



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Lucemberg Sales Faustino

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO *IN VITRO* E DA ANATOMIA
CAULINAR DE *Brassica rapa* L. MEDIANTE CONCENTRAÇÕES
DE CÁDMIO**

JOÃO PESSOA
2017

Lucemberg Sales Faustino

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO *IN VITRO* E DA ANATOMIA
CAULINAR DE *Brassica rapa* L. MEDIANTE CONCENTRAÇÕES
DE CÁDMIO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado à Disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso, do Curso Superior em
Bacharelado em Biotecnologia da Universidade
Federal da Paraíba – UFPB, como requisito
para obtenção do título de Biotecnologista.

**Orientador: Prof. Dr. Luciano Coutinho
Silva**

**Co-orientadora: Prof^a Dr^o Maria de Fátima
Agra**

JOÃO PESSOA/PB
2017

Catálogo na publicação
Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

F268a Faustino, Lucemberg Sales.
Análise do crescimento in vitro e da anatomia caulinar de Brassica
rapa L. mediante concentrações de Cádmio / Lucemberg Sales Faustino.
– João Pessoa, 2017.
53 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador(a): Prof^o. Dr^o. Luciano Coutinho Silva.
Co-orientador(a): Prof^a Dr^a. Maria de Fátima Agra.

1. Cádmio Cd. 2. Fitorremediação. 3. Metal pesado. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 546.48(043.2)

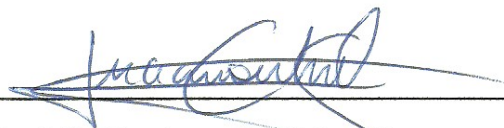
Lucemberg Sales Faustino

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO *IN VITRO* E DA ANATOMIA
CAULINAR DE *Brassica rapa* L. MEDIANTE CONCENTRAÇÕES
DE CÁDMIO**

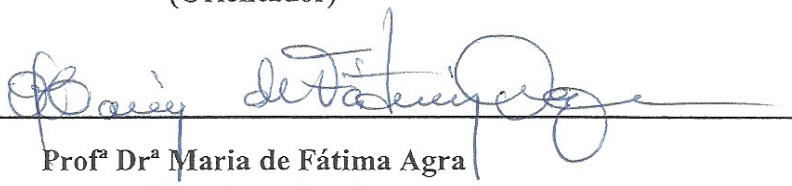
Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 30 de maio de 2017

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Luciano Coutinho-Silva
(Orientador)



Profª Drª Maria de Fátima Agra
(Co-orientadora)



Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Souza
(Examinadora)

“Faça por merecer.”

(O Resgate do Soldado Ryan)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luis e Geralda, por proporcionar todo incentivo, amor, carinho e assistência.

Aos meus avós, João e Maria, por serem um exemplo de perseverança, por confiarem em minha capacidade e por todo apoio.

A Ingridy Dayane, pelo apoio, carinho, auxílio e compreensão ao longo da graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva, pela orientação, pelos ensinamentos, paciência, confiança e pelo permanente apoio.

A minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Maria de Fátima Agra, pelas sugestões, pelo incentivo e apoio dando neste trabalho.

Aos meus amigos, que surgiram no decorrer do curso e que com certeza irão ficar presentes em minha vida, onde puderam compartilhar momentos de alegrias e sofrimentos, mas que sempre permaneceram ao meu lado apoiando e incentivando.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Taxonomia e Farmacobotânica (TAXFAR), Anauara Lima, Jayane Miranda, Rafael Costa, pelo companheirismo, apoio técnico e pessoal que foram fundamentais à realização deste trabalho.

As professoras Sandra, Fabíola e Tatjana, pela disponibilidade em ceder o espaço laboratorial para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Centro de Biotecnologia, que tiveram participação direta para minha formação profissional, pelo conhecimento, pela assistência e pelo estímulo.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Centro de Biotecnologia pela oportunidade concedida para realização da graduação.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protrusão das radículas de sementes de <i>Brassica rapa</i> na avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG). Barra: 1,5.....	24
Figura 2. Porcentagem de AGP e <i>Brassica rapa</i> após 20 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd.	25
Figura 3. Porcentagem de AGP de <i>Brassica rapa</i> após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd.	25
Figura 4. Porcentagem de CV de <i>Brassica rapa</i> após 5º dia de cultivo em meio MS em diferentes concentrações de Cd.	26
Figura 5. Germinação das sementes de <i>Brassica rapa</i> até o 5º dia de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd: controle (A), 5 ppm (B); 50 ppm (C) e 100 ppm (D). Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.	26
Figura 6. Porcentagem de CV de <i>Brassica rapa</i> após 20º dia de cultivo em meio MS em diferentes concentrações de Cd.	27
Figura 7. Porcentagem de CV de <i>Brassica rapa</i> após 40º dia de cultivo em meio MS em diferentes concentrações de Cd.	27
Figura 8. Porcentagem de HR de <i>Brassica rapa</i> após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd.	28
Figura 9. Hipocótilo reto da <i>Brassica rapa</i> após 40 dias de cultivo em meio MS: (A) Controle; (B) 50 ppm de Cd. Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.....	29
Figura 10. Porcentagem de plântulas de <i>Brassica rapa</i> até o 40º dia de cultivo em meio nas concentrações de Cd (0; 5; 50 e 100 ppm).....	30
Figura 11. Crescimento da <i>Brassica rapa</i> após 40 dias de cultivo em meio MS: controle (A); 5 ppm (B); 50 ppm (C) e 100 ppm de Cd (D). Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.	31
Figura 12. Número de folhas de <i>Brassica rapa</i> após 40 dias de cultivo em meio MS do controle e das concentrações de 5, 50 e 100 ppm de Cd.	32
Figura 13. Crescimento da <i>Brassica rapa</i> após 40 dias de cultivo em meio MS com a concentração de 5 ppm de Cd. Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.	32
Figura 14. Secção transversal da região entre o sistema radicular e do hipocótilo de <i>Brassica rapa</i> , submetidas às concentrações crescentes de Cd. Com evidência nas fotos, os tecidos epidérmicos, parenquimáticos e feixe vascular (xilema/floema). A: controle;	

B: concentração 5 ppm; C: concentração 50 ppm; D: concentração 100 ppm. Legendas:
Xl – Xilema; Fl – Floema. 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Cd	Cádmio
$\text{Cd}(\text{OH})^2$	Hidróxido de cádmio
$\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato de cádmio
pH	Potencial Hidrogeniônico
kg/cm^2	Força de quilograma por centímetro quadrado
Fe-EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético férrico
Na_2 EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acetato dissódico
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Micromol por metro quadrado por segundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Cádmio	15
2.2 Absorção do cádmio pelas plantas	15
2.3 Efeitos tóxicos do cádmio nas plantas	16
2.4 Fitorremediação	17
2.4.1 Estudos de fitorremediação <i>in vitro</i>	18
2.5 O Gênero <i>Brassica</i> (<i>Brassicaceae</i>)	18
2.6 Anatomia vegetal	19
3 OBJETIVO	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Material vegetal	20
4.2 Meio de cultura	20
4.3 Materiais, recipientes, volumes e esterilização dos meios de cultura	20
4.4 Preparo do meio de cultura	20
4.5 Assepsia dos explantes	21
4.6 Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG)	21
4.7 Análises de crescimento <i>in vitro</i>	22
4.8 Estudo anatômico	22
4.9 Análises estatísticas	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Índice de velocidade de germinação	23
5.2 Abertura do gancho plumular (AGP)	24

5.3 Cotilédone verde (CV)	26
5.4 Hipocótilo reto (HR)	28
5.5 Desenvolvimento da plântula	29
5.6 Formação de folhas	31
5.7 Anatomia	33
6 CONCLUSÕES	35
7 REFERÊNCIAS	35

RESUMO

A contaminação de solos e água com poluentes químicos representa grande problema ambiental com implicações para a saúde humana e animal. O cádmio (Cd) se apresenta como um elemento altamente tóxico e com isso, a fitorremediação surge como uma alternativa para amenizar esse problema. No presente trabalho realizou-se um estudo de crescimento *in vitro* e uma análise anatômica com *Brassica rapa*. O objetivo deste trabalho foi identificar possíveis danos fisiológicos e anatômicos que ocorrem nos órgãos da planta sob o estresse causado por Cd. Para isso, sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo durante 10 minutos. Após a assepsia, as sementes foram inoculadas em diferentes concentrações de Cd (5; 50 e 100 ppm), além do controle, e mantidas em estante de fotoperíodo de 16 h, com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria a $25 \pm 5^\circ\text{C}$ por 40 dias. Foram realizadas análises da germinação e índice de velocidade de germinação (IVG), número de plântulas, número de folhas, e as porcentagens dos seguintes parâmetros: abertura do gancho plumular (AGP), cotilédone verde (CV) e hipocótilo reto (HR). As análises foram feitas aos 5, 20 e 40 dias de cultivo. O material vegetal também foi fixado para análises anatômicas em microscópio óptico. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o software SISVAR[®]. Foram observados que nos seguintes parâmetros: AGP, CV e HR ocorreu uma interação significativa (concentrações de Cd x dias de avaliação). Os resultados mostraram um comportamento linear ou polinomial, ambos decrescentes, na medida em que se aumentava a concentração de Cd. Para o desenvolvimento da plântula e formação de folhas foram observadas o mesmo comportamento decrescente. Os estudos anatômicos caulinares evidenciaram que o Cd em concentrações elevadas causou alterações nas estruturas dos feixes vasculares, tanto no nível do xilema quanto do floema. Os resultados encontrados nesse estudo demonstraram que *Brassica rapa* possui potencial para ser utilizada como uma espécie fitorremediadora sob níveis moderados de Cd.

Palavras-chave: anatomia; cultura de tecidos; fitorremediação; metal pesado.

ABSTRACT

Contamination of soil and water with chemical pollutants represents a major environmental problem with implications for human and animal health. Cadmium (Cd) presents as a highly toxic element and with this, phytoremediation appears as an alternative to soften this problem. In the present work an *in vitro* growth study and an anatomical analysis with *Brassica rapa* were performed. The objective of this work was to identify possible physiological and histological damages that occur in the organs of the plant under stress caused by Cd. For this, seeds were disinfested in sodium hypochlorite with 2% active chlorine for 10 minutes. After the asepsis the seeds were inoculated at different concentrations of Cd (5, 50 and 100 ppm), in addition to the control, and kept in a 16-h photoperiod shelf with irradiance of $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ provided by white light Cold at $25 \pm 5^\circ\text{C}$ for 40 days. Germination and germination velocity index (IVG), number of seedlings, number of leaves, and percentages of the following parameters were analyzed: plumulate hook opening (AGP), green cotyledon (CV) and hypocotyl straight (HR). The analyzes were done at 5, 20 and 40 days of culture. Plant material was also fixed for anatomical analysis under an optical microscope. Data were submitted to analysis of variance using SISVAR[®] software. It was observed that in the following parameters: AGP, CV and HR there was a significant interaction (concentrations of Cd x days of evaluation). The results showed a linear or polynomial behavior, both decreasing, as the concentration of Cd was increased. For the development of the seedling and leaf formation the same decreasing behavior was observed. The cauline anatomical studies evidenced that the Cd in high concentrations caused alterations in the structures of the vascular bundles, at both the xylem and phloem levels. The results found in this study demonstrated that *Brassica rapa* has potential to be used as a phytoremediation species under moderate levels of Cd.

Key words: anatomy; tissue culture; phytoremediation; heavy metal.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação de solos e água com poluentes químicos representa grande problema ambiental com implicações para a saúde humana e animal (GAETKE; CHOW, 2003; GALLEGO et al., 2012), e a sua bioacumulação na cadeia alimentar pode ser altamente perigosa (GALLEGO et al., 2012). O método de fitorremediação é utilizado para auxiliar no tratamento de áreas onde são destinados resíduos sólidos urbanos, em um processo biotecnológico que consiste em utilizar plantas para a remediação de contaminantes presentes no solo e na água (CUNNINGHAM et al., 1996).

Os métodos *in situ* são os mais adequados, entretanto sua eficiência irá depender de algumas características do local estabelecido, concentração dos metais pesados a serem removidos, além do uso final do ambiente contaminado (CUNNINGHAM et al., 1996; SIQUEIRA et al., 1999). O tratamento de áreas contaminadas por metais pesados através de processos físico-químicos, além de apresentarem custos elevados, constantemente causa falhas indesejadas, como a necessidade de remoção de parte do solo (MULLIGAN et al., 2001). Por essa razão, o uso da fitorremediação, técnica baseada no uso de plantas capazes de absorver e acumular em seus tecidos metais pesados e outros compostos químicos do solo e da água, ganhou grande destaque em pesquisas durante as últimas décadas (MAINE et al., 2004; SKINNER et al., 2007).

O gênero *Brassica* possui aptidão para a fitorremediação. Já foi reportada a capacidade de *Brassica juncea*, *Brassica napus* e *Brassica rapa* (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000) possuírem uma potencialidade para remediar solos com altos teores de contaminantes, dentre eles, o cádmio (USEPA, 2000).

Dessa forma, a investigação do desenvolvimento das plantas em diferentes níveis de contaminação por metais se torna relevante. Neste trabalho foi avaliado diferentes níveis de concentrações de cádmio *in vitro*, utilizando-se *Brassica rapa* como modelo experimental, a fim de verificar a adaptação da planta a diferentes graus de contaminação e a possíveis danos celulares e teciduais, que podem ocorrer nos órgãos da planta sob o estresse causado por diferentes concentrações de metal pesado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cádmio

O solo tem sido habitualmente o coletor mais comum para resíduos contendo metais pesados (JADIA; FULEKAR, 2008). As atividades antropogênicas são as principais fontes de poluição de metais pesados em todo o mundo (ALI et al., 2013). Entre os metais pesados, o cádmio (Cd) é um elemento altamente tóxico. A contaminação por Cd na cadeia alimentar constitui a principal fonte contaminante do Cd para a população em geral, e é a principal restrição para a segurança alimentar e a qualidade da terra agrícola (ATAFAR et al., 2010).

O tempo de persistência desse elemento no solo excede milhares de anos (ALLOWAY, 1993). Além disso, o Cd é um metal pesado altamente tóxico para plantas, animais e para o homem. A contaminação por esse elemento se dá por meio do uso de solo contaminado para fins agrícolas, já que esse elemento tem uma facilidade de ser transferido da solução do solo para as plantas, entrando na cadeia alimentar (JARUP, 2003). O Cd em concentrações excessivas tem o potencial de causar diversos problemas à saúde, dentre os quais destacam-se: câncer, lesões ósseas, insuficiência pulmonar, efeitos teratogênicos, distúrbios renais, anemia, hipertensão e perda de peso (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007; GAD 2014).

Embora não seja um elemento essencial às plantas, os íons de Cd são prontamente absorvidos pelas raízes e translocados para a parte aérea, afetando o crescimento, processos fotossintéticos e a absorção de nutrientes (MISRHA; TRIPATHI, 2008). De uma forma geral, o efeito do Cd em plantas provoca o enrolamento e a clorose nas folhas e a redução no crescimento. Além disso, inibe a atividade de diversas enzimas, como a redutase do nitrato, provoca danos ao aparelho fotossintético e prejudica a fosforilação oxidativa mitocondrial (TOPPI; GABBRIELLI, 1999).

2.2 Absorção do cádmio pelas plantas

Dada à baixa concentração no solo e ao baixo grau de difusão do Cd, admite-se que o contato desse elemento com a raiz seja por fluxo de massa ou por interceptação radicular (LUX et al., 2011). A absorção do Cd pelas plantas é estabelecida pela

concentração desse elemento no solo e sua disponibilidade biológica. A biodisponibilidade do Cd é influenciada por vários fatores: presença de matéria orgânica, exsudatos radiculares, presença de micorrizas, potencial redox do solo, temperatura, concentração de outros elementos e, principalmente, do pH (PÁL et al., 2006).

O pH é o principal fator que governa a disponibilidade do Cd no solo, devido ao seu efeito na adsorção. Em geral, ocorre diminuição na solubilidade com o aumento do pH e pode haver a formação de substâncias hidroxiladas como o $\text{Cd}(\text{OH})_2$, $\text{Cd}(\text{OH})^+$ e compostos com fosfato $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$ (DIAS et al., 2001; MALAVOLTA, 2006).

O Cd pode chegar ao xilema pela via simplástica através do citoplasma de células individuais do córtex, ligadas por plasmodesmos ou pela via apoplástica, movimentando-se livremente sem nenhuma restrição pela interconexão das células da epiderme e do córtex, onde seguem para a parte aérea (LUX et al., 2011). Boa parte dos íons desse elemento que são absorvidos pelas plantas mantêm-se nas raízes e somente uma pequena quantidade é transportada para a parte aérea. Normalmente, a distribuição de Cd nos diferentes órgãos das plantas diminui na ordem a seguir: raiz, folhas, frutos, sementes (HASAN et al., 2009).

2.3 Efeitos tóxicos do cádmio nas plantas

O Cd, em altas concentrações provocam toxicidade para as plantas. Efeitos que podem ser causados por meio da competição com nutrientes minerais, impactando a nutrição mineral ou, após a absorção pela planta, esses metais se acumulam nos tecidos e compartimentos celulares, dificultando o metabolismo em geral (HASAN et al., 2009).

Devido à interação do Cd com enzimas e proteínas que contêm grupo sulfidríla, a contaminação por esse elemento causa a redução da atividade enzimática nos mais variados processos metabólicos, tais como na síntese de clorofila, fixação de CO_2 e no ciclo de Calvin (SEREGIN; IVANOV, 2001; GUIMARÃES et al., 2008; DELMAIL et al., 2011). Segundo Malavolta (2006), o Cd tende a se acumular nas raízes e pode-se citar alguns dos principais sintomas de toxicidade que acomete folhas com margens pardas, clorose, pecíolos e nervuras avermelhadas, enrolamento das folhas e raízes pardas.

No nível metabólico, a transdução de sinal induzida por Cd desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que incluem ânion superóxido (O_2^-),

radical hidroxilo (OH^\cdot) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) (SANDALIO et al., 2001, RANIERI et al., 2005; KHAN et al., 2007), o que pode resultar em danos à membrana e destruição de organelas celulares e biomoléculas (EKMEKC et al., 2008). Este dano oxidativo poderia ser responsável pela toxicidade de Cd (LIN et al., 2007; ARASIMOWICZ-JELONEK et al., 2011).

2.4 Fitorremediação

A grande diversidade de classes de poluentes que são depositadas no ambiente dificulta os processos de descontaminação de ecossistemas no geral. A fitorremediação fundamenta-se na utilização de plantas para a remoção desses contaminantes e é uma técnica que apresenta resultados significantes. É de baixo custo e ocasiona o mínimo de mudança ao solo quando comparado com outras técnicas (HENRY, 2000; GRATÃO et al., 2005).

Para o uso em elementos tóxicos, essa técnica requer a identificação de plantas hiperacumuladoras em que a concentração final presente em seus órgãos, seja, maior do que no meio contaminado, o que é possível devido às estratégias e mecanismos desenvolvidos contra a fitotoxicidade desses elementos (MIRETZKY et al., 2004; GRATÃO et al., 2005).

A fitorremediação pode ser executada por diferentes processos como degradação do poluente na própria planta ou na rizosfera, ou por mecanismos como o de fitoextração em que os poluentes são absorvidos e acumulados. Outros procedimentos como a fitoestabilização, que reduz a biodisponibilidade dos contaminantes, a fitovolatilização e a fitoestimulação também são consideradas respostas fitorremediadoras (SALT et al., 1998; PILON-SMITH, 2005).

Apesar de existir limitações, os efeitos favoráveis da técnica de fitorremediação a tornam um método alternativo, que propicia boas perspectivas. Porém, a escolha de plantas que apresentem maior potencial fitorremediador é de extrema importância (CUNNINGHAM et al., 1996). Algumas características são indicativas para a seleção de uma espécie, como: capacidade de absorção, acumulação e/ou metabolização e tolerância ao poluente. Além disso, é desejável que a planta apresente capacidade de desenvolver-se em ambientes diversificados, alta taxa de crescimento e produção de biomassa e facilidade na remoção da planta da área contaminada. Tais características são fundamentais às plantas para expressar seu máximo potencial de remediação (SALT et al., 1998; PIRES et al., 2003). Porém é oportuno destacar-se que dificilmente uma

espécie terá todos esses atributos reunidos, contudo deverá ser selecionada aquela que agrupar o maior número de qualidades possíveis (WOLFF et al., 2009).

2.4.1 Estudos de fitorremediação *in vitro*

A cultura *in vitro* tem papel imenso na propagação de plantas em grandes quantidades com caracteres desejados, como também tem sido usada como uma ferramenta para a conservação e propagação rápida de plantas raras e ameaçadas, de importância econômica. Este método permite a reprodução idêntica dos parentais selecionados, seguindo a manutenção da fidelidade genética (CHEN et al., 2002).

A técnica de cultivo de tecidos vegetais *in vitro* tem como objetivo estabelecer o crescimento de células e tecidos num ambiente artificial sem contaminação e favorecer a multiplicação de uma plântula. A cultura de tecidos vem sendo uma técnica amplamente utilizada como método biotecnológico para estudo de metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas, promovendo assim maior número de plantas em menor tempo, além de ser uma ferramenta conveniente para estudos de fitorremediação (CHAUDHRY et al., 2005; LEBEAU et al. Al., 2008).

2.5 O Gênero *Brassica* (*Brassicaceae*)

Brassicaceae Burnett é uma das maiores famílias de Angiospermas. Está inserida na ordem Brassicales, classe Magnoliopsida, filo Magnoliophyta. Esta família consiste cerca de 325 gêneros e 3.740 espécies, com distribuição geográfica ampla. Tem sua maioria de espécies encontradas principalmente em regiões temperadas (MARZOUK et al., 2010) e de clima seco dos Hemisférios Norte e Sul. No Brasil, o gênero está representado por duas espécies nativas: *Brassica juncea* (L.) Czern. e *Brassica napus* L. (SOUZA, 2015).

As espécies desta família possuem porte herbáceo, podendo existir alguns arbustos e trepadeiras. Surgem como anuais ou perenes, dependendo da espécie. A sua capacidade de dispersão e à sua capacidade de colonizar diversos ambientes, entre outros fatores, o que torna alguns membros desta família em plantas invasoras (BASU, S.; CETZAL-IX, W., 2014)

A aplicabilidade dessa capacidade extratora as brassicas estão sendo testadas para identificar metais pesados em substratos diversos, sendo candidatas à fitorremediação (HAN et al., 2004; PODAR et al., 2004; LINDBLOM et al., 2006). *B. napus* L. é um exemplo de espécie que acumula grandes quantidades de metais pesados

na raiz (MESTEK, 2007). *B. oleracea* L. var. *acephala* demonstrou ser acumuladora de selênio, também é apontando por apresentar grande quantidade de luteína e β -caroteno em seus tecidos, todos com propriedades antioxidantes (LEFSRUD et al., 2006).

2.6 Anatomia vegetal

Na anatomia vegetal, são estudadas as modificações que ocorrem nas estruturas interna das plantas em função de pressões ambientais, viabilizando a aclimação do organismo àquelas condições ou manifestar sensibilidade a tais situações. (GRISI et al., 2008; CASTRO; PEREIRA; COSTA et al., 2009; PAIVA, 2009).

As modificações na anatomia do hipocótilo das plantas podem envolver diferenças na espessura da epiderme, córtex, endoderme, exoderme, bem como no tamanho das células, na vascularização (formação de xilema e floema), no cilindro vascular e na proporção de aerênquimas (VASELLATI et al., 2001; PEREIRA et al., 2008; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Dessa forma, as respostas anatômicas do caule das plantas podem ilustrar características que permitam a adaptação a um determinado tipo de estresse ou, efeitos deletérios promovidos pelo estresse. Assim, pode-se utilizar essa ferramenta no monitoramento dos efeitos dos elementos tóxicos nas espécies em estudo.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar diferentes concentrações de cádmio *in vitro*, utilizando-se *Brassica rapa* como modelo experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer o cultivo *in vitro* de *B. rapa* sob diferentes concentrações de cádmio.
- Analisar a anatomia caulinar da *B. rapa* cultivada *in vitro* sob diferentes concentrações de cádmio com o respectivo controle.
- Identificar os possíveis danos fisiológicos e anatomicos que ocorrem nos órgãos da planta sob o estresse causado pelas concentrações do metal pesado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Multiusuário, do Departamento do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, durante a vigência 2016/2017.

4.1 Material vegetal

As sementes de *B. rapa* utilizadas nos experimentos foram obtidas a partir de plantas provenientes do município de Estiva, Minas Gerais.

4.2 Meio de cultura

Neste experimento, foram testados os meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) modificado, onde o nitrato de amônia e o de potássio foram substituídos pelo produto comercial Kristalon com as seguintes concentrações em porcentagem (15-5-30) dos elementos N, P e K.

4.3 Materiais, recipientes, volumes e esterilização dos meios de cultura

Foram utilizados frascos com capacidade de 250 ml, vedados com tampa de polipropileno. Utilizou-se 30 ml de meio de cultura/recipientes. O meio de cultura com ágar foi homogeneizado, por meio de um ebulidor por três vezes a uma temperatura de 100°C. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C (Autoclave Stermax digital 40 litros horizontal 220V) sobre pressão de 1,05 kg/cm², durante 15 minutos.

4.4 Preparo do meio de cultura

As soluções-estoque do meio MS aplicado ao experimento, apresentam concentrações em mg/L, 100 vezes maior que a concentração final do meio. As soluções ficaram armazenadas em frascos e em geladeira. Os estoques de macro nutrientes foram dissolvidos em 250 mL de água destilada. Em seguida, completou os respectivos volumes para 500 mL, sob agitação, e depois armazenadas em frascos na geladeira. O estoque de micronutrientes foi preparado dissolvendo-se cada um dos micronutrientes, um após o outro, em 250 mL de água destilada, completando o volume para 500 mL, seguido de agitação. O preparado foi colocado em frasco e armazenado em geladeira.

O estoque de Fe-EDTA foi preparado com a diluição de Na₂EDTA em 225 mL de água destilada morna. Após dissolução, manteve a agitação e adicionou lentamente o FeSO₄. Após dissolução, o volume foi completado para 500 mL sob agitação constante. A solução foi colocada em frasco âmbar e armazenada em geladeira.

Para o preparo do meio de cultura, primeiramente, foi definir a quantidade de meio a ser preparado, no caso deste trabalho a quantidade necessária de ágar foi de 7g L⁻¹ e de 30g L⁻¹ de sacarose. Colocou-se 40% do volume de água destilada em um recipiente apropriado ao volume final a ser preparado. Pipetou-se as soluções-estoques e dissolveu-se a sacarose. O pH foi ajustado com auxílio de micropipeta e soluções próprias, sempre sob agitação. O pH final foi ajustado em 5,8 através de pHmetro (Hanna, pH 21, pH/mv meter). Em outro recipiente, colocou-se o ágar e a outra metade do volume final (água) que foi dissolvido por meio de um ebulidor a 100°C, agitando-se de vez em quando. O ágar dissolvido foi juntado aos sais e distribuído nos frascos de cultivo antes da autoclavagem a 121 °C (Autoclave Stermax digital 40 litros horizontal 220V), por 20 minutos. Foram testadas quatro concentrações de cádmio: 0, 5, 50 e 100 ppm.

4.5 Assepsia dos explantes

As sementes foram, lavadas em água corrente e detergente comercial neutro por um período de 10 minutos. Em câmara de fluxo laminar (Filterflux modelo: SBLLA1-960/4) as sementes foram desinfestadas com 70% (v/v) de solução de álcool durante 30, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) comercial, com 2% de cloro ativo, na proporção de 50% (v/v) com água destilada por 10 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas três vezes em água destilada e autoclavada, inoculados nos diferentes tratamentos de Cd (0, 5, 50 e 100 ppm) e mantidos durante 40 dias em estante de fotoperíodo de 16 horas, irradiância de 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por luz branca fria e temperatura de 25±5°C. Ao fim deste período os explantes foram analisados.

4.6 Germinação e índice de velocidade de germinação (IVG)

O IVG é um índice calculado a partir dos dados de contagem de sementes germinadas e que tem por objetivo estabelecer as diferenças na velocidade de germinação de acessos, grupos ou lotes de sementes. O cálculo é o somatório do número de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos

entre a semeadura e a germinação (MAGUIRE, 1962). Nesse experimento foram avaliadas as sementes germinando até o 5º dia após a inoculação (Equação 1).

$$IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + (G_3/N_3) + \dots + (G_n/N_n), \text{ em que: (Eq. 1)}$$

IVG: índice de velocidade de germinação;

G1, G2, G3, ..., Gn: número de sementes germinadas computadas na primeira, segunda, terceira e última contagem;

N1, N2, N3, ..., Nn: número de dias da semeadura à primeira, segunda, terceira e última contagem.

Para o IVG, foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram protrusão radicular.

4.7 Análises de crescimento *in vitro*

O experimento foi conduzido com 20 frascos no total, com três concentrações de Cd (5; 50 e 100 ppm), mais o controle. Foram utilizados quatro frascos por tratamento, onde, cada frasco continha 15 sementes.

Os parâmetros abertura do gancho plumular (AGP) e cotilédone verde (CV) foram avaliados durante o 5º, 20º e 40º dia após a inoculação. O delineamento experimental casualizado adotado foi em um esquema fatorial (4 concentrações x 3 períodos de avaliações) com cinco repetições.

Para os parâmetros hipocótilo reto (HR), formação de plântula e número de folhas, as avaliações foram avaliadas no 40º dia após a inoculação. Para o HR, foi considerada a disposição linear do eixo hipocótilo; o parâmetro plântula foi considerado o desenvolvimento de sistema radicular e parte aérea; para o parâmetro número de folhas, a quantidade final deste órgão foi analisada.

4.8 Estudo anatômico

O material foi fixado em FAA, 50 % (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50 %) por 48 h e, posteriormente, conservado em álcool etílico 70º G.L. (JOHANSEN, 1940), para utilização nos estudos anatômicos.

Para as análises do caule em secções transversais, foram realizados cortes a mão livre, utilizando lâminas cortantes comerciais, para sua caracterização estrutural. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 2%, neutralizadas com ácido

acético a 0,2%, lavadas com água destilada e coradas com uma solução de azul de astra e safranina 1% (JOHANSEN, 1940). Posteriormente os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com gelatina glicerizada (50%) e observados ao microscópio óptico (Leica DM750, Switzerland) com sistema Qwin acoplado a uma câmara de vídeo (Leica ICC50 HD) para captura de imagens.

As secções transversais foram realizadas nas mesmas regiões para todas as concentrações. A região escolhida foi entre o início do sistema radicular e o hipocótilo, por apresentarem células que irão se especializar, ganhando uma função, e também por estarem presentes nas plântulas em todas as concentrações.

4.9 Análises estatísticas

Os dados originais foram transformados pela raiz quadrada do arcoseno de x e submetidos a análise de variância. As médias foram testadas, quando houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, utilizando o software SISVAR® (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Índice de velocidade de germinação

No IVG de *B. rapa* durante cinco dias iniciais, não foram observados nenhuma diferença significativa. Houve germinação das sementes, ocorrendo a protrusão radicular, em todos os tratamentos estudados. O valor médio observado para o IVG foi 9,4, variando entre o valor mínimo de 7,8 para a concentração de 50 ppm e o valor máximo de 10,8 para a concentração de 5 ppm de Cd. Isso indica que esse elemento não está afetando a germinação até 5º dia após a inoculação, conseqüentemente a *B. rapa* germina normalmente (Figura 1).

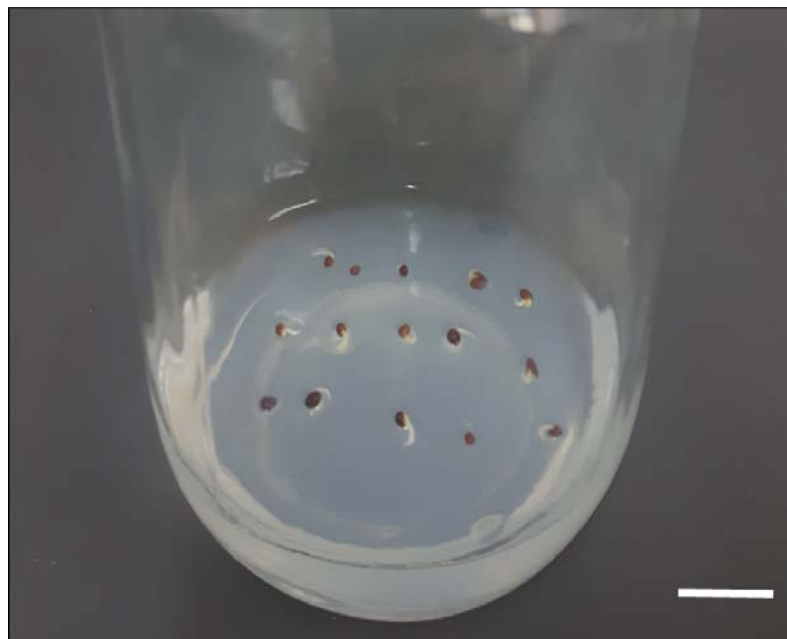


Figura 1. Protrusão das radículas de sementes de *Brassica rapa* na avaliação do índice de velocidade de germinação (IVG). Barra: 1,5

A germinação é a continuação da atividade metabólica para o crescimento do embrião que poderá se desenvolver e formar uma plântula, definindo assim sua fase inicial. Foi nessa fase onde ocorreu altas taxas da protrusão radicular, levando em consideração todas as concentrações estudadas. Entretanto, sabe-se que o Cd é um elemento tóxico, sendo a concentração que não causa dano aos tecidos vegetais é de 0,05-0,2 mg kg⁻¹, levando em consideração que em níveis, cujo, solo não contaminado estão geralmente até 2 mg Kg⁻¹ (ALLOWAY 1995; COLL, 2001).

5.2 Abertura do gancho plumular (AGP)

Ao analisar AGP ao 5º dia após a inoculação, não foi observado uma diferença estatística significativa, já que período analisado a plântula ainda estava em desenvolvimento inicial. Já para a análise no 20º e 40º dia após a inoculação foi constatada uma diferença significativa, ocorrendo uma interação com a concentração de Cd e os dias de avaliação. A maior porcentagem de AGP foi de 77% para 5 ppm de Cd aos 20 dias após a inoculação em uma tendência linear decrescente em relação as demais concentrações testadas (Figura 2).

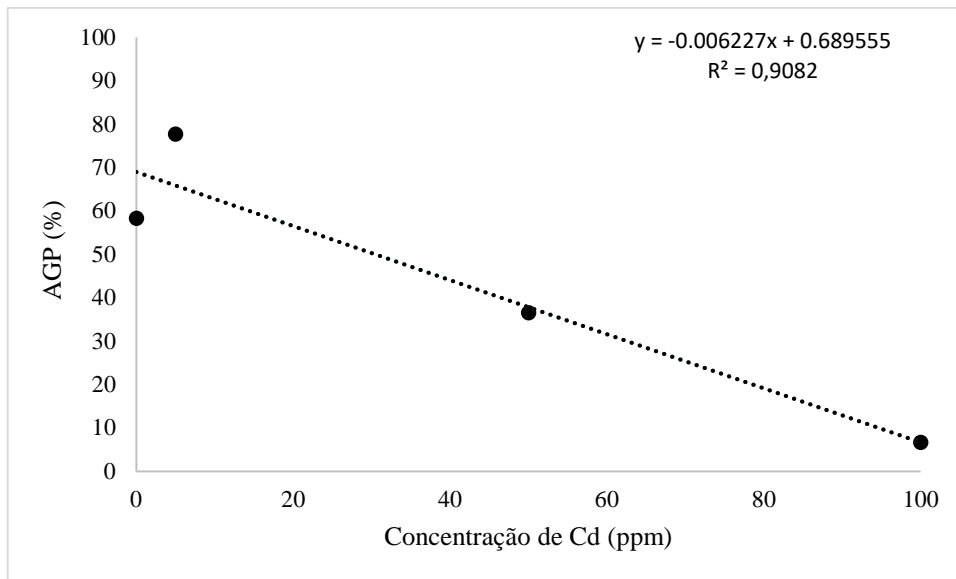


Figura 2. Porcentagem de AGP e *Brassica rapa* após 20 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd.

Já ao 40º dia após a inoculação, a mesma tendência linear decrescente foi observada. A máxima AGP (70%) foi obtida com 5 ppm de Cd. Entretanto foi observada uma ligeira redução nas porcentagens de AGP em todas as concentrações testadas em decorrência de morte de algumas plântulas (Figura 3).

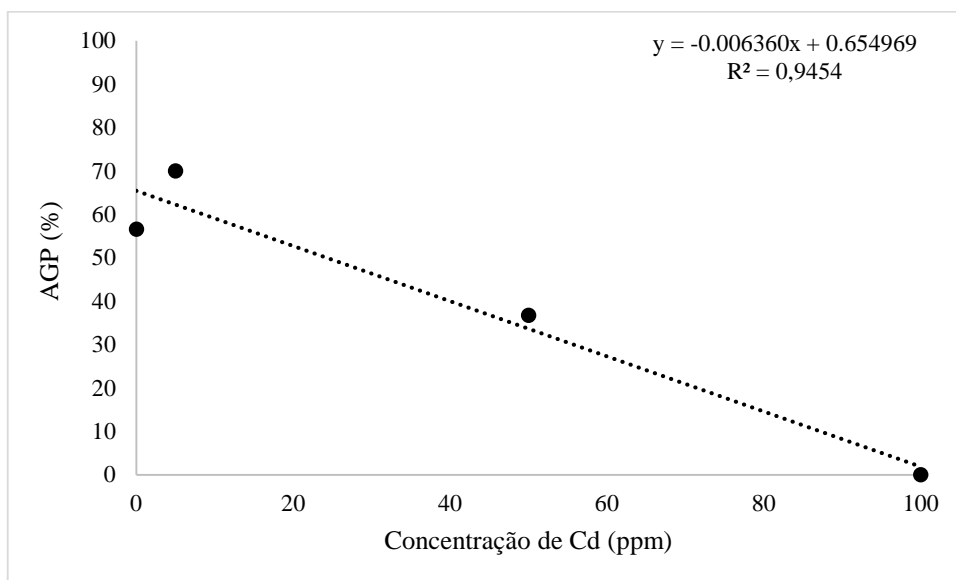


Figura 3. Porcentagem de AGP de *Brassica rapa* após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd.

5.3 Cotilédone verde (CV)

No parâmetro CV, foi observada uma interação significativa entre concentrações de Cd e os três dias de avaliação refere-se ao 5°, 20° e 40° dia após a inoculação. Houve uma diminuição linear decrescente na porcentagem de plantas de *B. rapa* com CV no 5° dia (Figura 4). É evidente que o aumento nas concentrações de Cd influenciaram negativamente o desenvolvimento das plantas após a germinação (Figura 5). Já para o 20° dia (Figura 6), também foi observado uma redução linear decrescente e para o período de 40 dias, o comportamento observado foi o de uma curva de regressão de 2° grau onde nas concentrações de 50 e 100 ppm de Cd não foram registrados mais a presença de CV (Figura 7). Em condições naturais as concentrações de Cd se assemelharam a 50 e 100 ppm (Figura 5C e 5D), as plântulas não se desenvolveram até os 40 dias de tratamento.

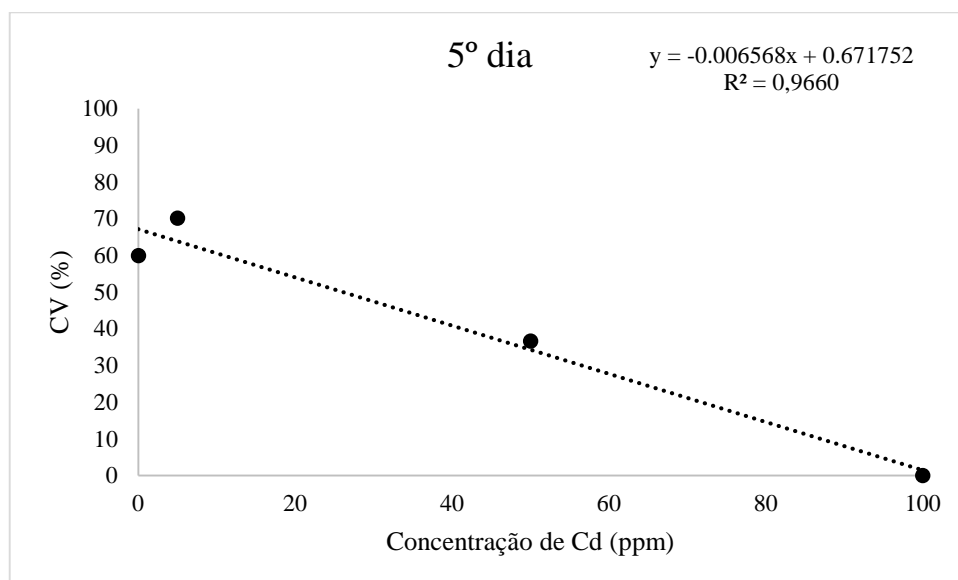


Figura 4. Porcentagem de CV de *Brassica rapa* após 5° dia de cultivo em meio MS em diferentes concentrações de Cd.

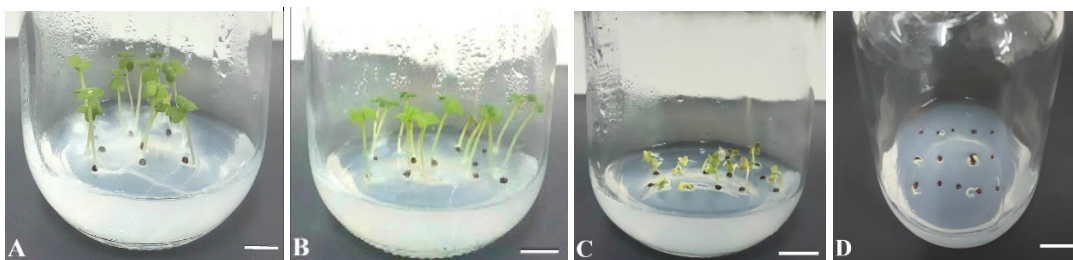


Figura 5. Germinação das sementes de *Brassica rapa* até o 5° dia de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd: controle (A), 5 ppm (B); 50 ppm (C) e 100 ppm (D). Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.

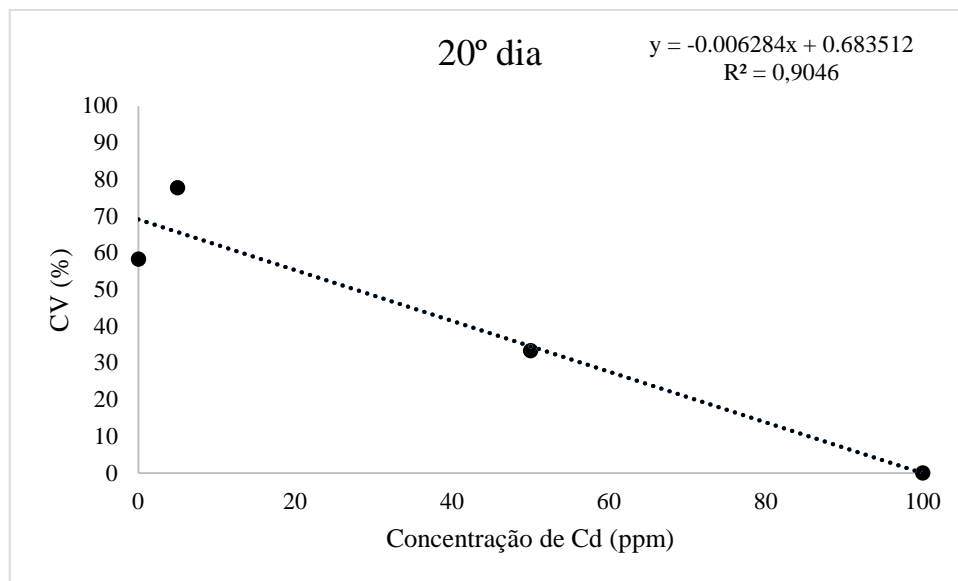


Figura 6. Porcentagem de CV de *Brassica rapa* após 20º dia de cultivo em meio MS em diferentes concentrações de Cd.

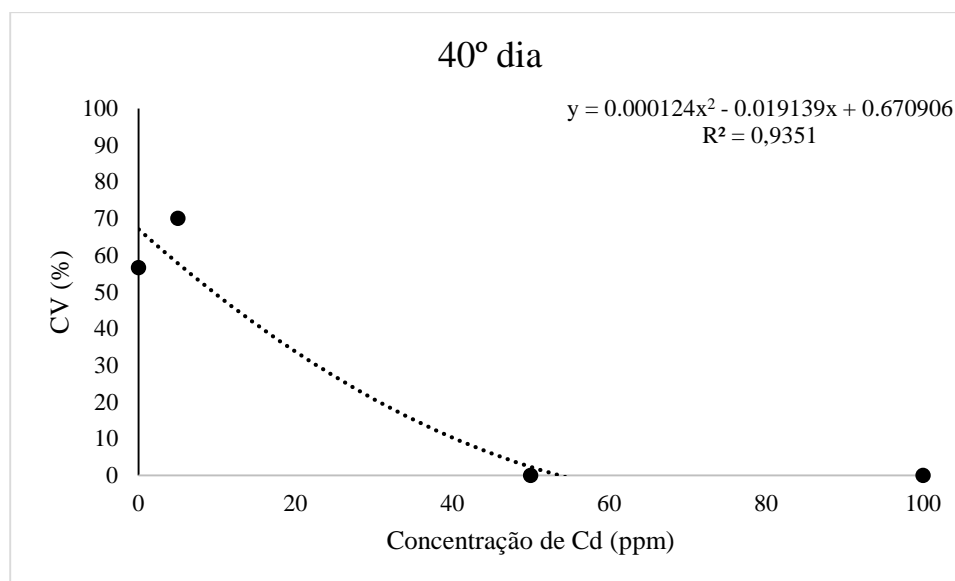


Figura 7. Porcentagem de CV de *Brassica rapa* após 40º dia de cultivo em meio MS em diferentes concentrações de Cd.

De acordo com Burzyński e Żurek (2007), em um estudo realizado *in vitro* onde sementes de pepino (*Cucumis sativus* L.) foram expostos durante 48h na concentração de 20 e 50 μM de Cd, observaram que esse elemento tóxico atingiria os tecidos cotiledonares. Dessa forma, os tratamentos com as maiores concentrações de Cd, como no presente estudo (50 e 100 ppm), os cotilédones sofreram com o acúmulo e

consequentemente a influência do Cd, apresentando sintomas de toxicidade, como: redução do crescimento aos 40 dias de exposição, necrose da região apical dos folíolos e clorose nas regiões cotiledonares.

5.4 Hipocótilo reto (HR)

A concentração de Cd no meio influenciou significativamente a disposição do hipocótilo, onde, o controle e a concentração de 5 ppm apresentaram HR de 58% e 72%, respectivamente. Em concentrações maiores ao final de 40 dias de avaliação não foram observadas plântulas com HR (Figura 8).

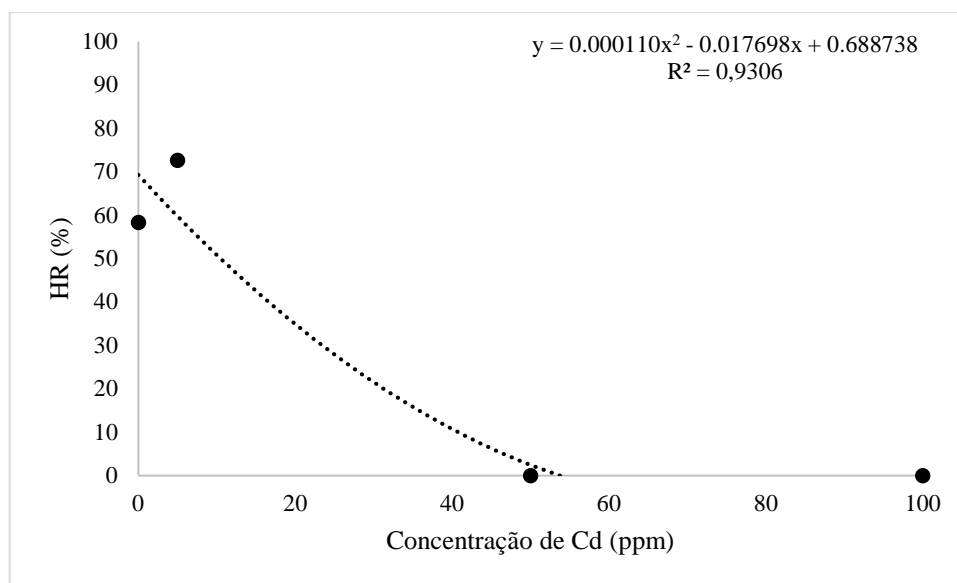


Figura 8. Porcentagem de HR de *Brassica rapa* após 40 dias de cultivo em meio MS com diferentes concentrações de Cd.

No controle e na concentração de 5 ppm, observou-se o alongamento do hipocótilo, com a forma cilíndrica e cor esbranquiçada (Figura 9A). Já para as demais concentrações o hipocótilo se apresentou curvado, com a forma cilíndrica e a cor esbranquiçada com tons escuros próximo à radícula (Figura 9B).

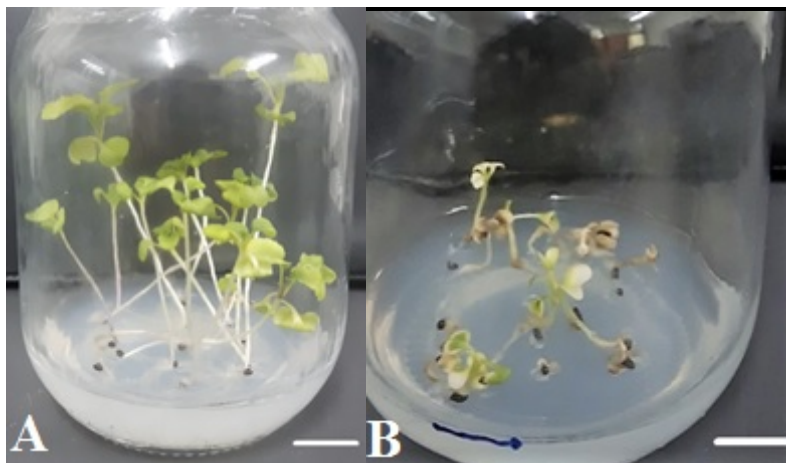


Figura 9. Hipocótilo reto da *Brassica rapa* após 40 dias de cultivo em meio MS: (A) Controle; (B) 50 ppm de Cd. Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.

A espécie de *B. juncea* tem a capacidade de acumular metais pesados principalmente em suas raízes, transportando-o e concentrando-o no hipocótilo e nos brotos (SALT et al., 1997). No presente trabalho, foi observado que em concentrações maiores que 5 ppm de Cd, houve uma redução no crescimento e desenvolvimento do hipocótilo (Figura 9B).

5.5 Desenvolvimento da plântula

A porcentagens de plântulas foi avaliada aos 40 dias após a inoculação. Os resultados obtidos mostraram que esse parâmetro sofreu uma interação com a concentração de Cd. As maiores porcentagens de plântulas foram observadas no controle e a concentração de 5 ppm de Cd. Já para as concentrações de 50 e 100 ppm de Cd foi observado um efeito negativo acentuado no crescimento da *B. rapa* onde apresentaram baixa porcentagens de formação de plântulas (Figura 11).

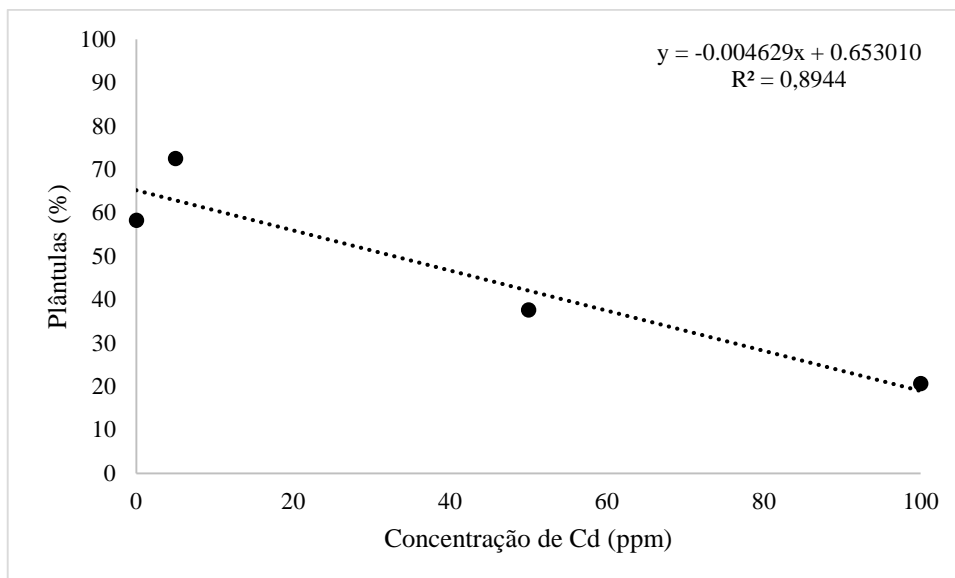


Figura 10. Porcentagem de plântulas de *Brassica rapa* até o 40º dia de cultivo em meio nas concentrações de Cd (0; 5; 50 e 100 ppm).

O aumento na concentração de Cd alterou de forma o desenvolvimento geral das plântulas de *B.rapa*, onde foi detectada clorose nas folhas expostas às maiores concentrações. Além disso, a diminuição gradual do tamanho das plantas de acordo com o aumento da concentração desse elemento também foi observada (Figura 12). De acordo com Rossi e Lima (2001), o efeito fitotóxico do cádmio promove um distúrbio no desenvolvimento e diferenciação celular, resultando em mudas anormais. Estes são considerados sintomas gerais de plantas à toxicidade por Cd (ZHOU et al., 2008). Mais ainda, em altas concentrações o Cd prejudica o crescimento das plantas, visto que o transporte e o uso de macronutrientes como o S, Ca, P e K são afetados (DAS et al., 1997; JIANG et al., 2005).

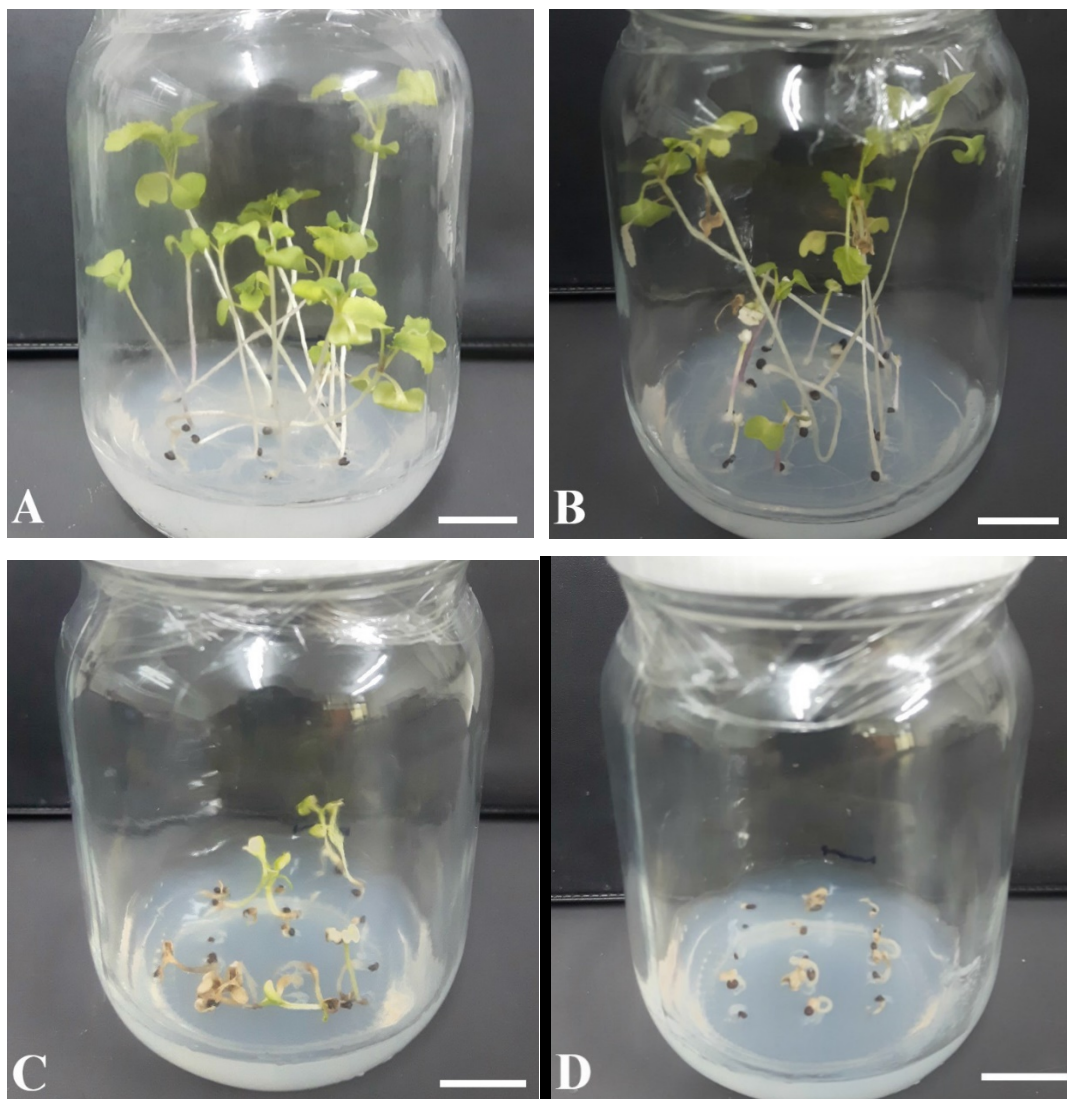


Figura 11. Crescimento da *Brassica rapa* após 40 dias de cultivo em meio MS: controle (A); 5 ppm (B); 50 ppm (C) e 100 ppm de Cd (D). Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.

5.6 Formação de folhas

A quantidade de folhas por planta apresentou diferenças significativas em relação aos tratamentos com Cd aos 40 dias após a inoculação. Para as concentrações de 0 e 5 ppm do Cd não apresentaram impedimento ao crescimento foliar, entretanto, a partir das concentrações de 50 e 100 ppm do Cd foi observado a não ocorrência de folhas (Figura 13).

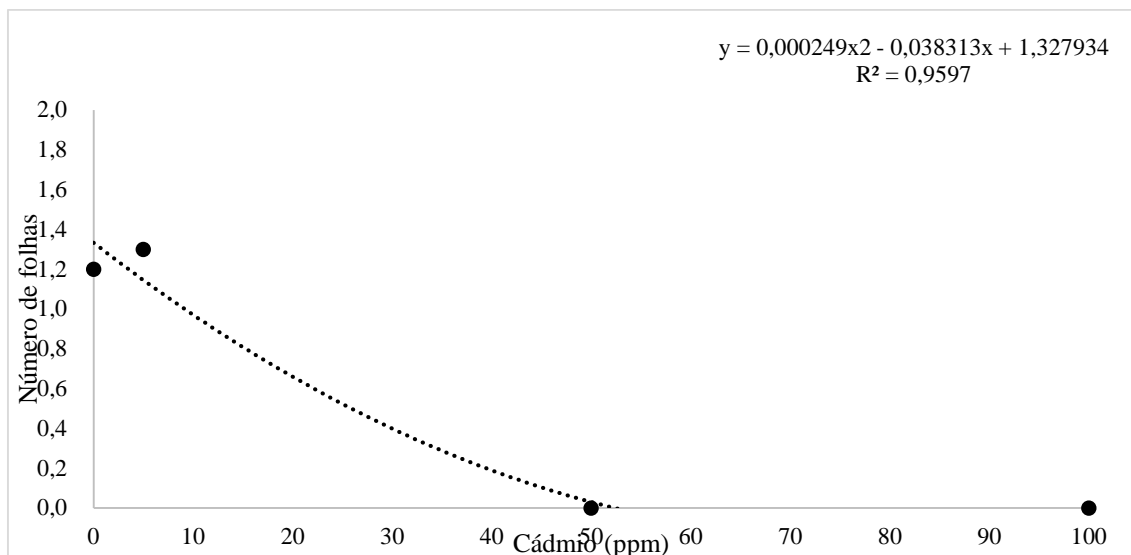


Figura 12. Número de folhas de *Brassica rapa* após 40 dias de cultivo em meio MS do controle e das concentrações de 5, 50 e 100 ppm de Cd.

Indicativos visuais de toxidez foram verificados nas folhas na concentração de 5 ppm de Cd. Ao final do período experimental, as folhas apresentaram clorose e crescimento reduzido (Figura 13). Essa redução é provocada pelos baixos teores de clorofila presentes nas plantas causadas pelo estresse por metais pesados (HORVÁTH et al., 1996; CHUGH et al., 1999; DI CAGNO et al., 1999). Stobart et al. (1985) observou que, os metais pesados interferem na biossíntese da clorofila. Outro efeito do Cd é causar alteração na troca gasosa foliar (COSTA; MOREL, 1994; LÓPEZ CLIMENT ET AL. 2011) ocasionando o fechamento estomático em plantas superiores (POSCHENRIEDER ET AL., 1989).



Figura 13. Crescimento da *Brassica rapa* após 40 dias de cultivo em meio MS com a concentração de 5 ppm de Cd. Fonte: Próprio autor. Barra: 1,5 cm.

5.7 Anatomia

Como método de comparação das alterações celulares entre as concentrações de Cd, foi estabelecido o controle onde pode-se observar a presença de xilema, floema, parênquima e células epidérmicas (Figura 14A). Na concentração de 5 ppm, não houve grandes mudanças, apenas o enrijecimento das células (Figura 14B). Para a concentração de 50 ppm de Cd (Figura 14C) houve um aumento de células do floema ocasionando o encurtamento da região parenquimática. Já para a concentração de 100 ppm de Cd (Figura 14D), houve uma diminuição da presença de xilema.

Segundo Potter et. al. (2007; 2009) e Vatehova et. al. (2012) diversas respostas a estresses gerais, como por exemplo a toxicidade de Cd, interrompem a divisão celular nos tecidos meristemáticos e inibem do crescimento. Isso pôde ser observado em *B. rapa* cultivada *in vitro* a partir da concentração de 50 ppm (Figura 14C). O Cd interfere com o ciclo celular e o efeito difere marcadamente dependendo da fase de aplicação do ciclo celular (KUTHANOVA et al., 2008).

A exposição a metais tóxicos pode alterar a estrutura dos feixes vasculares da planta (MARCHIOL et al., 1996; MUKHTAR et al., 2013). Alterações estruturais no feixe vascular também podem alterar o estado hídrico da planta (GOWAYED; ALMAGHRABI, 2013).

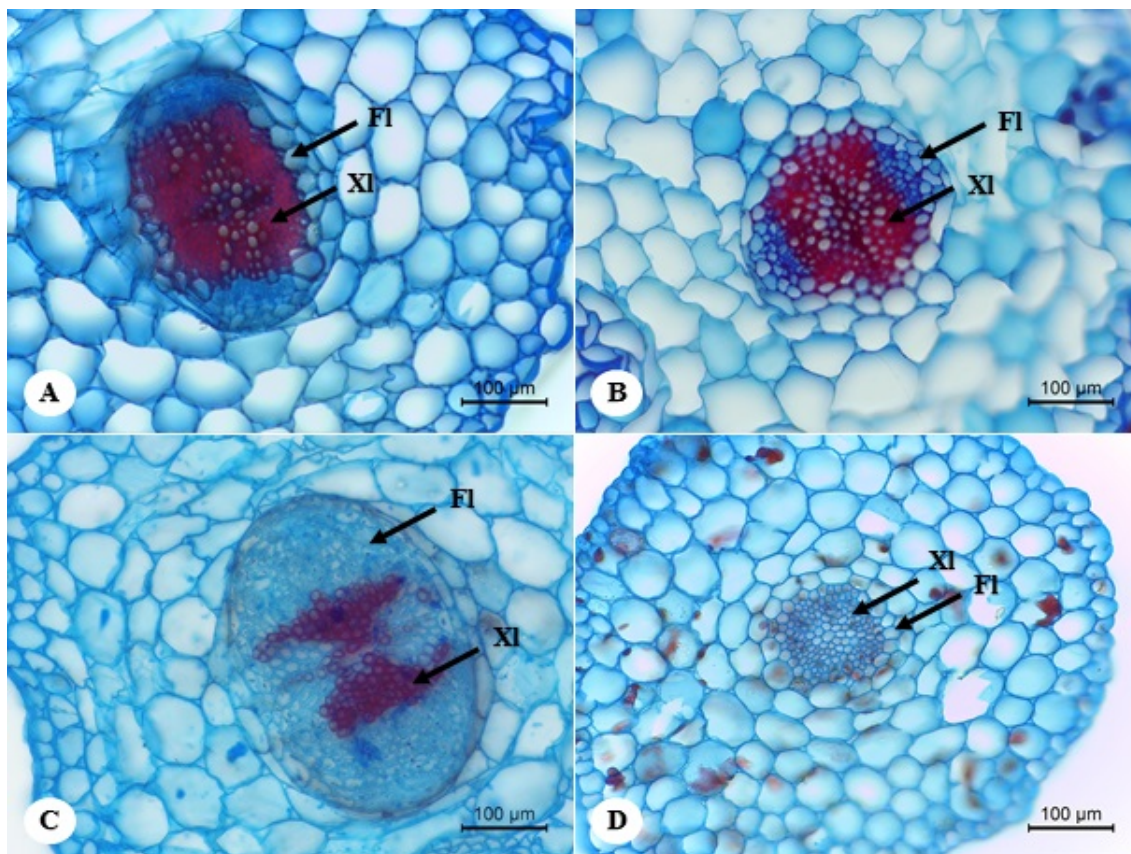


Figura 14. Secção transversal da região entre o sistema radicular e do hipocótilo de *Brassica rapa*, submetidas às concentrações crescentes de Cd. Com evidência nas fotos, os tecidos epidérmicos, parenquimáticos e feixe vascular (xilema/floema). A: controle; B: concentração 5 ppm; C: concentração 50 ppm; D: concentração 100 ppm. Legendas: XI – Xilema; Fl – Floema.

Um dos principais locais de armazenamento de metais pesados são as paredes celulares de todos os órgãos da planta. A maior parte do Cd nas raízes de duas espécies de *Brassica* foi encontrada nas paredes celulares (LIU et al., 2007). O depósito de Cd também foi observado ao longo das paredes celulares do xilema e floema em raízes de mostarda indiana (MARUTHI SRIDHAR et al., 2005). No presente trabalho pode-se observar a interferência do Cd no sistema vascular do caule de *B. rapa*, à medida em que se aumentou sua concentração (Figura 14A-D), mais especificamente na concentração de 100 ppm (Figura 14D). Nessa concentração não foi possível visualizar a diferenciação dos componentes do sistema vascular, xilema e floema, como também se observou que ocorreu uma diminuição no cilindro central do caule, que se apresentou nitidamente diminuído em comparação com as condições de controle. Resultados similares foram observados por VACULI'K et al. (2012) na análise anatômica de raízes de *Salix caprea* sob efeito do cádmio. Além disso, precipitados avermelhados (corados)

foram observados no parênquima do caule de *B. napa*, em comparação ao parênquima limpo da amostra controle, corroborando com as observações encontradas por SRIDHAR et al. (2005), num estudo da acumulação do zinco e cádmio por *B. juncea*.

6 CONCLUSÕES

A germinação das sementes de *B. rapa* não foram afetadas até o 5º dia após a inoculação.

Na menor concentração de Cd testado (5 ppm), não foram observados danos fisiológicos e anatômicos.

O número de plântulas formadas na concentração de 5 ppm de Cd foram significativamente maior do que aquelas formadas nas demais concentrações.

Foram observadas uma redução no cilindro central do caule e na formação do desenvolvimento dos feixes vasculares de plântulas em altas concentrações de Cd.

Os resultados encontrados nesse estudo mostram que a *B. rapa* possui potencial para ser utilizada como uma espécie fitorremediadora sob níveis de concentração moderada de Cd.

7 REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R. Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000.

ALI, S.; FAROOQ, M.A.; YASMEEN, T.; HUSSAIN, S.; ARIF, M.S.; ABBAS, F.; BHARWANA, S.A.; ZHANG, G. The influence of silicon on barley growth, photosynthesis and ultra-structure under chromium stress. **Ecotox. Environ. Safe** 89, 66–72, 2013.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. New York: J. Wiley. 339 p., 1990.

ALLOWAY, B.J. Heavy Metals in Soils. Glasgow (Scotland): **Blackie Academic & Professional**. 2nd ed., 1995.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; AND GWÓZDZ, E. A. 2011. The message of nitric oxide in cadmium challenged plants. **Plant Sci**. 181: 612–620, 2011.

ATAFAR, Z.; MESDAGHINIA, A.R.; NOURI, J.; HOMAEI, M.; YUNESIAN, M.; AHMADIMOGHADDAM, M.; MAHVI, A.H. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. **Environ. Monitor. Assess** 160, 83–89, 2010.

BASU, S.; CETZAL-IX, W. Brassicaceae: An agri-horticulturally important family. 2010.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 17: 21-34, 2005.

BHADURI, A. M.; FULEKAR, M. H. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Cham, v. 11, n. 1, p. 55-69, 2012.

BITTRICH, V.; KAMEYAMA, C. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. **Instituto de Botânica, São Paulo**, vol. 2, pp: 57-64, 2002.

BURZYŃSKI, M.; ŻUREK, A. Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica*, v. 45, n. 2, p. 239-244, 2007.

CAGNO, R.; GUIDI, L.; STEFANI, A.; SOLDATINI, G.F. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. **New phytologist** 144: 65-71, 1999.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 234 p., 2009.

CHANEY, R.L. Plant uptake of inorganic waste constituents. In: Parr, J.F.E.A. (Ed.), Land Treatment of Hazardous Wastes. **Noyes Data Corporation**, Park Ridge, NJ, p. 50–76, 1983.

CHAUDHRY, Q.; BLOM-ZANDSTRA, M.; GUPTA, S.; JONER, E.J. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. **Environ Sci Pollut Res** 12:34–48, 2005.

CHEN, J.; HENNY, R.J.; MCCONNELL, D.B. Development of new foliage plant cultivars. **Florida Agric Exp Sta J R-08541:117**, 2002.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiol. Biochem.** 37:297–303, 1999.

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

COLL, J.B. Fisiologia vegetal. Madrid: Editora Pirámide. 566p., 2001.

COSTA, G.; MOREL, I.L. Cadmium uptake by *Lypins albus* (L.) cadmium excretion, a possible mechanism of cadmium tolerance. **J. Plant Nutr.** 16:1921–1929, 1993.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Adv. Agron.**, v. 56, p. 55-114, 1996.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, vol. 98, n. 1, p. 29- 36, 1997.

DELMAIL, D. et al. Physiological, anatomical and phenotypical effects of a cadmium stress in different-aged chlorophyllian organs of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 72, n. 2, p. 174-181, 2011.

DEWDY R.H.; HAM G.E. Soybean growth and elemental content as influenced by soil amendments of sewage sludge and heavy metals: seedling studies. **Agron.** 69:300–303, 1997.

DIAS, N. M. P. et al. Adsorção de cádmio em dois Latossolos ácidos e um Nitossolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 297-304, 2001.

DRAZIC, G.; MIHAJLOVIC, N.; LOJIC, M. Cadmium accumulation in *Medicago sativa* seedlings treated with salicylic acid. **Biol. Plant.** 50:239–244, 2006.

EKMEKCI, Y.; TANYOLAC, D.; AYHAN, B. Effect of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. **J. Plant Physiol.** 165:600–611, 2008.

EKMEKCI, Y.; TANYOLAC, D.; AYHAN, B. Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. **J. Plant Physiol.** 165: 600–611, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GAD, S.C. Cadmium. In: Wexler P (ed) Encycloped toxicol, 3rd edn. **Academic, Oxford**, p 613–616, 2014.

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, p.147–163, 2003.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E., et al., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p.33–46, 2012.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, p. 53-64, 2005.

GREIPSSON, S. Phytoremediation. National Educational Knowledge, v. 2, p. 7, 2011.

GRISI, F. A. et al. Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuaí’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse hídrico. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1730-1736, nov./dez. 2008.

GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 2, n. 2, p. 59-60, 2008.

HAN, F. X.; SRIDHAR, B. B. M.; MONTS, D. L.; SU, Y. Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. **New Phytologist**, v.162, n.2, p.489-499,2004.

HASAN, S.A.; HAYAT, S.; ALI, B.; AHMAD, A. 28-homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidant. **Environ. Poll.** 151:60–66, 2008.

HASAN, S. A. et al. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 30, n. 2, p. 165-174, 2009.

HASSAN, M. J. et al. Toxic effects of cadmium on rice as affected by nitrogen fertilizer form. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, n. 1/2, p. 359-365, 2005.

HENRY SILVA, G. G.; CAMARGO, A. F. M. Composição química de quatro espécies de macrófitas e possibilidade de uso de suas biomassas. **Naturalia**, Rio Claro, v. 25, p. 111-125, 2000.

HORVÁTH, G.; DROPPA, M.; ORAZEEZ, A.; RASKIN, V.I.; ARDER, J.B. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. **Planta** 199: 238-243, 1996.

IBAMA. Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração técnicas de revegetação. **Brasília: Edições IBAMA**, 96 p, 1990.

JADIA, C.D., FULEKAR, M.H. Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. **Environ. Eng. Manag. J.** 7, 547–558, 2008.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **British Medical Bulletin**, Edinburgh, v. 68, n. 1, p. 167-182, 2003.

JIANG, R.F.; MA, D.Y.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). **New Phytologist**, vol. 167, n. 3, p. 805-814, 2005.

JOHANSEN, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill, Linnaeus, C. Species plantarum. Stockholm, 523 p., 1753.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer-Verlag. 550 p., 2007.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1992.

KHAN, N.A.; SAMIULLAH, S.S.; NAZAR, R. Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *J Agron Crop Sci.* 193:435–44, 2007.

KRANTEV, A.; YORDANOVA, R.; JANDA T.; SZALAS, G.; PAPOVA, L. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J. Plant Physiol.* 165:920–931, 2008.

KRUPA, Z.; QUIST, G.; HURNER, N.P.A. The effect of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. **Physiol. Plant.** 88:626–630, 1993.

LEBEAU, T.; BRAUD, A.; JEZEQUEL, K. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils. **Environ Pollut** 153:497–522, 2008.

LEFSRUD, M. G.; KOPSELL, D. A.; KOPSELL, D. E.; RANDLE, W. M. Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54,n.5,p.1764-1771, 2006.

LIN, R.; WANG, X.; LUO, Y.; DU, W.; GUO, H.; YIN, D. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Chemosphere** 69: 89–98, 2007.

LINDBLOM, S. D.; ABDELGHANY, S.; HANSON, B. R.; HWANG, S.; TERRY, N.; PILON-SMITS, E. A. H. Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. **Journal of Environmental Quality**, v.35,n.3,p.726-733,2006.

LI-XIAN, Y.; GUOLIANG, L.; SHIHUA, T.; GAVIN, S.; ZHAOHUAN, H. Salinity of animal manure and potential risk of secondary soil salinization through successive manure application. **Science of the Total Environment**, v.383,p.106-114, 2007.

LÓPEZ-CLIMENT, M.F.; ARBONA, V.; PÉREZ-CLEMENTE, R.M.; GÓMEZ-CADENAS, A. Effects of cadmium on gas exchange and phytohormone contents in citrus. **Biol. Plant.** 55:187–190, 2011.

LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21-37, 2011.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, n.1, p.176-177. 1962.

MAINE, M.A.; SUN E, N.L.; LAGGER, S.C., Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. **Water Research** v. 38, p. 1494–1501, 2004.

MAKSYMIEC, W.; MALGORZATA, W.; KRUPA, Z. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. **Chemosphere**. 66:421–427, 2007.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p. MCINTYRE, T. Phytoremediation of heavy metals from soils. In: _____. **Phytoremediation**. Berlin: Springer, p. 97-123, 2003.

MANAHAN, S. E. **Fundamentals of environmental chemistry**. Boca Raton: CRC, 994 p, 2001.

MARQUES, T.C.L.L.S.M., MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 121-132, 2000.

MARTINS, J. F. Manejo ambiental e restauração de áreas degradadas. **São Paulo: Fundação Cargill**, 2007.

MAZEN, A.M.A. Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanism of their tolerance. **Biol. Plant**. 48:267–272, 2004.

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

MESTEK, O.; POLÁK, J.; JUŘIČEK, M.; KARVÁNKOVÁ, P.; KOPLIK, R.; ŠANTRŮČEK, J.; KODIČEK, M. Trace element distribution and species fractionation in *Brassica napus* plant. **Applied Organometallic Chemistry**, v.21,n.6,p.468-474, 2007.

MILONE, M.T.; SGHERRI, C.; CLIJSTERS, H.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. **Environ. Exp. Bot.** 50:265–276, 2003.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A. F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 997–1005, nov. 2004.

MISHRA S, SRIVASTAVA S, TRIPATHI RD, DWIVEDI S, SHUKLA MK. Response of antioxidant enzymes in coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) plants under cadmium stress. **Environmental Toxicology**. 23:294–301, 2008.

MOHAMED, A.A.; CASTAGNA, A.; RANIERI, A.; SANITA DI TOPPI, L. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. **Plant Physiol. Biochem.** 57:15–22, 2012.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation, **Eng. Geol.** v. 60, p.193–207, 2001.

MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: An evaluation. **Engineering.Geology**, v. 60, p. 193-207, 2001.

PÁL, M. et al. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 169, n. 2, p. 239-246, 2006.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 21, n. 2, p. 335-341, out./dez. 2003.

PODAR, D.; RAMSEY, M. H.; HUTCHINGS, M. J. Effect of cadmium, zinc and substrate heterogeneity on yield, shoot metal concentration and metal uptake

by *Brassica juncea*: implications for human health risk assessment and phytoremediation. **New Phytologist**, v.163,n.2,p.313-324,2004.

POSCHENRIEDER C.; GUNSE B.; BARCELÓ J. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. **Plant Physiol.** 90:1365–1371, 1989.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environ. Exp. Bot.** 35:525–545, 1995.

QI-TANG, W.; ZHAOLI, X.; HUI, Y.; WONG, J. W. C. Chemical composition of root and stem saps in relation to cadmium resistance and accumulation in *Brassica parachinensis*. **Pedosphere**, v.17,n.3,p.352-359,2007.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. **Phytoremediation of toxic metals**: using plants to clean up the environmental. New York: J. Wiley. 304 p., 2000.

RODRIGUES. E. Restauração Química. In: Ecologia da Restauração. Londrina: **Editora Planta**, 300 p., 2013.

SANITA DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, n. 2, p. 105-130, 1999.

SARWAR, N. et al. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 6, p. 925-937, 2010.

SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 48, n. 4, p. 523-544, 2001.

SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z.; SAMUELSSON, G.; ÖOQUIST G.; GARDESTRÖM, P. Primary carbon metabolism in *Phaseolus vulgaris* under Cd/Fe interaction. **Plant Physiol. Biochem.** 35:951–957, 1997.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J.O. E SOARES, C.R.F.S. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1749-1757, 2006.

SKINNER, K.; WRIGHT, N.; PORTER-GOFF, E., Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 234–237, 2007.

SOUZA, V.C. 2015. Brassicaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117485>>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411).

STOBART, A.R.; GRIFFITHS, W.T.; AMEEN-BI-KHARI, J.; SHEWOOD, R.P. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum** 63: 293-298, 1985.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). Introduction to phytoremediation: EPA/600/R-99/107. **Cincinnati: National Risk Management Research Laboratory**, 2000.

VACULÍK, M. et al. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, Barking, v: 163, p. 11-126, 2012.

VASELLATI, V. et al. Effects of flooding and drought on the anatomy of *Paspalum dilatatum*. **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 3, p. 355-360, Sept. 2001.

VASSILEV, A.; PEREZ-SANZ, A.; SEMANE, B.; CARTEER, R.; VANGRONSVELD, J. Cadmium accumulation and tolerance of two salix genotypes hydroponically grown in presence of cadmium. **J. Plant Nutr.** 28:2159–2177, 2005.

WOLFF, G. A. **Avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Salvinia auriculata* Aublet na presença de cádmio e chumb.** 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ZHOU, Q. A.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: na appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, n. 2, p. 135-150, Jan. 2008.