z.; Baszynski, T. 1995. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus direct and indirect effects on light and dark reactions: a review. *Acta Physiol. Plant.* **1995**, *17*, 177-190.
19. Barcelò, J.; Poschenrieder, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* **1990**, *13*, 1-37
20. Hendry, G.A.F.; Baker, A.J.M; Ewart, C.F. Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and damage in cadmium-tolerance and cadmium-sensitive clones of *Holcus lonatus*. *Acta Bot. Neerl.* **1992**, *41*, 271-281.
21. Ali, G.; Srivastava, P.S.; Iqbal, M. Effect of cadmium and copper on growth of *Bocopa mommiera* regenerants. *Biol. Plant.* **1998**, *41*, 635-639.
22. Vassilev, A.; Berova, M.; Zlatev, Z. Influence of Cd^{2+} on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biol. Plant.* **1998**, *41*, 601-606.

Figure captions

Figure 1. 8 days maize seedlings developed without heavy metals or with either 1 mM Cd or 1 mM Zn treatments. A: Maize seedlings development; B: Root and shoot length showing inhibited development, mainly with 1 mM Cd treatment.

Figure 2. Scanning electron micrography of maize roots and shoots. A and D – control; B and E -1 mM Zinc; C and F – 1 mM Cadmium. A-C: Bar = 20 μm . Leaf surface showing the stomatal complex (s). D-F: Bar = 100 μm . Roots, showing the drastic effect of Cd treated cells.

Figure 3. Transmission electron micrograph of chloroplasts. A and B = control; C = 1 mM Zinc; D-G = 1 mM cadmium. w: Cell Wall; c: Chloroplast. Note the different alterations in thylakoid shape and the absence of grana in several cells of the treated material. Starch grains were observed only in the stroma of treated Cd cells (arrows). A, B, D, F, G: Bar = 2 μm ; C, E: Bar = 3.3 μm .

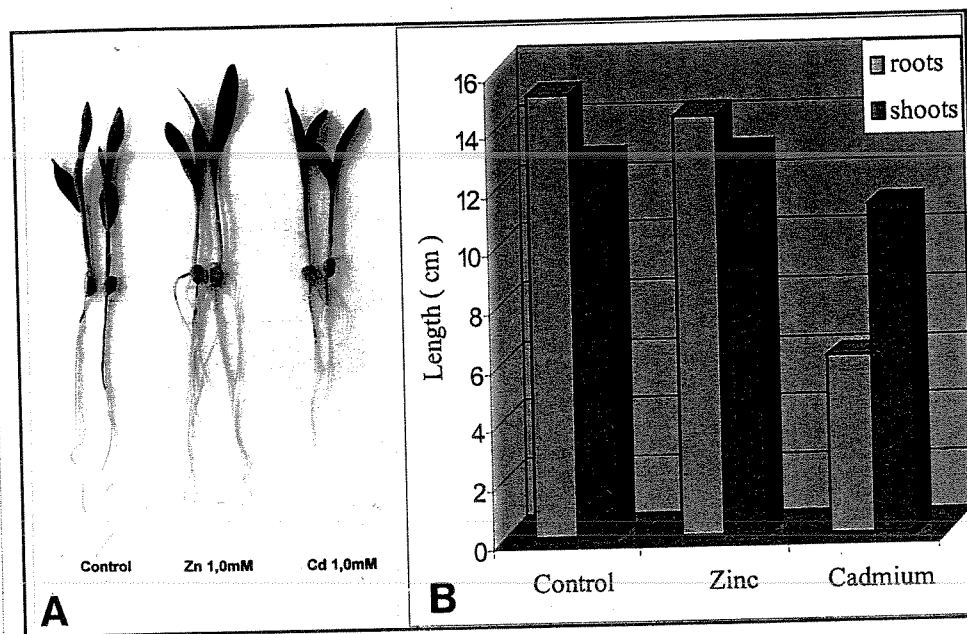


Figure 1

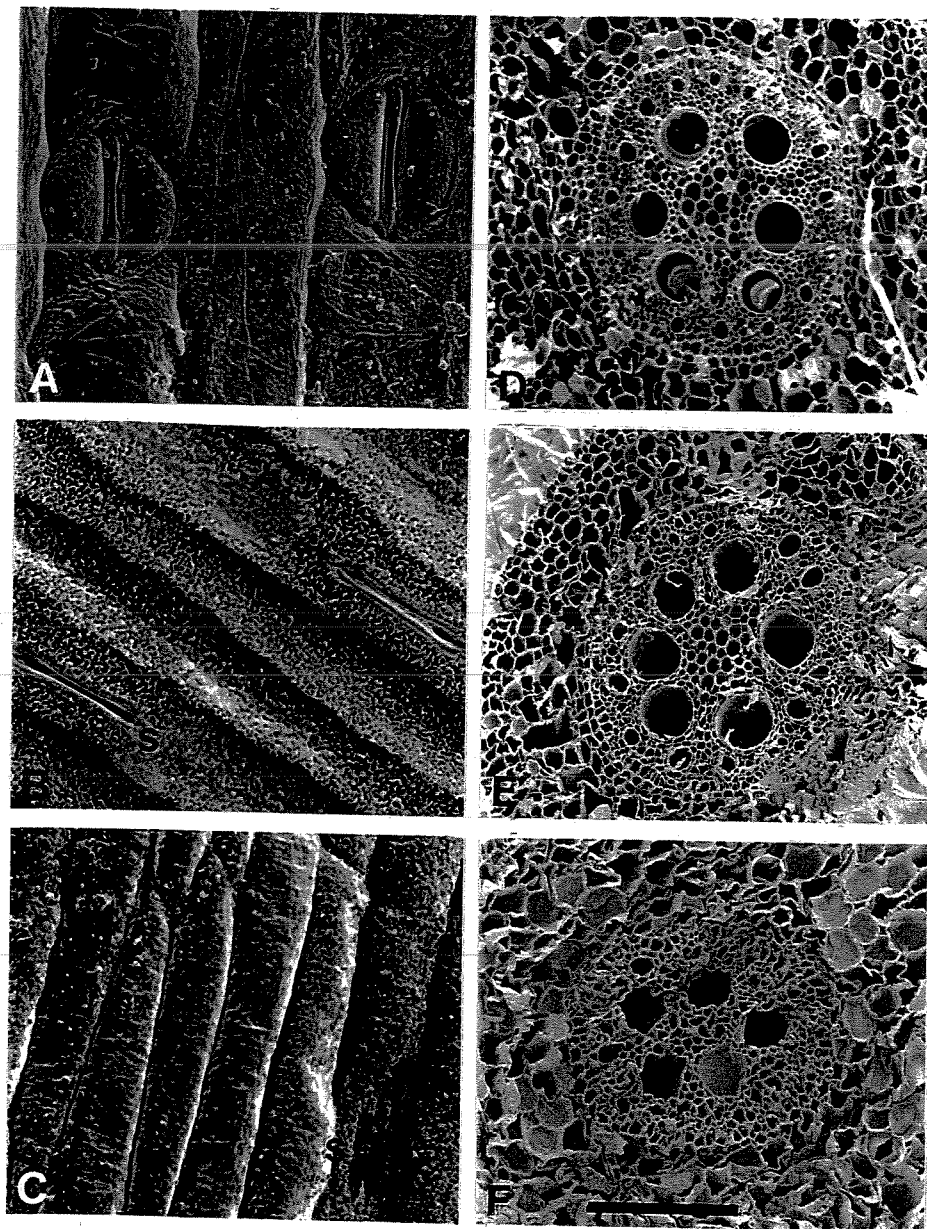


Figure 2

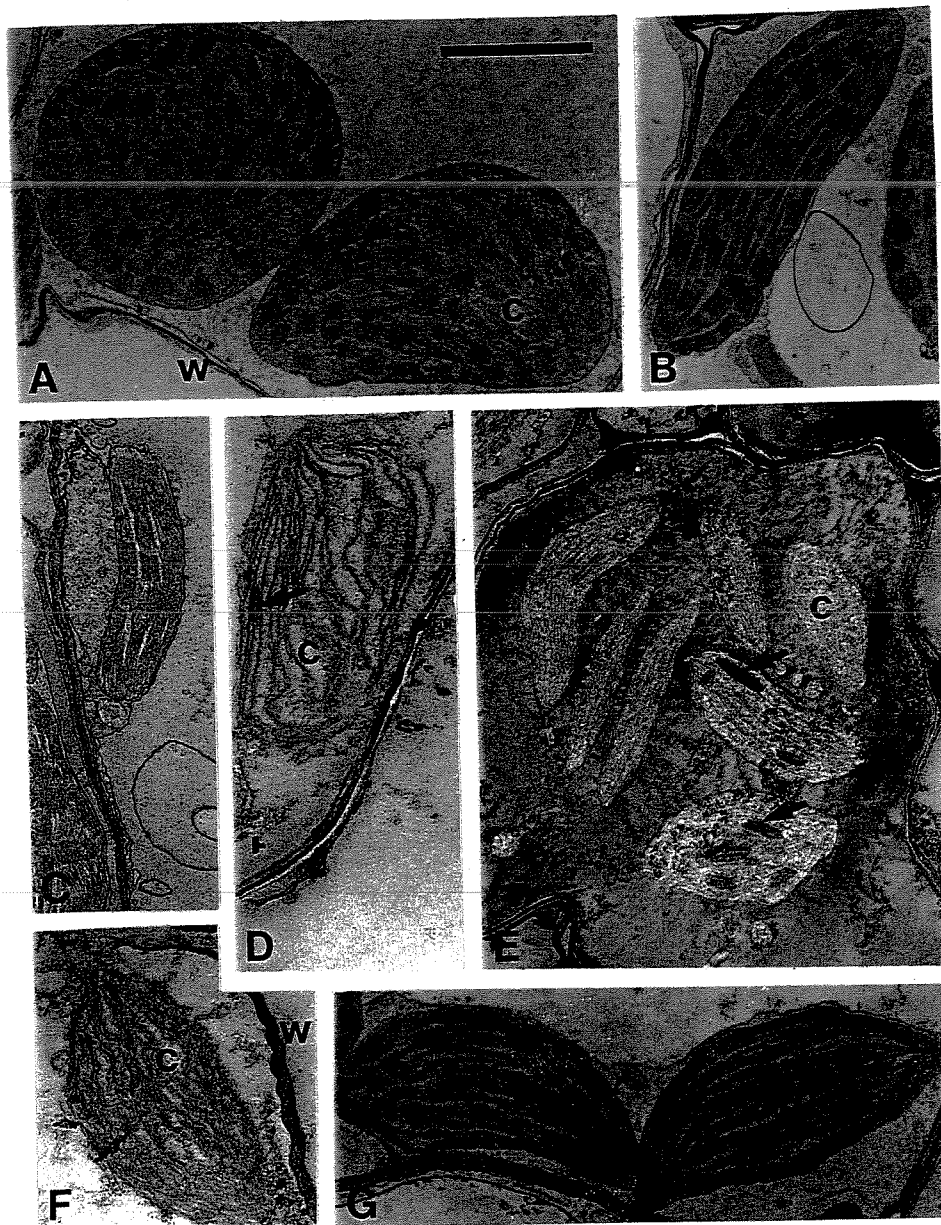


Figure 3

Capítulo 5

Cellular changes in roots and shoots of radish seedlings during growth with Cadmium, Zinc and Nickel ions excess.

Submetido: Plant Growth Regulation

Effect of Cd, Zn and Ni ions on radish seedlings

General Paper

Cellular changes in roots and shoots of radish seedlings grown with excess Cadmium, Zinc and Nickel ions.

José F. Souza, Mary A. H. Dolder and Angelo L. Cortelazzo*

*Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. *Author for correspondence (e-mail: jofransou@hotmail.com or angelo@unicamp.br); Phone: +55-19-37886110; Fax: +55-19-37886111.*

Key words: cadmium, growth, heavy metals, nickel, radish, zinc.

Abstract

Radish is considered a model crop that is easily grown in a wide range of climates. Thus it has been used an indicator plant. The objective of this study was to examine cadmium

(Cd), zinc (Zn) and nickel (Ni) effects on roots and shoots of radish seedlings, showing the structural and ultrastructural modifications due to these elements. *Raphanus sativus* (cv. redondo vermelho) seedlings were grown in culture medium and treated with 1 mM Cd, 1 mM Zn or 1 mM Ni for 8 days. The influence of these heavy metals on the growth of radishes was determined. The three heavy metals produced very different results on the organ systems. Zn had a stronger deleterious effect on root growth than on the shoots, while excess Cd and Ni was significant for both roots and shoots.

Introduction

Heavy metals, such as Cd, Zn and Ni, which are important environmental pollutants, can inhibit the development of plants and disturb a variety of structural and biochemical processes. Metal pollution in soils is a widespread international problem resulting from mining and ore refinement, nuclear processing and the industrial manufacture of a variety of products including batteries, metal alloys and electrical components. Unfortunately, poor waste disposal practices in the past, associated with industrialization, have made air, soil and water contamination very common around the world. Many metal-contaminated sites occur worldwide and they pose very serious health risks.

During recent years, research on toxic effects of heavy metal, specially cadmium, on crop plants has received considerable attention (Boussama et al. 1999). Translocation of Cd from root to shoot has been studied in several plant species showing that it is likely to occur via the xylem and to be driven by leaf transpiration (Hart et al. 1988). The

transition metal, zinc, plays several essential roles in plant metabolism of animals and fungi (Santa-Maria and Cogliatti 1998).

Several studies of heavy metals have already reported that the distribution of mineral nutrients in plants might be modified by the presence of Cd (Costa et al. 1994) affecting their productivity (Dudka et al. 1996). Many plant roots readily absorb metal ions, if they are available in the soil solution, but long-distance translocation into the shoot is often limited. It has been suggested that the mechanisms regulating absorption are chemically similar for both essential and nonessential metals (Hall 2002).

Certain plants are able to grow in soils with high metal concentration and have developed effective mechanisms to resist the metals. Plants can restrict the uptake of metals through the roots and/or the transport to the shoots, or minimize the toxic metal effects through physiological mechanisms such as compartmentalization of metals in cell walls or vacuoles, complexing the metals with chelating agents such as proteins (phytochelatins, metallothioneins) or other organic compounds (malate, citrate) or by active excretion from roots and leaves (Rauser 1990; 1999; Cobbett and Goldsbrough 2002).

Heavy metals, such as nickel and cadmium used in industrial products, reach streams and rivers via run-off from unregulated waste disposal (Novelli et al. 1998). Plants readily take up Ni from the soil, particularly under acid soil conditions (Farago and Cole 1988). Ni is considered to be an essential micronutrient for plants (Brown et al. 1987a; Welch 1995), and in low concentrations is necessary for metabolism and plant germination, as for example in cereals and cowpeas (Brown et al. 1987b; 1990; Dalton et al. 1985; Walker et al. 1985; Krogmeier et al. 1991). However phytotoxicity occurs in

many species after exposure to moderate levels of Ni, although Ni tolerance can be found in certain plants (Gries and Wagner 1998).

The purpose of this study was to investigate the effects of Cd, Zn and Ni in radish seedlings after 8 days contact and to determine possible differences in structure, ultrastructure and chlorophyll content.

Materials and methods

Plant material

Radish (*Raphanus sativus* L.) seeds were disinfected with 2.5% sodium hypochlorite for 15 min and washed thoroughly with distilled, autoclaved water.

Growth conditions and measurement

Radish seeds were germinated in complete nutrient solution with the major nutrients at the following concentrations (mM): $\text{KNO}_3=5$; $\text{NH}_4\text{NO}_3=2$; $\text{CaCl}_2=1.5$; $\text{MgSO}_4=1.5$; and $\text{KH}_2\text{PO}_4=1$; and the minor nutrients at the following concentration (μM): $\text{FeEDTA}=9.22$; $\text{H}_3\text{BO}_3=25$; $\text{MnSO}_4=2$; $\text{CuSO}_4=0.5$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4=0.5$, followed by 1 mM of ZnSO_4 , or CdCl_2 , or NiCl_2 . 0.1% agar was added to this solution. The temperature in the growth chamber was $25\pm 2^\circ\text{C}$ (day and night) with a photoperiod of 12 h and pH 5.6. Each treatment was repeated in triplicate.

Growth measurements were made after 8 days of germination for 10 seedlings. Each experiment was repeated at least 5 times.

Chlorophyll Extraction

One hundred milligrams of leaf tissue without maceration, were extracted with DMSO according to Hiscox and Israelstam (1979).

Light Microscopy

Leaf segments were fixed according to Karnovsky (1965), for 18h, followed by dehydration using a graded series of acetone and embedded in JBC resin. Leaves processed this way were sectioned at a thickness of 5 μ m and stained with 1% toluidine blue pH 11.

Scanning Electron Microscopy

Karnovsky's fixative (1965) was used for plant segment treatments, for 12h, followed by 1% OsO₄ for 4h, at 4°C, dehydration using a graded acetone series, and critical point drying in a CPD 030 (Balzers). The plant materials were mounted on aluminum holders, gold sputtered in a 1 mBar argon atmosphere at 40mA for 2min and observed in a JEOL JSM- 5800 LV scanning electron microscope, operated at 10kV.

The plant segments were cut and fixed as described above for scanning microscopy, and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were obtained with a Reichert-Jung Ultracut ultramicrotome, equipped with a diamond knife, placed on formvar-carbon coated grids, stained with aqueous uranyl acetate and lead citrate and examined with a Zeiss LEO 906 transmission electron microscope.

Results and Discussion

The influence of heavy metals on plant metabolism has been studied for many years, mainly using a single heavy metal. The inhibitory effect of Cd^{2+} on plant growth is known for some time, but the physiological nature of its negative effect is not fully understood (Vassilev et al 1998). It is known that even at relatively low concentrations, Cadmium is considered to be a toxic element for all living organisms. As a consequence of Cd uptakes, its accumulation in plants and the possible effects on human health have received attention in recent years (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

The Figure 1 shows evident effects of the heavy metals in radish seedlings. The differences found in roots and shoots demonstrated increasingly serious symptoms.

Examination of *R. sativus* leaves with light microscopy (Figure 2) showed that leaves treated with ZnSO_4 , presented practically the same characteristics as the control leaf (Figure 2A), except for the spongy parenchyma, that presented larger intercellular spaces

than the control (Figure 2B). However a large intercellular space was not present when treated with Cd (Figure 2C, D) and Ni (Figure 2E, F). Treatment with Ni showed mesophyll cells with various vacuoles in contrast with the control and the other two heavy metals that presented a single, central vacuole. Not only Cd treatment, but also Ni resulted in an increase in number, dimensions and shape of palisade and spongy parenchyma cells.

Abaxial leaf surfaces of *R. sativus* have two characteristic types of cells: epidermal cells (EC) and cells from the stomatal apparatus (SC), including the guard cells (Figure 3A). However these two types of cells presented differences when treated with heavy metal. When they were treated with Zn (Figure 3B) the SC were modified, diminishing in size and increasing the number of cells compared with the control. Treatment with Cd (Figure 3C) and Ni (Figure 3D) completely modified the epidermal surface showing changes not only in the EC but also in the SC. The cells grown with excess Cd modified the cell wall matrix so that the cells appear to be covered by a flocculent material (Figure 3C). Ni treated cells are irregularly wrinkled, suggesting a thinner wall than occurs in the other treatments.

The effects of these heavy metals on the root can be seen in Figures 3E-H. These figures show that the Zn provokes only slight modifications of these structures when compared with the control (Figures 3E-F). On the other hand, Cd has drastic effects (Figure 3G) on the organization of the phloem and xylem, while Ni (Figure 3H) causes somewhat less damage than Cd.

Comparing root and shoot growth, alterations of the roots were greater (Figure 1). On the other hand, the heavy metals at sufficiently high levels were very toxic to the entire

plants, by interfering with photosynthetic and respiratory activities (Yang *et al.* 1996), mineral nutrition (Barcelò & Poschenreider 1990), enzymatic activity (Krogmeier *et al.* 1991; Pandolfini *et al.* 1992), membrane functions (Pandolfini *et al.* 1992), as well as in decreasing plant growth (Bingham *et al.* 1986; Palacios *et al.* 1995; 1998) water uptake (Pandolfini *et al.* 1996) and chlorophyll concentration (Pandolfini *et al.* 1992; Brune *et al.* 1995).

Both Cd and Ni were observed to be related to chlorophyll destruction (Table 1), thus interfering with all development including the absence of chloroplasts and the presence of undifferentiated plastids. With Zn, chlorophyll decreased somewhat, in relation to the control (Table 1). Changes in chloroplast structure or their functional characteristics have been studied in leaves and various stages of their development can be analyzed by structural changes, especially as regards the inner membrane system. Chloroplasts showed the most severe damage with the heavy metal treatments in relation to the control cells (Figures 4 A-D), with smaller effects in leaves developed in ZnSO₄ presence (Figure 4E). With Cd, (Figures. 4F, G, H), the thylacoidal system of the deformed chloroplasts was more (Fig. 4F) or less (Fig. 4H) drastically damaged. In other chloroplasts, we clearly observed a change in shape (Fig. G). Large starch grains were present in most of the modified chloroplasts as well as smaller ones in those treated with Zn (Figures 4E and 4G-H). We did not find starch grains in the control chloroplast. For the Ni treated material, as consequence of a little reserve mobilization, no chloroplasts were observed and the cell contained many protein bodies and other reserve vesicles (Figure 4I)

In the control and Zn treatment, we found nuclei and nucleoli (Figures 4C, D, E) but for Cd treatment we did not observe the presence of these organelles, while Ni treated seedlings had altered nuclei (Fig.4E). Occasionally, the plasma membrane was detached from the cell wall, possibly caused by a slight plasmolysis during fixation (Fig. 4E) or due to the treatment. The same problem has been described in internodal cells by Heumann (1987).

This data shows the drastic effect of these heavy metals in radish plants and suggests an urgent need for a coordinated and more in depth approach to the study of combined toxicology and pathology of cadmium and nickel. Concomitant exposure to these metals frequently occurs, e.g. production of nickel-cadmium batteries, contaminated tobacco, metallic alloys, metallic implants (Takamura *et al.* 1994). Both Cd^{2+} and Ni^{2+} have the highest potential risk to population health, when compared to other heavy metals (Kucera *et al.* 1995) and for this reason their toxic effects should urgently be established.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and CNPq Brazilian agencies and it was part of JF Souza PhD thesis at the Plant Biology Program of the State University of Campinas.

References

- Barcelò J. and Poschenrieder C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13: 1-37.
- Bingham F.T., Sposito G. and Strong J.F. 1986. The effect of sulphate on the availability of cadmium. *Soil Sci.* 141: 172-177.
- Boussama N., Ouariti O., Suzuki A. and Ghorbal M.H. 1999. Cd stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155: 310-317.
- Brown P.H., Welch R.M., Cary E.E. and Checkai R.T. 1987a. Beneficial effect of nickel on plant growth. *J. Plant Nutr.* 10: 2121-2135.
- Brown P.H., Welch R.M. and Cary E.E. 1987b. Nickel: a micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85: 801-803.
- Brown P.H., Welch R.M. and Madison J.T. 1990. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid and nitrogen levels in barley. *Plant Soil.* 125: 19-27.
- Brune A., Urbach W. and Dietz J. 1995. Differential toxicity of heavy metal in partly related to a loss preferential extraplasmic compartmentation: A comparison of Cd-, Mo-, Ni-, and Zn-stress. *New Phytol.* 129: 403-409.
- Cobbett C. and Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- Costa G. and Morel J.L. 1994. Efficiency of H⁺-ATPase activity on cadmium uptake by four cultivars of lettuce. *J. Plant Nutr.* 17: 627-637.

- Dalton D., Evans H.J. and Hanus F.J. 1985. Simulation by nickel of soil microbial urease activity and urease and nitrogenase activities in soybeans growth in a low-nickel soil. *Plant Soil*. 88: 245-258.
- Dudka S., Piotrowska M. and Terelak H. 1996. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contained soil to crop plants. A field study. *Environm. Pollut.* 94: 181-188.
- Farago M.E. and Cole M.M. 1988. Nickel and Plants. In: Sigel H., Sigel A (eds) *Nickel, its role in biology*, New York, pp 47-90.
- Gries G.E. and Wagner G.J. 1998. Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta*. 204: 390-396.
- Hall J.L. 2002. Cellular mechanism of heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53: 1-11.
- Hart J.J., Welch R.M., Novell W.A., Sullivan L.A. and Kochian L.V. 1998. Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116: 1413-1420.
- Heumann H.G. 1987. Effect of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. *Protoplasma*. 136: 37-48.
- Hiscox J.D. and Israelstam G.F. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57: 1332-1334.
- Karnovsky M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137A.

- Krogmeier M.J., Mccarty G.W., Shogren D.R. and Bremmer J.M. 1991. Effect of nickel deficiency in soybeans on the phytotoxicity of foliar-applied urea. *Plant Soil*. 135: 283-286.
- Kucera J., Benko V., Sabione E. and Venne M.T.V. 1995. Review of trace elements in blood serum and urine for the Czech and Slovak populations and critical evolution of their possible use as reference values. *Sci. Total Environ*. 166: 211-234.
- Novelli E.L.B., Hernandes R.T., Novelli Filho J.L.V.B. and Barbosa L.L. 1998. Differential combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissue of rats. *Environ. Pollut*. 103: 295-300.
- Palacios G., Gómez I., Carbonell-Barrachina A., Navarro Padreño J. and Mataix J. 1998. Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield. *J. Plan Nutr*. 21: 2179-2191.
- Palacios G., Gómez I., Moral R. nd Mataix J. 1995. Nickel accumulation in tomato plants. Effect on plant growth. *Fresenius Environ. Bull*. 4: 469-474.
- Pandolfine T., Gabrielli R. and Ciscato M. 1996. Nickel toxicity in two durum wheat cultivars differing in drought sensitivity. *J.Plant Nutr*. 19: 1611-1627.
- Pandolfini T., Gabrielli R. and Comparini C. 1992. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environ*. 15: 719-725.
- Rauser W.E. 1990. Phytochelains. *Annu. Rev. Biochem*. 59: 61-86.
- Rauser W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants – the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys*. 31: 19-48.

- Santa-Maria G.E. and Cogliatti D.H. 1998. The regulation of zinc uptake in wheat plants. *Plant Sci.* 137: 1-12.
- Takamura K., Hayashi K., Ishinishi N., Yamada T. and Sagioka Y. 1994. Evaluation of carcinogenicity and chronic toxicity associated with orthopedic implants in mice. *J. Biochem. Mat. Res.* 28: 583-589.
- Vassilev A., Berova M. and Zlatev Z. 1998. Influence of Cd^{2+} on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biol. Plant.* 41: 601-606.
- Walker C.D., Graham R.D., Madison J.T., Cary E.E. and Welch R.M. 1985. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Plant Physiol.* 79: 474-479.
- Welch R.M. 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Sci.* 14: 49-82.
- Yang X., Baligar V.C., Martens D.C. and Clark R.B. 1996. Plant tolerance to nickel toxicity. II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *J. Plant Nutr.* 19: 265-279.

Table 1. Comparison of chlorophyll concentration (mg.g^{-1} fresh weight) in radish leaves treated during 8 days with Zinc, Cadmium and Nickel salts.

Treatment	Control	Zinc	Cadmium	Nickel
Chlorophyll concentration	2.85	1.66	0.89	0.41

Figure Legends

Figure 1. Effect of 1mM Zinc, Nickel or Cadmium on the growth of the roots and shoots of radish (*Raphanus sativus* L.) during 8 days. The effect of the metals studied on the growth of roots and shoots of radish seedlings is shown.

Figure 2. Light microscopy image of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves stained by toluidine blue after 8 days treatment of 1 mM Cadmium, Zinc and Nickel. Control (A); Zinc (B); Cadmium (C, D) and Nickel (E, F). The spongy mesophyll of control (A) and Zn treated (B) leaves are very similar, with pronounced chloroplasts (→). In Cd treated plantlets both the palisade (C) and mesophyll (D) cells are compacted, with some reserves (r). Ni treatment resulted in very dense tissues (E-F), still filled with reserves (r) contained in multiple vacuoles (v). Bar = 50 µm.

Figure 3. Scanning electron microscopy images of leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.) after 8 days treatment. Leaves (A-D) and roots (E-H). Control (A, E); 1 mM Zinc (B,F); 1 mM Cadmium (C,G) and 1 mM Nickel (D,H). Epidermal cells (e) and stomatal cells (s) are clearly observed for control (A) and Zn treatments (B) with apparent increase in number and reduction in size in guard cells. Cd (C) and Ni (D) alter the cell wall making the guard cells hard to recognize. Cross sections of roots in control plantlets (E) are slightly altered in Zn treated materials (F). The strongest disorganization was found in Cd (G) and Ni (H) treated roots. Bar: A-D = 20 µm; E-H = 40 µm.

Figure 4. Transmission electron microscopy images of radish (*Raphanus sativus* L.) leaves after 8 days treatment with 1 mM of heavy metals. Control (A-D), Zinc (E), Cadmium (F-H) and Nickel (I,J). Control (A-B) chloroplasts (c) are seen near mitochondria (m) and nuclei (n), with nucleoli (nc). Chloroplasts of Zn treated leaves are very dense and contain large starch grains (g). Cd treated material showed deformed chloroplasts and very large starch grains. Vesicles of reserve substances (r) can still be found. The leaves of Ni treated material are the least developed with various vacuoles (v) and large amounts of reserve vesicles (r), as in cotyledon cells. Bar = 2 μ m.

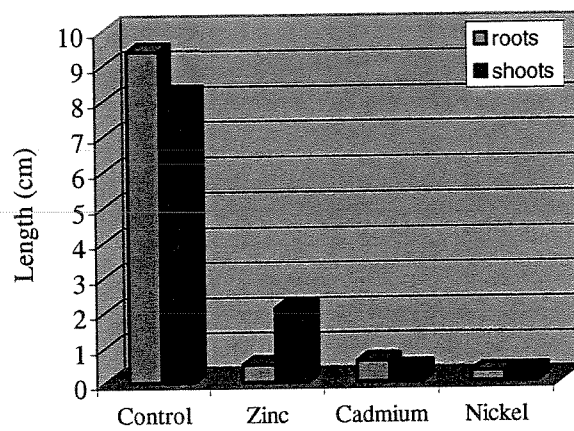


Figura 1

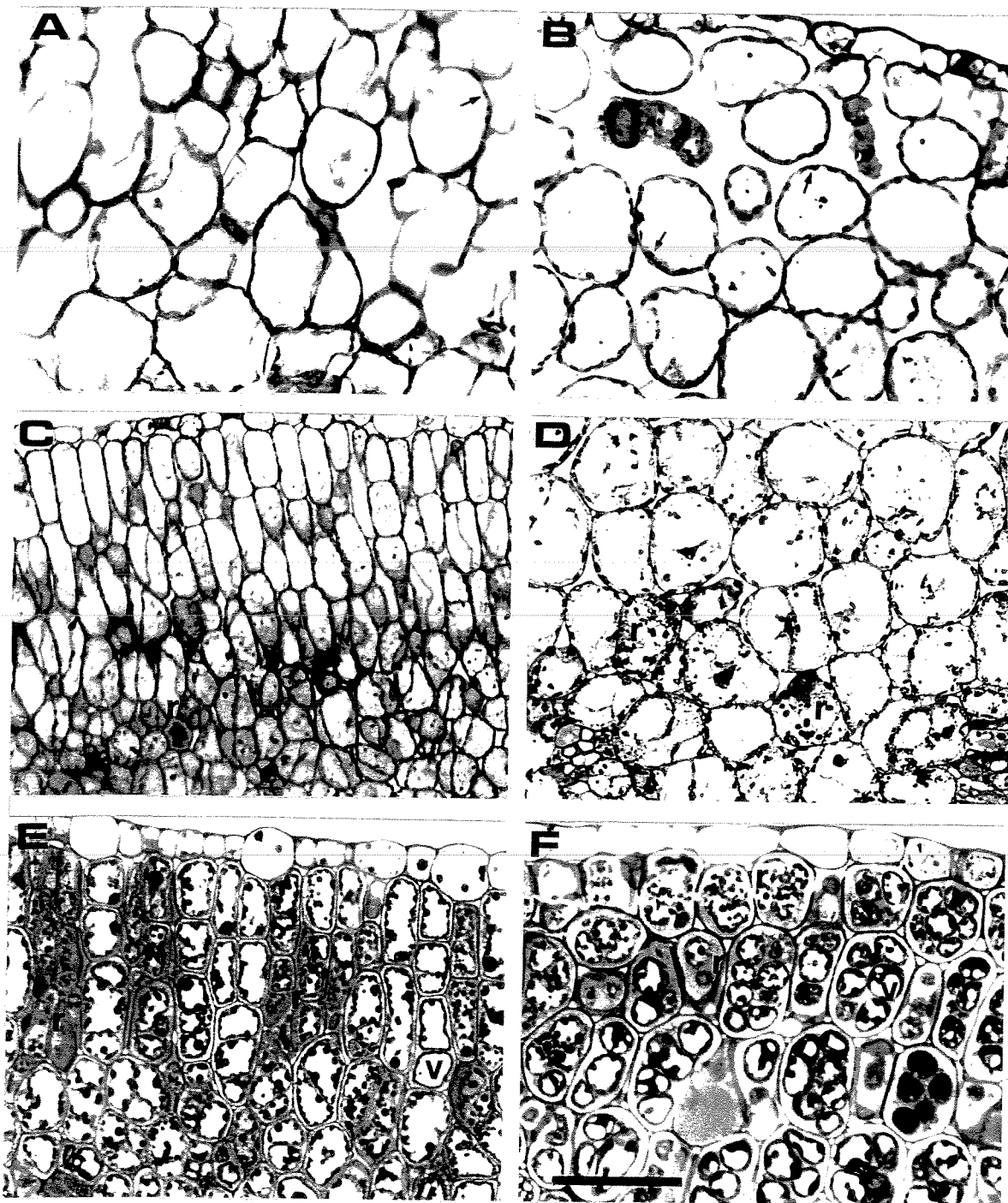


Figure 2

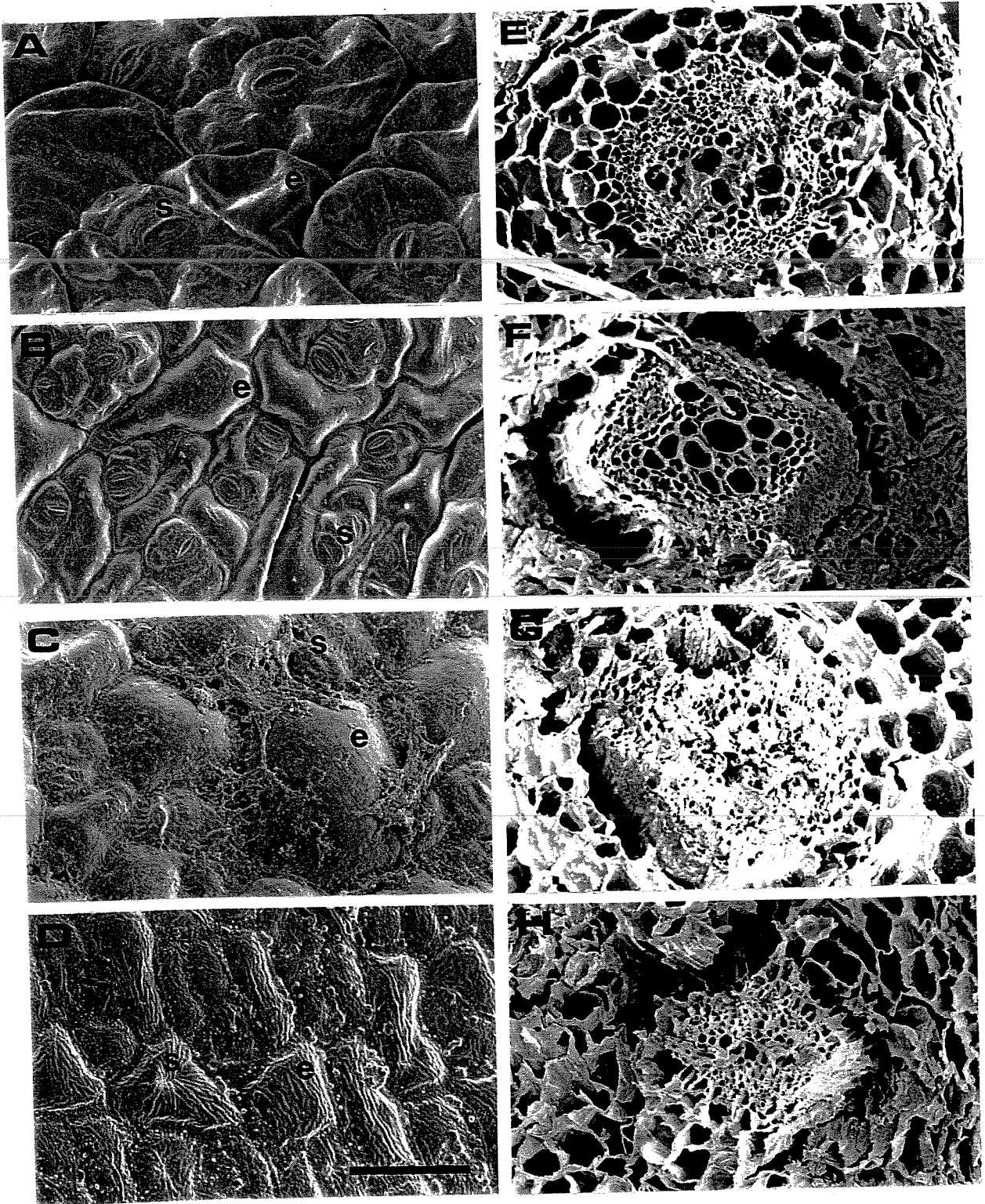


Figure 3

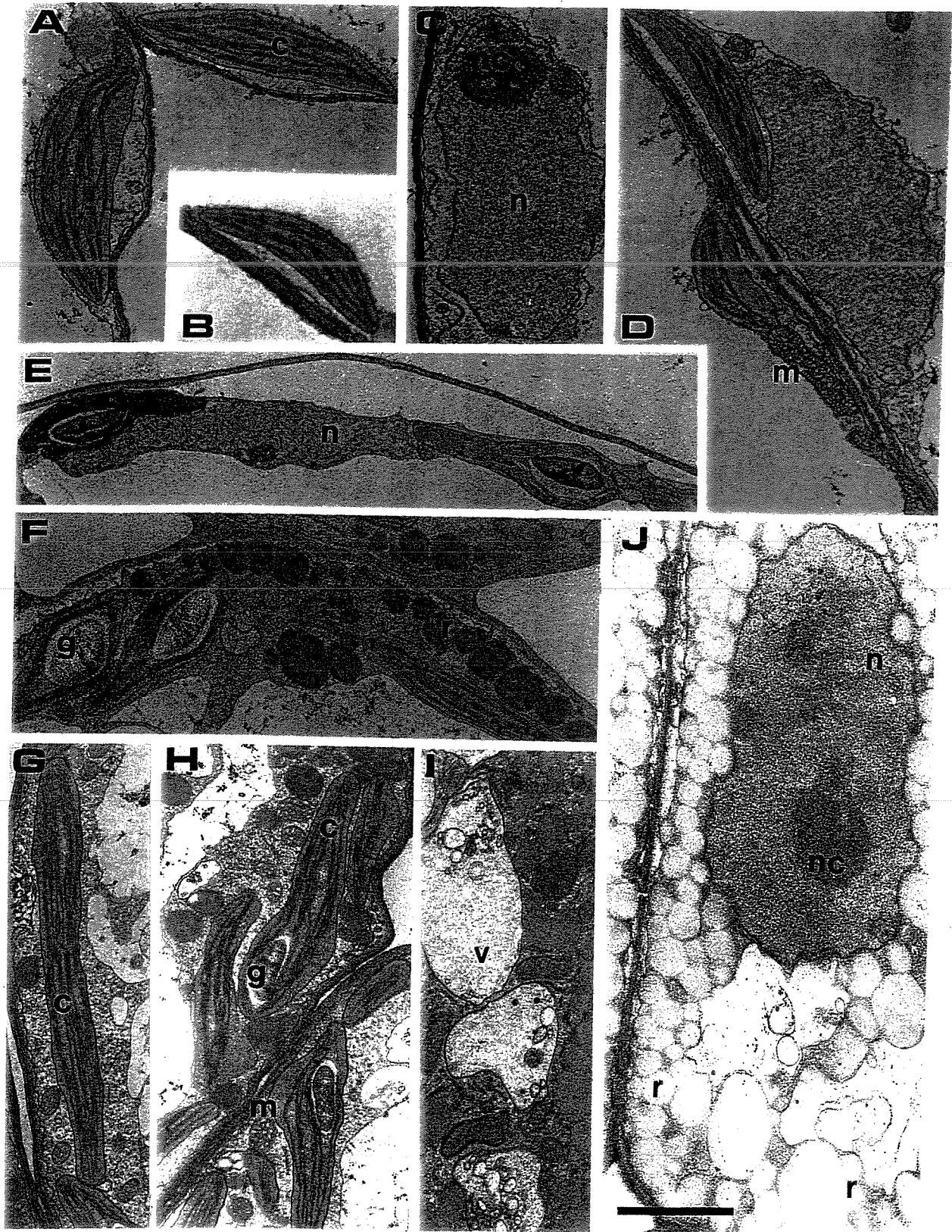


Figure 4

Capítulo 6

**Comparação entre os efeitos causados por metais pesados
no desenvolvimento de plântulas de rabanete e milho**

A ser submetido

Efeito de metais pesados em rabanete e milho

Comparação entre os efeitos causados por metais pesados no desenvolvimento de plântulas de rabanete e milho

José F. Souza, Cristiane Mobilon & Angelo L. Cortelazzo*

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual
de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

* Autor para correspondência: Departamento de Biologia Celular, IB, CP 6109,
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Phone:
+55-19-37886110; Fax: +55-19-37886111;
e-mail: angelo@unicamp.br or jofransou@hotmail.com.br.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de metais pesados na estrutura e ultraestrutura celulares das folhas de plântulas de milho (*Zea mays* L. cv. Ag 303) e rabanete (*Raphanus sativus* L). Análises em microscopia de luz mostraram que 1 mM de cádmio, zinco e níquel afetam diferentemente plântulas dessas espécies após 8 dias de exposição, sendo níquel e cádmio os metais mais efetivos na promoção de alterações. No caso do milho, os maiores efeitos foram para o cádmio, com alterações severas nos cloroplastos das células do mesófilo, mas poucas alterações nas estruturas destas organelas nas células da bainha vascular. Para zinco, pouca influência foi notada no milho, independentemente da região da folha observada. Em rabanete, todos os tratamentos provocaram alterações estruturais e ultraestruturais nas células das folhas das plântulas observadas.

Palavras chave: milho, rabanete, cádmio, zinco, níquel.

Introdução

Um dos maiores problemas na sociedade moderna se refere à acumulação de metais pesados no solo e deste, uma bioacumulação através da cadeia alimentar (Rauser e Meuwley 1995; Helal et al. 1996).

O cádmio (Cd) é um metal não essencial que vem sendo espalhado em nosso ambiente, principalmente pelas atividades industriais, agroindustriais, metalúrgicas e incineração do lixo (Rascio et al. 1993; Marchiol et al. 1996), causando sérios danos ao meio ambiente, até mesmo em baixas concentrações (Clemens 2001). Seus efeitos

biológicos e os mecanismos da sua toxicidade ainda não estão claramente entendidos. Apesar disso, já se sabe que ele pode interagir com várias enzimas, interferindo em diferentes vias metabólicas ou na diferenciação estrutural e funcional de organelas celulares como os cloroplastos (Barcelò et al. 1988; Rascio et al. 1993). Cd também inibe ativamente a abertura estomática, mas como isso acontece ainda não está bem entendido (Sanità di Toppi & Gabbrielli 1999).

Ao contrário do Cd, o zinco (Zn) e o níquel (Ni) são micronutrientes essenciais à sobrevivência de plantas. Atualmente vem se dando muito mais importância aos limites de fitotoxicidade ao Zn que causa problemas a seres vivos e ao meio ambiente. Ao contrário de solos contaminados por Ni o qual pode causar fitotoxicidade “natural” em solos extremamente ácidos (solos derivados de rochas do tipo serpentina), poucos solos naturais contêm altos níveis de Zn e, quando isso ocorre, é resultado de atividades humanas (Chaney, 1993), inclusive pela ação de pesticidas e utilização acumulativa de lodo de esgoto na agricultura (Berrow & Burridge, 1990).

O objetivo deste trabalho foi mostrar o efeito desses três metais em células das folhas de plântulas de rabanete e milho submetidas a concentrações tóxicas desses elementos.

Material e Métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de rabanete (*Raphanus sativus* L) e milho (*Zea mays* L. cv. Ag 303) foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio 2,5%, por 15 min, e lavadas com

água destilada autoclavada. As sementes foram colocadas para germinar em condições de fotoperíodo de 16/8h de luz/escuro.

As sementes de rabanete foram germinadas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ em solução nutritiva completa contendo as seguintes concentrações de sais macronutrientes (mM): $\text{KNO}_3=5$; $\text{NH}_4\text{NO}_3=2$; $\text{CaCl}_2=1,5$; $\text{MgSO}_4=1,5$; and $\text{KH}_2\text{PO}_4=1$; e as seguintes concentrações de sais micronutrientes (μM): $\text{FeEDTA}=9,22$; $\text{H}_3\text{BO}_3=25$; $\text{MnSO}_4=2$; $\text{CuSO}_4=0,5$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4=0,5$; pH 5,6. Cd, Zn e Ni foram adicionados à solução (1mM): ZnSO_4 , CdCl_2 , e NiCl_2 , bem como ágar a 0,1%. Sementes de milho foram germinadas e mantidas em rolos de papel toalha umedecidos na mesma solução acima. As plântulas foram mantidas em câmara de germinação a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$.

As plântulas obtidas foram coletadas após oito dias, medidas (cinco repetições de dez plântulas cada) e processadas para a microscopia de luz ou microscopia eletrônica de transmissão (três repetições cada), conforme descrito abaixo.

Microscopia de luz

Segmentos das plântulas foram cortados e fixados durante 8 h à 4°C (Karnovsky, 1965) e, a seguir, foram desidratados usando uma série de soluções de acetona com concentrações crescentes e embebidos em resina JBC. Foram feitos cortes semifinos ($2\mu\text{m}$), corados com azul de toluidina 0,025%, pH 4, para a detecção de radicais aniônicos e xylidine Ponceau 0,1%, pH 2,5, para radicais catiônicos. Foi ainda realizado o método do PAS (ácido periódico/reativo de Schiff) para a visualização de polissacarídeos e glicoproteínas (Cortelazzo, 1992).

Microscopia eletrônica de transmissão

Segmentos vegetais com cerca de 1mm³ foram fixados como descrito acima, seguindo-se pós-fixação em OsO₄ e embebição em resina Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos através de um ultramicrotomo Leica MT com navalha de diamante, colocados em telas de cobre, contrastados com soluções aquosas de acetato de uranila 0,2% e citrato de chumbo 2% e observados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss LEO 906.

Resultados

Plântulas de rabanete e milho apresentaram uma diminuição do crescimento quando tratadas com soluções 1 mM de Cd ou Ni. No entanto, esse efeito foi muito mais drástico em rabanete do que em milho, principalmente no que diz respeito ao desenvolvimento do sistema radicular (Tabela 1). Quando essas plântulas foram tratadas com 1 mM de Zn a diferença do efeito fitotóxico em relação aos outros dois metais foi também evidente, uma vez que o milho não apresentou alteração significativa no seu crescimento e o rabanete foi severamente afetado. Deste modo pode ser notado que em milho apenas o desenvolvimento do sistema radicular foi afetado, enquanto que em rabanete houve um efeito generalizado na parte aérea e no sistema radicular. Apesar desse fato, a parte aérea foi menos afetada pelo Zn, sendo que os dois outros elementos utilizados foram bastante tóxicos nas duas porções medidas (Tabela 1).

Estudos microscópicos com as folhas dessas espécies confirmaram os resultados da morfologia externa: um menor efeito dos tratamentos nas folhas de milho do que naquelas de rabanete (Figura 1).

Em rabanete, o aspecto do material controle e dos demais tratamentos foi distinto (Figura 1A). No tratamento com zinco foi notada uma grande quantidade de material PAS positivo no interior das células do parênquima foliar. Foram vistas alterações na quantidade das células guarda dos estômatos, mais abundantes no material controle e no tratado com zinco do que nos demais tratamentos (Figura 1A-D). Na região do parênquima paliádico, além do material granular já descrito, não foram notadas diferenças no formato e tamanho das células do material tratado com Zn (Figura 1B). Entretanto, para aqueles tratados pelo Cd (Figura 1C) ou Ni (Figura 1D) as células de apresentaram menores e com conteúdo mais evidente, principalmente para o material tratado pelo Ni. Folhas tratadas com Zn apresentaram o parênquima esponjoso com células menores do que o controle (Figura 1E e 1F). Também puderam ser notadas paredes celulares danificadas, principalmente no parênquima esponjoso e no feixe vascular do material tratado com metais pesados em relação ao controle. O Cd causou uma diminuição no crescimento também das células do parênquima esponjoso (Figura 1G), enquanto que as folhas que se desenvolveram na presença do Ni praticamente não desenvolveram um parênquima lacunoso (Figura 1H), apresentando células também menores e mais compactadas em relação ao controle.

A coloração do material pelo xylidine Ponceau (XP) revelou uma distribuição periférica dos cloroplastos nas células parenquimáticas das folhas do material controle (Figura 1I). No material que se desenvolveu na presença de Zn (Figura 1J) ou Cd (Figura 1K) foi notada a presença de material XP-positivo em quantidade, mais evidente nas células tratadas pelo Zn do que pelo Cd, dificultando a observação de cloroplastos. Para o material tratado pelo Ni, o aspecto das células coradas pelo XP revelou um conteúdo protéico que mais se assemelha às células de reserva dos cotilédones do que as células de parênquima

foliar, mostrando um efeito mais drástico no desenvolvimento e mobilização das reservas protéicas da semente (Figura 1L).

No caso das folhas de milho, também na estrutura celular os efeitos dos metais pesados não foram significativos (Figura 1M-P). Mesmo assim, podem ser sugeridas algumas diferenças referentes à espessura das folhas, com aparente diminuição para o material tratado pelo Cd ou Ni. Do mesmo modo, a reatividade das paredes aos corantes para esses dois tratamentos foi menor (Figura 1O-P) em relação ao controle (Figura 1M) e tratamento com Zn (Figura 1N), sugerindo alterações na estrutura das paredes. No caso do Ni, puderam ainda ser notadas alterações mais drásticas no formato das células da epiderme e do parênquima foliar (Figura 1P).

A microscopia eletrônica de transmissão revelou que a estrutura dos cloroplastos do material controle (Figura 2A-B) das folhas de rabanete se apresenta com cada granum contendo poucos tilacóides e poucos grana no estroma dos cloroplastos, com uma maior quantidade de lamelas de tilacóides de estroma (Figura 2B). No material tratado pelo Zn (Figura 2C) há um aumento no tamanho dos cloroplastos em relação ao controle mas, aparentemente, nenhuma alteração na organização interna da organela. Já para o material tratado pelo Cd (Figura 2D) nota-se que os cloroplastos aumentam de tamanho e acumulam grandes quantidades de amido em seu interior, com aparente diminuição da quantidade de grana. Com o níquel, a ausência de desenvolvimento de estrutura foliar não permitiu a formação de cloroplastos, confirmando o retardo observado pela microscopia de luz, com uma estrutura praticamente de tecido de reserva cotiledonar.

Em milho, pôde ser observado o dimorfismo dos cloroplastos presentes em células do mesófilo (M) e da bainha vascular (V). Os primeiros apresentaram grana com muitos

tilacóides, interligados por tilacóides de estroma, enquanto que os da bainha, não apresentam grana, mas apenas os tilacóides de estroma dispostos ao longo do maior eixo da organela (Figura 3A-B). Após o tratamento com metais, folhas que se desenvolveram na presença de Zn ou Ni apresentaram poucas diferenças na estrutura interna de seus cloroplastos, ou na quantidade e tamanho dessas organelas (Figura 3C-D). Em alguns casos, notou-se um conteúdo menos eletrondenso nos estromas dessas organelas (Figura 3C), mas a estrutura dos cloroplastos do mesófilo continuou apresentando um sistema interno de membranas organizado e com formação de grana (Figura 3D). Para o material tratado pelo Cd (Figura 3E), os cloroplastos das células da bainha vascular (V) mostraram-se mais resistentes e praticamente se desenvolveram de forma idêntica aos demais tratamentos. Entretanto, nas células do mesófilo (M) muitos cloroplastos foram totalmente danificados, apresentando menor desenvolvimento, danos nas membranas formadoras do envelope, e total desorganização do sistema de endomembranas, praticamente sem nenhum *granum* evidente (Figura 3F).

Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho nos levam a concluir que plantas de milho são menos sensíveis à ação dos metais utilizados do que as plântulas de rabanete, ao menos na concentração utilizada e durante a germinação e início do desenvolvimento de suas plântulas. Os resultados mostram, ainda, profundas diferenças nas respostas das plântulas de milho e rabanete aos tratamentos com metais pesados. Outros dados obtidos com essas espécies revelam diferenças quando da translocação desses metais durante o

desenvolvimento inicial das plântulas, sendo que o zinco é proporcionalmente mais translocado para a parte aérea que o cádmio. Do mesmo modo, o acúmulo intracelular se dá preferencialmente no vacúolo para cádmio e, menos certamente, também para o zinco (Souza e Rauser, 2003).

O fato de não ter havido praticamente nenhum desenvolvimento de parte aérea para os tratamentos com Cd e Ni em rabanete, tornaram muito evidentes as alterações estruturais ocorridas nos mesmos. A semelhança das células foliares com aquelas presentes em cotilédones no caso do níquel, se deveu a essa pouca diferenciação e desenvolvimento decorrente do uso desse metal. As células continuam com seus corpos protéicos bem evidentes, a exemplo do que ocorre com as células cotiledonares de outras plantas que apresentam algum acúmulo protéico, como ocorre com soja e feijão (Cortelazzo & Vidal, 1991; Begnami & Cortelazzo, 1996).

Os resultados obtidos confirmam também as alterações observadas na superfície das folhas de plantas desenvolvidas na presença desses metais e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura (Souza, 2003). Chardonens et al. (1998) estudaram o efeito do Cd em *Silene vulgaris* e observaram que ecotipos tolerantes apresentaram um número de estômatos na epiderme superior e inferior igual a ecotipos sensíveis, mas, a densidade estomática (estômatos.mm⁻²) foi maior na epiderme inferior de plantas tolerantes. Os nossos resultados mostraram que esses metais afetam não só a quantidade, mas especialmente a estrutura dos estômatos.

Sabe-se que na presença de Cd há diminuição de fotossíntese e esta diminuição está relacionada principalmente à deficiência de ferro (Vassilev et al., 1998) e à diminuição da troca gasosa, pela indução do fechamento dos estômatos e dificultando o acesso de gás

carbônico (Barcelò & Poschenrieder, 1990; Vassilev et al., 2002). Estudos ultraestruturais relatam a desorganização dos *grana* e aumento do número e tamanho dos plastoglóbulos no cloroplasto, bem como o aumento da célula e tamanho do vacúolo (Rascio et al. 1993) para plantas submetidas a quantidades tóxicas de níquel que, em níveis elevados, interfere na absorção de ferro inibindo o seu metabolismo (Agarwala et al., 1977) e diminui a concentração de clorofila em folhas de café (Pavan & Bingham, 1982). Em ambas as espécies puderam ser notadas diferenças na estrutura dos cloroplastos. Apesar de terem sido observados efeitos mais drásticos no desenvolvimento das folhas de rabanete em relação ao milho, em nível ultraestrutural os cloroplastos mais afetados em seu sistema interno de membranas foram aqueles presentes nas células do mesófilo das folhas do milho. Esses dados estão de acordo com os apresentados por Ouzounidou et al. (1997) em folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) mostrando que o cádmio tem um efeito mais danoso nos cloroplastos do mesófilo. Isto sugere ainda que nas monocotiledôneas, durante a translocação, os metais atravessam as células da bainha vascular e têm destino final nas demais células parenquimáticas que formam o mesófilo das folhas.

No caso do rabanete, apenas um maior acúmulo de amido nos cloroplastos diferenciou o efeito do cádmio em relação aos demais metais e ao material controle. Isto pode sugerir que ocorre alteração na translocação dos açúcares produzidos na fotossíntese quando da presença de Cd na célula e isto poderia ser decorrente de alterações na osmolaridade citoplasmática decorrente da produção de fitoquelatinas para complexarem e seqüestarem o metal para o vacúolo. Fitoquelatinas ocorrem como resposta à presença de metais pesados e a sua síntese e presença no citoplasma, a partir de glutatona, origina

grande quantidade de moléculas tiólicas de pequeno peso molecular (Xiang et al., 2001), capazes de quelar esses metais (Rauser, 1995).

De maneira geral os efeitos apresentados foram diferenciados entre as duas espécies e os três metais utilizados. Os efeitos provocados pelo Cd, de modo geral, foram mais intensos que os efeitos dos demais metais. No entanto, todos causaram alterações na estrutura, ultraestrutura e no crescimento de ambas as espécies. Verificou-se, portanto, que a concentração de 1 mM para ambos os metais foram altamente tóxicas para essas plantas, principalmente para o rabanete. Além disso, as diferenças marcantes observadas entre o comportamento apresentado pela mono e pela dicotiledônea, muitas delas observadas em outras plantas já estudadas por outros autores, sugerem que haja semelhança de comportamento na resposta entre espécies dessas duas classes das angiospermas.

Agradecimentos

Este estudo fez parte da Tese de Doutorado de J.F.Souza, do Programa de Biologia Vegetal da Unicamp, e teve financiamento parcial da CAPES e CNPq.

Referências

- Agarwala S C, Bisht S S and Sharma C P 1977 Relative Effectiveness of certain heavy metals in producing toxicity and iron deficiency in barley. *Can. J. Bot.* 55, 1299-1307.
- Barcelò J and Poschenrieder C 1990 Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J.Plant Nutr.* 13, 1-27.

- Barcelò J, Vázquez M D and Poschenrieder C 1988 Structural and ultrastructural disorders in cadmium treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris*). New Phytol. 108, 37-49.
- Begnami C N and Cortelazzo A L 1996 Cellular alterations during accelerated aging of French bean seeds. Seed Sci & Technol, 24: 295-303.
- Berrow M L and Burridge J C 1990 Persistence of metal residues in sewage sludge treated soils over seventeen years. J. Environ. Anal. Chem. 39, 173-177.
- Chaney R L 1993 Zinc Phytotoxicity. In: Zinc in soil and plants. A. D. Robson, ed. Developments in Plant and Soil Sciences 55, 135-150.
- Chardonens A N, Ten Bookum W M, Kuijper L D J, Verkleij J A C and Ernst W H O 1998 Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. Physiol. Plant. 104, 75-80.
- Clemens S 2001 Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta. 212, 475-486.
- Cortelazzo A L 1992 Starch detection and dosage in *Canavalia ensiformis* and *C. gladiata* cotyledons, during the plantlet development. Rev. brasil. Bot. 15, 157-162.
- Cortelazzo A L and Vidal B C 1991 Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. Revta. brasil. Bot. 14, 27-33.
- Helal H M, Haques S A, Romaddan A B and Schnug E 1996 Salinity-heavy metal interaction as evaluated by soil extraction and plant analysis. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 27, 1355-1361.
- Karnovsky M J 1965 A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27, 137A.

- Marchiol L, Leita L, Martin M, Peressotti A and Zerbi G 1996 Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. J. Environ. Qual. 25, 562-566.
- Ouzounidou G, Moustakas M and Eleftheriou E P 1997 Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 154-160.
- Pavan M A and Bingham F T 1982 Toxidez de metais em plantas.II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. Pesq. Agropec.Brasil. 17, 323-328.
- Rascio N, Dallavecchio F, Ferretti M, Mello L and Ghisi R 1993 Some effects of cadmium on maize plants. Arch. Environ. Cont. Toxicol. 25, 244-249.
- Rauser W E 1995 Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. Plant Physiol. 109, 1141-1149.
- Rauser W E and Meuwly P 1995 Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. Plant Physiol. 109, 185-202.
- Sanità di Toppi L and Gabbriellini R 1999 Response to cadmium in higher plants. Environ. Exp.Bot. 41, 105-130.
- Souza J F and Rauser W E 2003 Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways. Plant Sci. (in press).
- Souza J F 2003 Ph.D.Thesis, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. 100 p.
- Vassilev A, Berova M and Zlatev Z 1998 Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. Biol. Plant. 41, 601-606.

- Vassilev A, Lindon F C, Matos M C, Ramalho J C and Yordanov I 2002 Photosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium- and copper-treated barley plants. *J. Plant Nutr.* 25, 2343-2360.
- Xiang C, Werner B, Christensen E M and Oliver D J 2001 The biological functions of glutathione revised in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* 126, 564-574.
-

Tabela 1. Comprimento médio (mm) de raízes e partes aéreas de plântulas de rabanete e de milho tratadas com soluções com 1 mM de cádmio, zinco ou níquel, após 8 dias de germinação

Plântulas	Controle	Zn	Ni	Cd
Raiz de milho	151 a	143 a	112 b	61 c
Parte aérea de milho	129 a	130 a	132 a	112 b
Raiz de rabanete	94 a	5 b	6 b	3 b
Parte aérea de rabanete	82 a	21 b	4 c	3 c

Números seguidos de letras iguais em uma mesma linha não diferem significativamente com $P = 0,05$ (Tukey)

Legendas das figuras

Figura 1. Microscopia de luz de folhas de rabanete (A-L) e de milho (M-P). A-D: regiões adaxiais das folhas; E-H: regiões abaxiais das folhas de rabanete submetidas à reação de PAS. I-L - material corado pelo xylidine ponceau. M-P: material corado pelo azul de toluidina. A, E, I, M: controle; B, F, J, N: Zn 1mM; C, G, K, O: Cd 1 mM; D, H, L, P: Ni 1 mM. Barra: A-H = 100 μ m; I-P: 50 μ m.

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de folha de rabanete. Controle (A-B), tratamento com Zn (C) e Cd (D-E). Note a presença de grânulos de amido nos cloroplastos em D e E e pouca quantidade de grana nos cloroplastos. Barra = 2,5 μ m.

Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de folha de milho. Controle (A-B), tratatamento com Zn (C-D) e Cd (E-F). Mesofilo (M) e bainha vascular (V). Note a grande quantidade de cloroplastos com *granum* bem desenvolvido (M) e o grande efeito do cádmio nos cloroplastos desse tipo de células. Barra: A, C, E, F = 2,5 μ m; B = 1,7 μ m; D = 2 μ m.

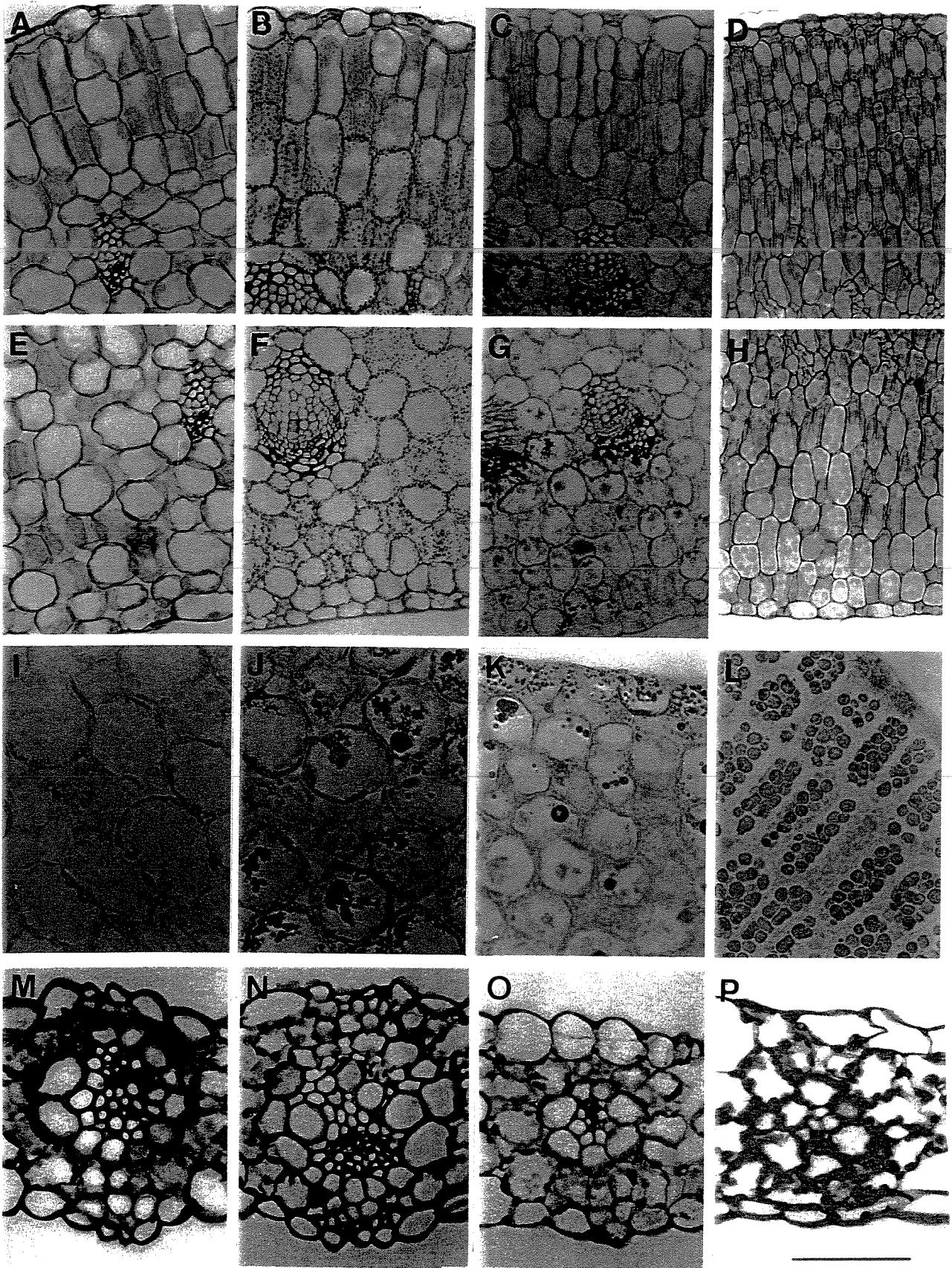


Figura 1

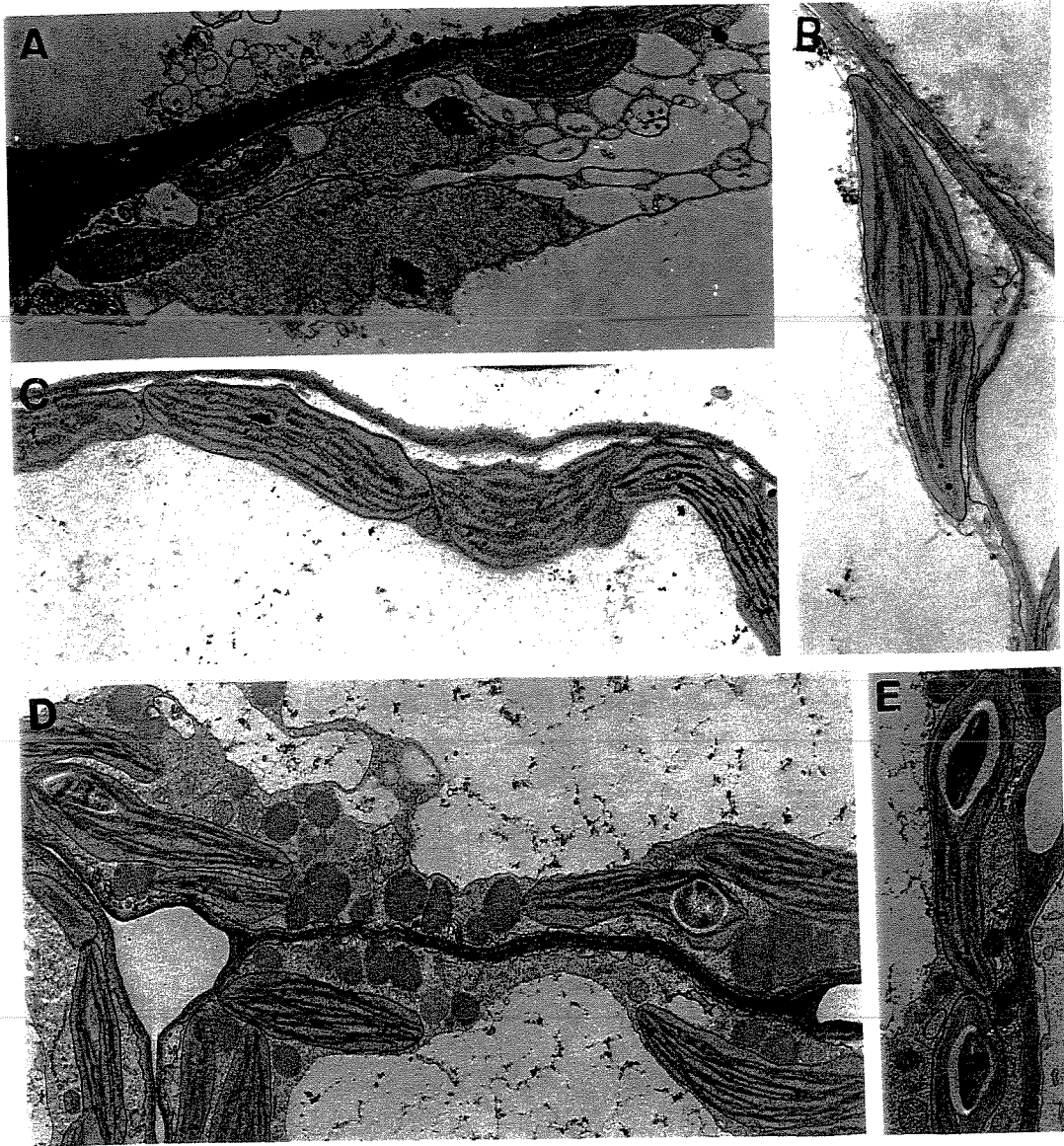


Figura 2

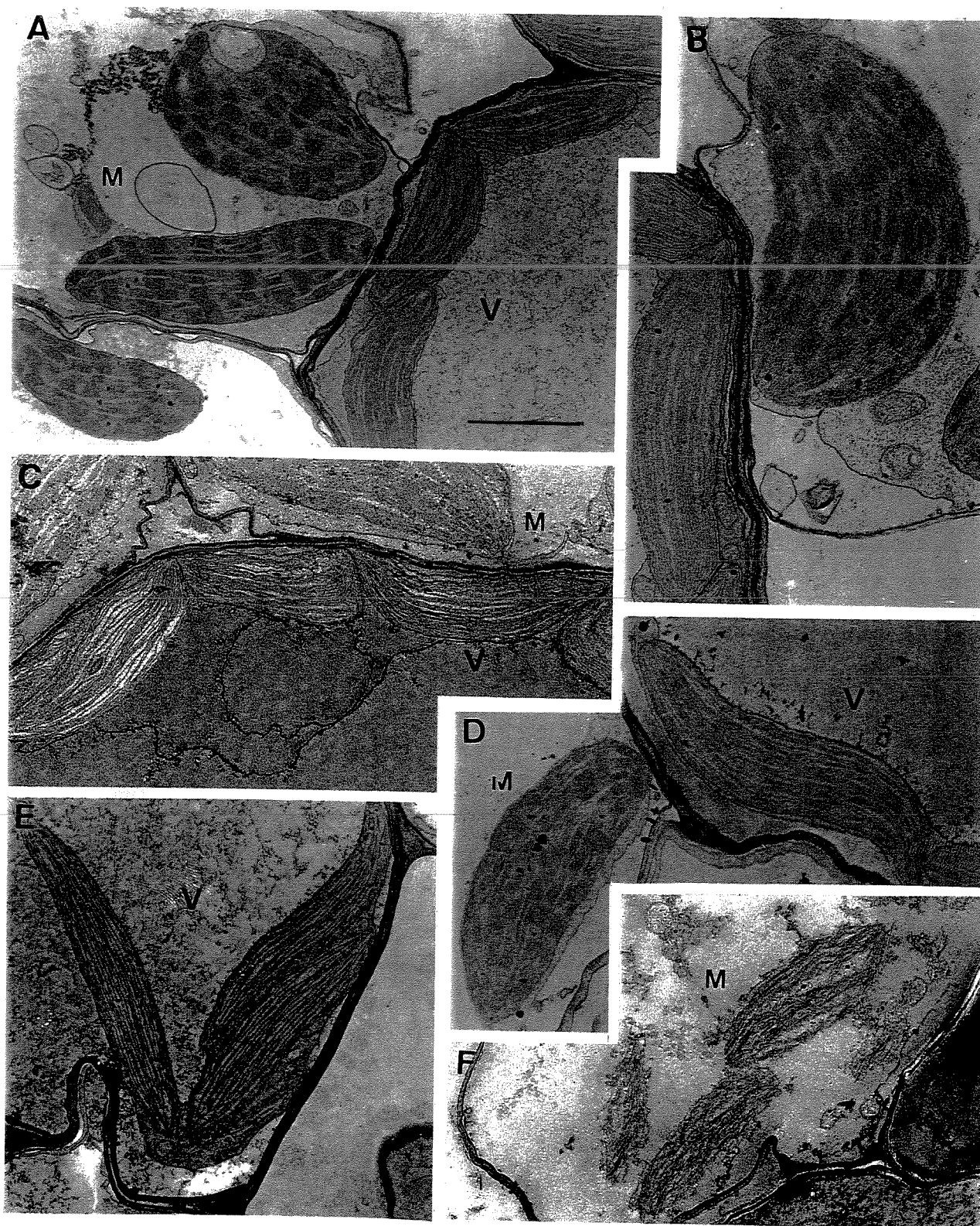


Figura 3

Capítulo 7

Considerações Finais

e

Conclusões

Considerações Finais

A fim de possibilitar um entendimento mais generalizado dos principais resultados obtidos no presente trabalho, eles foram subdivididos em dois grandes grupos: o primeiro está associado aos aspectos bioquímicos e que levaram em conta a extração, localização e indução de fitoquelatinas; o segundo, está mais associado aos aspectos morfológicos e que envolveram as análises estruturais e ultraestruturais realizadas.

Extração, localização e indução de fitoquelatinas

Milho e rabanete têm comportamento diferente quando submetidos a tratamento com soluções 1 μM de Cd, 50 μM de Zn ou 1 μM de Cd+50 μM de Zn. Rabanete é mais sensível a esses tratamentos quando comparado ao milho.

A extratibilidade de Cd e Zn difere entre raiz e parte aérea de rabanete e milho. Cd é mais solúvel em tampão Hepes que o Zn, principalmente em raiz de milho. O Zn é mais solúvel nesse tampão na parte aérea destas plantas.

Em plantas tratadas com Cd+Zn, a quantidade de Cd diminuiu, principalmente em rabanete, portanto o Zn foi capaz de diminuir a absorção de Cd nestas plantas. No entanto, o Cd não causou alteração na quantidade de Zn absorvido.

Os complexos do tipo fitoquelatinas de alto peso molecular ocorrem com Cd em rabanete e milho, com Zn ocorre em milho, mas não em rabanete. A maioria do Cd retido na raiz, tanto de milho como de rabanete, está ligado à região II (corresponde ao complexo de fitoquelatina de alto peso molecular), contendo glicil (fitoquelatina), desglicil e glutamil, mas em rabanete a quantidade de desglicil e glutamil foi bem menor que em milho. Zn se liga à região III (também correspondente ao complexo de fitoquelatina de alto peso molecular), que contém pouco ou nenhum peptídeo γEC tanto em milho como em rabanete. Ambas as regiões correspondem ao vacúolo. Na parte aérea, tanto Cd como Zn, estão ligados à região I, mas em rabanete a maioria do Cd se liga à região I enquanto que o Zn se liga à região III.

Na parte aérea de milho foram encontrados três picos de peptídeos não identificados: M1, M2 e M3; na parte aérea de rabanete quatro picos não foram

identificados: R1, R2, R3 e R4; finalmente, nas raízes de rabanete, outros três picos não puderam ser identificados: R1, R2 e R3.

A exposição ao Cd causou um forte aparecimento de peptídeos γ EC, predominando a isoforma n=2, enquanto o aparecimento dessa isoforma no tratamento com Zn foi muito menor. Estes peptídeos também estão presentes em raízes tratadas com Cd+Zn, mas em parte aérea apenas foram encontrados traços dos mesmos.

O peso de raiz e da parte aérea de plântulas de rabanete expostas a 1 μ M de Cd ou 50 μ M de Zn não foi significativamente diferente do controle. Entretanto, Cd+Zn diminuíram significativamente o peso seco de raiz. Nenhum destes tratamentos afetou o peso seco em plântulas de milho.

Cádmio mostrou ser melhor indutor de peptídeos na forma de fitoquelatinas que Zn. As concentrações dos monotióis cisteína, γ EC e γ ECE foram aumentadas em relação ao controle em raízes de rabanete tratadas com Cd, Zn e Cd+Zn. As concentrações de glutathione foram diminuídas pelo excesso de Cd na parte aérea e na raiz, e pelo excesso de Zn na parte aérea, enquanto que em raiz foram aumentadas. O excesso de Cd e de Zn aumentou as concentrações de fitoquelatinas e tióis mais nas raízes do que nas partes aéreas. Cd foi mais eficiente que Zn na formação dos tritíois, particularmente em raízes. No tratamento Cd+Zn as concentrações de di e tritíois aumentaram em raízes.

São mais abundantes os complexos de Cd com fitoquelatinas e, em termos de localização, são encontrados mais em raízes do que em folhas. Essa complexação é menor ou inexistente quando se considera o Zn, tanto para rabanete quanto para o milho.

O Cd está compartimentalizado no vacúolo complexado por fitoquelatinas e é mais solúvel em tampão que o Zn, tanto em rabanete como em milho. Os resultados sugerem que outros ligantes diferentes de fitoquelatinas estejam envolvidos na complexação do zinco, embora pareça que ele também esteja compartimentalizado no vacúolo.

Alterações estruturais e ultraestruturais

A concentração utilizada, de 1 mM de Cd, Zn e Ni, foi altamente tóxica e essa toxicidade se manifestou mais acentuadamente em rabanete que em milho.

Plântulas de rabanete e milho apresentaram uma diminuição do crescimento quando tratadas com 1 mM de Cd ou Ni. No entanto, Zn afetou apenas o crescimento de rabanete.

De modo geral, o efeito dos metais usados foi mais drástico em raízes do que nas partes aéreas. No caso do milho, apenas o tratamento com cádmio alterou significativamente o desenvolvimento das folhas. Esse efeito pode ser decorrente do fato de que a absorção se deu pelas raízes das plantas e, destas, houve a translocação para as folhas.

Folhas de rabanete tratadas com Zn apresentaram o parênquima esponjoso com células menores que o controle, enquanto que o parênquima paliçádico não apresentou mudanças no tamanho das células.

No tratamento com cádmio e níquel, as folhas apresentaram os dois parênquimas, esponjoso e paliçádico, com células menores em relação ao controle e são mais compactadas.

Folhas de rabanete apresentaram as células do parênquima compostas por um grande vacúolo e muitos cloroplastos deslocados por essa organela para a periferia das células, cujo conteúdo não se apresenta muito reativo a qualquer dos métodos de coloração utilizados. Entretanto, o tratamento com Zn afetou a reatividade das células ao método do PAS, com grande quantidade de grânulos corados em todo o parênquima. Além disso, a coloração pelo XP apresentou material intensamente corado para todas as células submetidas a tratamento com qualquer dos metais.

O Zn causou mudança na forma dos cloroplastos e também na organização dos tilacóides. No entanto, essas mudanças foram menos drásticas quando comparadas com as provocadas pelo Cd.

O Cd provocou uma mudança na forma e na aparência ondulante dos tilacóides do grana e do estroma causando um aumento dos espaços intratilacóides.

Em milho, houve uma maior alteração nas células do mesófilo, se comparadas às da bainha vascular do parênquima foliar. Esse efeito é mais nítido para o cádmio, que afetou significativamente essas estruturas, deixando totalmente destruídos os cloroplastos das células do mesófilo e praticamente inalterados aqueles presentes nas células da bainha vascular. Isso sugere que os metais que são translocados das raízes para as folhas, passam através das células da bainha, mas se acumulam naquelas do mesófilo.

Conclusões

1. O cádmio e o zinco induzem a produção de fitoquelatinas tanto em milho quanto em rabanete. O Cd é mais eficiente nessa indução e é acumulado no vacúolo, formando complexos de alto peso molecular. Em termos de estocagem, ela é feita em maior grau na raiz do que na parte aérea de ambas as plantas.
2. Quando utilizada a combinação Zn+Cd, o primeiro diminui a absorção do segundo. Entretanto, Cd não afeta a absorção de Zn pelas plantas estudadas. Há influência da adição de Zn para a obtenção dos complexos de Cd com fitoquelatinas.
3. As alterações morfológicas provocadas pelo Cd, Zn e Ni, de maneira geral, foram diferenciadas. As menores alterações foram notadas para plantas tratadas pelo Zn e as maiores, pelo Cd e Ni.
4. O efeito de todos os metais pode ser visualizado na superfície das folhas, principalmente com alterações nas células guarda dos estômatos. Em termos intracelulares, o cloroplasto é a organela que mais sofre alterações após os tratamentos para todos os metais estudados.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

- Abrahamson, S.L.; Speiser, D.M. and Ow. D.W. 1992. A gel electrophoresis for phytochelatin. **Annal. Biochem.** 200:239-243.
- Adriano, D.C. 1996. Trace element in the terrestrial environment. Springer-Verlag, New York. pp. 533
- Agarwala, S.C., Bisht, S.S. and Sharma, C.P. 1977. Relative Effectiveness of certain heavy metals in producing toxicity and iron deficiency in barley. **Can. J. Bot.** 55:1299-1307.
- Allaway, B.J. 1990. Cadmium. In Alloway BJ(ed) Heavy metals in soils. Blackie and Sons Ltd, UK. p.100-124.
- Alloway, B.J. 1995. Cadmium heavy metals in soil. 2nd ed. B.J. Alloway, ed (London: Chapman and Hall), pp. 122-151.
- Anelli, G.; Pelosi, P. and Galoppini, C. 1973. Influence of mercury on the amino acidic composition of tobacco leaves. **Agric. Biol. Chem.** 37:1579-1582.
- Baker, A. J. M. 1987. Metal tolerance. **New Phytol.** 106: 93-101.
- Barceló, J. and Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **J.Plant Nutr.** 13: 1-27.
- Bazzaz, F.A., Caelson, R.W. and Rolfe, G.L. 1974. The effects of heavy metals on plants. Part I. Inhibition of gas exchange of sunflower by Rb, Cd, Ni and Tl. **Environ. Poll.** 7:241-246.
- Bradshaw, A.D. 1952. Populations of *Agrostis tenuis* resistant to lead and zinc poisoning. **Nature** 169:1098.
- Brito Filho, D. 1988. Toxicologia humana e geral 2.ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 678p.
- Brooks, R. R. 1998. Phytochemistry of hiperaccumulators. In: Plants that hyperaccumulate heavy metals. (RR Brooks ed.). Wellingford. CAB International, pp 15-53.
- Brune, A., Urbach, W. and Dietz, K-J. 1994. Compartmentalization and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. **Plant Cell Environ.** 17:153-162.
- Cardoso, P.F., Molina, S.M.G., Pereira, G.J.G., Vitória, A.P. and Azevedo, R.A. 2002. Responses of rice inbred lines to cadmium exposure. **J. Plant Nutr.** 25:927-944.
- Carrol, R.E. 1996. The relationship of cadmium in air to cardiovascular disease death rates. **J. Amer. Med. Ass.**, 198: 267-269.

- Cassaret, A. and Doull's, D. 1986. Toxicol: the basic science of poisons. 5.ed. USA: McMillan Publishing. p. 1111
- Cataldo, D.A.; Garland, T.R. and Wildung, R.E. 1983. Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. **Plant Physiol.** 73:844-848.
- Chaney, R.L. 1993. Zinc Phytotoxicity. In: Zinc in soil and plants. A. D. Robson, ed. Developments in Plant and Soil Sciences. 55:135-150.
- Clarkson, D.T. and Lüttge, U. 1989 – Mineral nutrition. Divalent cations, transport and compartmentalizations. **Progr. Bot.** 51:93-112.
- Cobbett, C and Goldsbrough, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annu. Rev. Plant Biol.** 53: 159-182.
- Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiol.** 123:825-832.
- Cohen, C.K., Fox, T.C., Garvin, D.F. and Kochian, L.V. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. **Plant Physiol.** 116:1063-1072.
- Costa, G.; Michaut, U.C. and Guckert, A. 1997. Amino acids exuded from axenic roots of lettuce and white lupin seedlings exposed to different cadmium concentrations. **J.Plant Nutr.** 20:283-900.
- Crooke, W. M. 1958. Effect of heavy metal toxicity on the cation exchange capacity on plant roots. **Soil Sci.** 86: 231-241.
- Davies, B.E. 1980. Applied soil trace elements. J. Willey & Sons, New York. p.482.
- De Agazio, M. and Zacchini, M. 2001. Dimethylthiourea, a hydrogen peroxide trap, partially prevents stress effects and ascorbate peroxidase increase in spermidine-treated maize roots. **Plant Cell Environ.** 24: 237-244.
- De Knecht, J.A.; von Baren, N.; Ten Brokun, W.T.; Wong Fong Sang, H.W.; Koevoets, T.L.M.; Shat, H. and Verkleij, J.A.C. 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. **Plant Sci.** 106:9-18.
- De Vos, C.H.R., Vooijs, R., Schat, H. and Ernest, W.H.O. 1989. Copper-induced to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. **J.Plant Physiol.** 135:165-169.

- Desi, I., Nagymajtenil, L. and Schulz, H. 1998. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. **J.Appl.Toxicol.** 18:63-70.
- Désy, J.C., Amyot, M., Pinel-Alloul, B. and Campbell, P.G.C. 2002. Relating cadmium concentrations in three macrophyte-associated freshwater invertebrates to those in macrophytes, water and sediments. **Environm. Pollution** 120(3):759-769.
- Dixon, N. E.; Gazzola, C.; Blakeley, R. L. and Zerner, R. 1975. Jack bean urease. A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. **J. Am. Chem. Soc.** 97(14):4131-4133.
- Dudka, S. and Adriano, D.C. 1997. Environmental impacts of metal ore mining and processing: A review. **J.Envirn.Qual.** 26:590-602.
- Duvigneaud, P. (1958) – Lavégétation du Katanga et de ses sol metallifères. **Bull. Soc. R. Bot. Belg.** 90:127-286.
- Egreja Filho, F.B. 1993. Avaliação da ocorrência e distribuição dos metais pesados na compostagem do lixo domiciliar urbano. Dissertação de mestrado em agronomia/agroquímica. Universidade federal de Viçosa. 176p.
- Ermiler, U.; Grabarse, W. Shima, S.; Goubeaud, M. and Thauer, R.K. 1997. Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. **Science.** 278:1457-1462.
- Ernest, W.H.O. 1975. Physiology of heavy metal resistance in plants. **Int. Conf. Heavy Metal in the Environment, Toronto.** 1975. pp.121-136.
- Farago, M.E. and Cole, M.M. 1988. Nickel and Plants. **In.** Sigel H., Sigel A (eds) Nickel, its role in biology, New York pp 47-90.
- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitória, A.P., Lea, P.J. and Azevedo, R.A. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **J.Plant Nutr.** 25:327-342.
- Flowers, T.J.; Troke, P.F. and Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 28:89-121.
- Foulkes, E.C. 1990. The concept of critical levels of toxic heavy metals in target tissues. **Crit. Ver. Toxicol.,** 20: 327-337.

- Garate, A., Ramos, I., Manzanares, M and Lucena, J.J. 1993. Cadmium uptake and distribution in three cultivars of *Lactuca* sp. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 50:709-716.
- Granick, S. 1951. Biosynthesis of chlorophyll and related pigments. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 2:115-144.
- Greger, M., Johansson, M., Stihl, A. and Hamza, K. 1993. Foliar uptake of Cd by pea (*Pisum sativum*) and sugar beet (*Beta vulgaris*). **Physiol. Plant.** 88:563-570.
- Gries, G.E. and Wagner, G.J. 1998. Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. **Planta** 204:390-396.
- Grill, E., Winnacker, E.L. and Zenk, M.H. 1987. Phytochelatins a class of heavy metal binding proteins from plants are functionally analogous to metallothioneins. **Proc. Nac. Acad. Sci. USA.** 84:439-443.
- Grill, E., Vinnacker, E-L. and Zenk, M.H. (1985) - Phytochelatins: The principal heavy metal complexing peptides of higher plants. **Science.** 230:274-676.
- Grossi, M.G.L. 1993. Avaliação da qualidade dos produtos obtidos de usinas de compostagem brasileiras de lixo doméstico através de determinação de metais pesados e substâncias orgânicas tóxicas. Tese de Doutorado. São Paulo: USP, 222p.
- Guerinot, M.L. 2000. The ZIP family of metal transporters. **Biochim. Biophys. Acta.** 1465:190-198.
- Haag-Kerwer, A., Schäfer, H.J., Heiss, S., Walter, C. and Rausch, T. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. **J. Exp. Bot.** 341, 1827-1835.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanism of heavy metal detoxification and tolerance. **J.Exp.Bot.** 53:1-11.
- Hallenback, W.H. 1984. Human health effects of exposure to cadmium. (Cadmium - a complex environmental problem. Part II). **Experientia**, 40:136-142.
- Hare, P.D. and Cress, W.A. 1997. Metabolism implications of stress-induced praline accumulation in plants. **Plant Growth Regul.** 21:79-102.
- Heiss, S., Schäfer, H.J., Hag-Kerwer, A. and Rausch, T. 1999. Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially effects the expression of a

- putative low-affinity sulfate transport and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. **Plant Mol. Biol.** 39:847-857.
- Helal, H.M.; Haques, S.A.; Romaddan, A.B and Schnug, E. 1996. Salinity-heavy metal interaction as evaluated by soil extraction and plant analysis. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.** 27:1355-1361.
- Hellstrom, L., Elinder, C.G., Dahlberg, B., Lundberg, M., Jarup, L., Persson, B. and Axelson, O. 2001. Cadmium exposure and end-stage renal disease. **Am. J. Kidney Dis.** 38:1001-1008.
- Hu, S., Lau, K.W.K. and Wu, M. 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Sci.** 161:987-996.
- Inouhe, M.; Ninomiya, S.; Tohoyama, H.; Joho, M. and Murayana, T. 1994. Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono-and dicotyledonous plants. **J.Plant Res.** 107:201-207.
- Jabri, E.; Carr, M.B.; Hausiger, R.P.; and Karplus, P.A. 1995. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science** 268:998-1004.
- Jarvis, S.C., Jones, H.P. and Hopper, M.J. 1976. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. **Plant Soil.** 44:179-191.
- Kägi, J.H.R. 1991. Overview of metallothionein. **Methods Enzymol.** 205:613-625.
- Kahle, H. 1993. Response of roots of trees to heavy metals. **Environ. Exp. Bot.** 33:99-119.
- Kaplan, D., Heimer, Y.M., Abeliovich, A. and Goldsbrough, P.B. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. **Plant Sci.** 109:129-137.
- Klucas, R.V., Hanus, F.J., Russell, S.A. and Evans, H.J. 1983. Nickel: a micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean seeds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80:2253-2257.
- Kneer, R. and Zink, M.H. 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. **Phytochemistry.** 31:2663-2667.
- K-Pendias, A. and Pendias, H. 1984. Trace elements in soils and plants. **CRC Press, Inc.** pp. 315.
- K-Pendias, A. and Pendias, H. 1992. trace elements in soils and plants. **CRC Press.** 7:131-142.

- Krotz, R.M.; Evangelou, P.B. and Wagner, G.J. 1989. Relationship between cadmium, Cd-binding peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. **Plant Physiol.** 91:780-187.
- Krupa, Z. and Baszynski, T. 1995. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus direct and indirect effects on light and dark reactions: a review. **Acta Physiol. Plant.** 17: 177-190.
- Küpper, H.; Küpper, F. and Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophyll using the example of water plants. **J. Exp. Bot.**, 47:259-266.
- Larison, J.R., Likens, G.E., Fitzpatrick, J.W. and Crock, J.G., 2000. Cadmium toxicity among wildlife in the Colorado Rocky Mountains. **Nature.** 406: 181-183.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Stephen, D.E. and Kochian, L.V. 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **J. Exp. Bot.** 51: 71-79.
- Lee, J.G., Ahner, B.A. and Morel, F.M.M. 1996. Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. **Environ. Sci. Technol.** 30:1814-1821.
- Lee, S.M. and Leustek, T. 1999. the effects of cadmium on sulphate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. **Plant Sci.** 141:201-207.
- Leopold, I., Gunther, D., Schmidt, J. and Neumann, D. 1999. Phytochelatin and heavy metal tolerance. **Phytochem.** 50:1323-1328.
- Lester, J.N. 1987. heavy metals in wastewater and sludge treatment processes. Florida. CRC Press. p.195.
- Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J-N. and Davies J.P. 2000. Pathway and regulation of sulphur metabolism revealed through molecular and genetic studies. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 51:141-165.
- Lichtenberger, O. and Neumann, D. 1997. Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology: examples using electron energy loss spectroscopy and X-ray microanalysis. **Eur. J. Cell Biol.** 73:378-386.
- Lidon, F.C. and henriques, F.S. 1993. Effect of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants. **J. Plant Nutr.** 16:1449-1464.
- Luna, C.M., Gonzalez, C.A. and Trippi, V.S. 1994. Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves. **Plant Cell Physiol.** 35:11-15.

- Malavolta, E. 1994. Adubação e seu impacto ambiental. São Paulo: Produquímica Indústria e Comércio Ltda. p.153.
- Marchiol, L., Leita, L., Martin, M., Peressotti, A. and Zerbi, G. 1996. Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. **J. Environ. Qual.** 25:562-566.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K. and Amrhein, N. 1993. An ATP-dependent glutathione-S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. **Nature.** 364:247-249.
- Mathews, P.J. 1984. Control of metal application rates from sewage sludge utilization in agriculture. **CRC Crit. Rev. Environ. Cont.** 14:199-250.
- Mathys, W. 1975. Enzymes of heavy-metal-resistant and non-resistant populations of *Silene cucubalus* and their implication with some heavy metals *in vitro* and *in vivo*. **Physiol. Plant.** 33:161-165.
- McCaull, L. 1971. Building a shorter life. **Environ.**, 13: 2-15/38-41.
- McGrath, S.P. and Smith, S. 1990. Chromium and nickel. In: Alloways, B.J. (Ed.) heavy metals in soils. Glasgow, Blackie. Pp. 125-150.
- Meuwly, P., Thibault, P., Schwan, A.L. and Rauser, W.E. 1995. Tree families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. **Plant J.** 7(3):391-400.
- Mishra, D. and Karr, M. 1974. Nickel in plant growth and metabolism. **Bot. Rev.** 40:395-452.
- Moore, J.N. and Ramamoorthy, S. 1984. Heavy metal in natural waters. New York: Springer-Verlag. 328p.
- Mutti, A. 1996. La valutazione del rischio: in confine ambiguo la tecnica e cultura della provenienza. **Méd Lav.** 87:173-175.
- Nieboer, E. and Richardson, D.H.S. 1980. The replacement of nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. **Environ. Pollut.** B1:3-26.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 51:730-750.
- Niethammer, A. 1931. The influence of heavy metal compounds on plant cells. **Protoplasma.** 12:554-558.

- Nishizono, H.; Kubota, K.; Suzuki, S. and Ishii, F. 1989. Accumulation of heavy in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. **Plant Cell Physiol.** 30:595-598.
- Norvel, W.A and Welch, R.M. 1993. Growth and nutrient uptake of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Herta): Studies using an N-(2-hydroxyethyl)ethylenedinitrilotriacetic acid-buffered nutrient solution technique. I. Zin ion requirements. **Plant Physiol.** 101:619-625.
- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. **Nature.** 333:134-139.
- Nussbaum, S., Schmutz, D. and Brunold, C. 1988. regulation of assimilatory sulphate reduction by cadmium in *Zea mays* L. **Plant Physiol.** 88:1407-1410.
- Nussbaum, S.; Schmutz D. and Brunold, C. 1998. Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium in *Zea mays* L. **Plant Physiol.** 88:1407-1410.
- Oga, S. 1996. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo. Atheneu. 515p.
- Page, A.L. and Bingham, F.T. 1973. Cadmium residues in the environment. **Res. Ver.,** 48: 1-44.
- Pavan, M. A.; Bingham, F. T. . 1982. Toxidez de metais em plantas.II. Caracterização da toxidez de níquel em cafeeiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 17(2):323-328.
- Pelosi, P. and Galoppine C. 1973. Sulla natura dei composti mercuri organici nelle foglie di tabacco. **Atti. Soc.Tosc.Nat.Mem.** 80:215-220.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Lethan, D.L.B., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97:4956-4960
- Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J. and azevedo, R.A. 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant Soil.** 239:123-132.
- Peterson, P.J. 1969. The distribution of zinc-65 in *Agrostis tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. tissues. **J.Exp.Bot.** 20:863-875.

- Polle, A. 2001. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. **Plant Physiol.** 126:445-462.
- Povinelli, J. 1987. Ação dos metais nos processos biológicos de tratamento de águas residuárias. São Carlos. Tese de Livre Docência em Engenharia/Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos. USP.
- Prat, S. 1934. Die Erbllichkeit der resistenz gegen kupfer. **Ber. Deutsch. Bot. Ges.** 52:65-67.
- Rascio, N., Dallavecchis, F., Ferretti, M., Mello, L. & Ghisi, R. 1993. Some effects of cadmium on maize plants. **Arc. Environ, Cont. Toxicol.** 25:244-249.
- Rausser W.E. and Meuwly, P. 1995. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. **Plant Physiol.** 109:185-202.
- Rausser, W.E. 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. **Plant Physiol.** 109:1141-1149.
- Rausser, W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants – the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell Biochem. Biophys.** 31:19-48.
- Rausser, W.E. 2000 Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two complexes. **J. Plant Physiol.** 156:545-551.
- Reily, C. 1997. Accumulation of copper by some Zambian plants. **Nature** 215:667-668.
- Rivetta, A.; Negrini, N. and Cocucci, M. 1997. Involvement of Ca^{2+} -calmodulin in Cd^{2+} toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. **Plant cell Environ.** 20:600-608.
- Rueggsegger, A. and Brunold, C. 1992. Effect of cadmium on γ -glutamyl-cysteine synthesis in maize seedlings. **Plant Physiol.** 99:428-433.
- Rüeggsegger, A., Schmutz, D. and Brunold, C. 1990. Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L. **Plant Physiol.** 99:428-423.
- Salim, R.; Al-Sabu, M.M.; Douleh, A.; Chenavier, L. and Hagemeyer, J. 1992. Effects of root and foliar treatments of carrot plants lead and cadmium on the growth, uptake

- and the distribution of uptake of metals in treated plants. **J. Environ. Sci. Health**, A27: 1739-1758.
- Salt, D.E. and Rauser, W.E. 1995. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. **Plant Physiol.** 107:1293-1301.
- Salt, D.E.; Smith, R.D. and Raskin, I. 1998. Phytoremediation. **Annu.Rev.Plant Physiol. Plan Mol.Biol.** 49:643-668.
- Salt, M.L. and Wagner, G.J. 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. **J.Biol.Chem.** 268:12297-12302.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M. Romero-Puertas, M.C. and Del Rio, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **J. Exp. Bot.** 52:2115-2126.
- Sanità di Toppi, L. and Gabbriellini, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. **Environ. Exp.Bot.** 41:105-130.
- Sauvé, S., Hendershot, W. and Allen, H.E. 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soil: Dependence on pH, total metal burden, and organic matter. **Environ. Sci. Technol.** 34(7):1125-1131.
- Schäfer, H.J., Haag-Keewer, A. and Rausch, T. 1998. cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L: evidence for Cd induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthetase isoform. **Plant Mol.Biol.** 37:87-97.
- Schoroeder, H.A. and Balassa, J.J. 1961 - Abnormal trace metals in man: cadmium. **J. Chronic. Dis.**, 14: 236-258.
- Schützendübel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **J. Exp. Bot.** 53:1351-1365.
- Schützendübel, A; Schwanz, P.; Teichmann, T. Gross, K.; Langenfeld-Heyser, R.; Godbold, D. and Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H₂O₂ content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. **Plant Physiol.** 127: 887-898.

- Shah, K. and Dudey, R.S. 1998. Effect of cadmium on praline accumulation and ribonuclease activities in rice seedlings : role of praline as a possible enzyme protectant. **Biol. Plant.** 40:121-130.
- Shat, H. and ten Bookum, W.M. 1992. Metal-specificity of metal tolerance syndromes in higher plants.
- Siedlecka, A. 1995. Some aspects of interations between heavy metals and plant mineral nutrients. **Acta Soc. Bot. Pol.** 64:265-272.
- Sirover, M.A. and Loeb, L. 1976. Infidelity of DNA synthesis "in vitro": screening for potential metal mutagens of carcinogens. **Science.** 94: 1434-1436.
- Speiser, D.M.; Abrahamson, S.L.; Brunuelos, G. and Ow. D.W. 1992. *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium-sulfide complex. **Plant Physiol.** 99:817-821.
- Speiser, D.M.; Ortiz, D.F.; Kreppel, L.; Scheel, G.; McDonald, G. and Ow, D.W. 1992. Purine biosynthetic genes are required for cadmium tolerance in *Schizosaccaromyces pombe*. **Mol. Cell Biol.** 12:5301-5310
- Steffens, J.C. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 41:553-575.
- Sunderman, J.F.W. 1989. Mechanisms of nickel carcinogenesis. **Scand. J. Work Environ. Health.** 15:1-12.
- Tavares, T.M. and Carvalho, F.M. 1992. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente. **Química Nova.** 15:147-153.
- Taylor, G.J. 1987. Exclusion of metals from the symplasm: a possible mechanism pf metal tolerance in higher plants. **J. Plant Nutr.** 10:1213-1222.
- Tukendorf, A. and Rauser, W.E. 1990. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Sci.** 70:155-166.
- Turunen, S. 1985. Absorption. In: GA Kerkut and LI Gilbert eds. *Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Phamacology.* Vol 4. Pergamon Press. Oxford.
- Vassilev, A., Berova, M. and Zlatev, Z. 1998. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. **Biol. Plant.** 41(4):601-606.
- Vassilev, A., Lindon, F.C., Matos, M.C., Ramalho, J.C. and Yordanov, I. 2002. Photosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium- and copper-treated barley plants. **J. Plant Nutr.** 25(11):2343-2360.

- Verma, D.P.S. 1999. Osmotic stress tolerance in plants: Role of praline and sulfur metabolisms. Eds Austins, TX: R.G. Landers. p. 153-168.
- Vögeli-Lange, R. and Wagner G.J. 1996. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. **Plant Sci.** 114:11-18.
- Vögeli-Lange, R. and Wagner, G.R. 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiol.** 92:1085-1093.
- Volbeda, A.; Charon, H-M.; Piras, C. Hatchikian, E.C.; Frey, M. and Fontecilla-Campos, J.C. 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. **Nature.** 373:580-587.
- Waalkes, M.P.; Coogan, T.T. And Barter, R.A. 1992. Toxicological principles of metals carcinogenesis with special emphasis on cadmium. **Crit. Ver. Toxicol.**, 22: 175-201.
- Wagner, G.H. (1993) – Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Adv. Agron.** 51:173-212.
- Walker, C.D.; Graham, R.D.; Madison, J.T.; Cary, E.E. and Welch, R.M. 1985. Effects of Ni deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Physiol.** 79: 474-479.
- Wang, H-L., He, J-Y., Ma, Y., Hong, R-Y. and wang, T-K. 1991. An ultrastructural study and changes in peroxidase isozyme patterns during callus induction from garlic sprout leaf. **Acta Agr. Bor.** 6: 74-80.
- Wang, J., Evangelou, B.P., Nielsen, M.T. and Wagner, G.J. 1992. Computer-stimulated evaluation of possible mechanisms for sequestering metal ion activity in plant vacuoles. II. Zinc. **Plant Physiol.** 99:621-626.
- Weckx, J. and Clijsters, H. 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of phaseolus vulgaris as a result of root assimilation of toxic amounts of copper. **Physiol. Plant.** 96:506-512.
- Wirén, N., Marschner, H. and Römheld, V. 1996. Roots of iron-efficient maize also absorb phytosiderophore-chelated zinc. **Plant Physiol.** 111:1119-1125.
- Woolhouse, H.M. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. **Encicl. Plant Physiol.** 12C:245-300.

- Xiang, C., Werner, B., Christensen, E.M. and Oliver, D.J. 2001. the biological functions of glutathione revised in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. **Plant Physiol.** 126:564-574.
- Yang, X.; Baligar, V.C.; Martens, D.C. And Clark, R.B. 1996a. Plant tolerance to nickel toxicity. II. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. **J. Plant Nutr.** 19: 265-279.
- Yang, X.; Boligar, V.C.; Martens, D.C. And Clark R.B. 1996b. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. **J. Plant Nutr.** 19(3&4): 643-656.
- Youn, H-D.; Kin, E-J.; Roe, J-H.; Hah, Y.C.; and Kang, S.O. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. **Biochem. J.** 318:889-896.
- Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. **Gene.** 179:21-30.
- Zikic, V., Stajn, A.S., Ognjanovic, B.I., Pavlovic, S.Z. and Saicic, Z.S. 1997. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (*Cyprinus carpio* L.) exposed to cadmium. **Physiol. Res.** 46:391-396.