



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE  
DUAS CULTIVARES DE BATATA (*Solanum  
tuberosum* L.) EXPOSTAS AO CÁDMIO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Jamile Fabbrin Gonçalves**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE  
DUAS CULTIVARES DE BATATA (*Solanum  
tuberosum* L.) EXPOSTAS AO CÁDMIO**

---

**por**

**Jamile Fabbrin Gonçalves**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia –  
Área de Concentração: Produção Vegetal, da Universidade Federal de  
Santa Maria/UFSM (RS), como requisito parcial para a obtenção do grau  
de **Mestre em Agronomia**.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso

Santa Maria, RS, Brasil  
2008

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE DUAS  
CULTIVARES DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.)  
EXPOSTAS AO CÁDMIO**

Elaborada por

**Jamile Fabbrin Gonçalves**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Agronomia**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Fernando Teixeira Nicoloso, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Arthur Germano Fett Neto, Dr. (UFRGS)**

---

**Maria Rosa Chitolina Schetinger, Dr. (UFSM)**  
(Co-orientadora)

Santa Maria, 21 de fevereiro de 2008

Gonçalves, Jamile Fabbrin, 1984-

G635r

Respostas fisiológicas e bioquímicas de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) expostas ao cádmio / por Jamile Fabbrin Gonçalves ; orientador Fernando Teixeira Nicoloso. – Santa Maria, 2008.  
117 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, RS, 2008.

1. Agronomia 2. Batata 3. Cádmio 4. Crescimento 5. Estresse oxidativo 6. Nutrição mineral I. Nicoloso, Fernando Teixeira, orient. II. Título

CDU: 633.491

Ficha catalográfica elaborada por  
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria, especialmente ao Departamento de Fitotecnia, pela oportunidade da realização do Curso de Pós-Graduação.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

Ao Professor Fernando Teixeira Nicoloso e à Professora Maria Rosa Chitolina Schetinger pela brilhante orientação desde a graduação, sempre realizada com sabedoria, dedicação, paciência e principalmente pela amizade criada durante esses anos de convivência.

Ao Professor Dilson Antônio Bisognin pelo fornecimento do material fundamental para a realização deste trabalho.....as minhas batatinhas!!!!

Ao professor Arthur Germano Fett Neto pela participação da comissão examinadora da minha defesa de mestrado contribuindo para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia Toxicológica: Denise, Luciane Belmonte, Rosilene, Cinthia, Rosélia, Paula, Rafael, Gilberto, Daniele, Ahmed, Roberta, Vanessa, Margarete, Cíntia e Lara.....alguns de vocês foram indispensáveis durante minha formação acadêmica me ensinando coisas que na época eram muito difíceis para eu fazer como pesar, diluir, gavar, pipetar; enquanto outros começaram a estagiar no laboratório depois de mim, mas que também contribuíram para a realização dos meus experimentos através de ajuda prática ou de um sorriso cativante!!!

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Vegetal: Luciane Tabaldi, Joseila, Renata, Liana, Gabriel, Etiane e Nicéia que foram imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho através dos seus conhecimentos científicos, mas principalmente pela amizade demonstrada durante todos esses anos de convívio sendo companheiros nos momentos de intensa preocupação ou total descontração.

Ao professor e amigo Bernardo Baldisserotto pelo carinho durante todo o período da graduação e do mestrado.

A Deus... “...Por tanta luz, por tanto amor, por tantas alegrias, eu te agradeço senhor! Por tanta força, por cada passo que eu dou, por minha família, eu te agradeço senhor, eu te agradeço senhor!!!...”

A minha mãe Celeste (*in memorian*) e à minha Vó Teresinha (*in memorian*) pelo esforço, dedicação, perseverança e exemplo de vida, pois nos méritos de minhas conquistas tem muito da presença de vocês e pela frase que jamais esquecerei “Sigamos os sonhos!”. A minha saudade as traz de volta, porque não morre quem nos outros vive, não morre quem nos outros vive.

Ao meu pai Renato, minha irmã Aline e minha tia Jacqueline que embora distantes, de uma forma ou outra, estão sempre presentes em meus projetos.

A minha irmã Etiene por estar sempre ao meu lado e não me deixar “pirar nos estudos”, por ser minha irmã querida, companheira e amiga e por ter me dado o meu maior presente..... a minha sobrinha e afilhada Helena que me mostrou o que é amar incondicionalmente e, também ao meu cunhado Cris que é a alegria em pessoa e que me derrete toda cada vez que diz “eu amo essa família”!!!

Aos meus sogros, Renate e João Adilo, e aos meus cunhados, Janaína, Alex e Alexandre, pelos anos de convivência e pelo apoio nas horas difíceis.

Em especial ao meu “namorado”, grande companheiro e amigo Alexssandro que sempre me incentivou através de muito amor e carinho. “...você é o sonho mais bonito que realizei com você não tem estresse, com você me sinto bem...”!!! Te amooooooooooooo!

Enfim, agradeço a todos que participaram de alguma forma na realização deste trabalho!!!!

**MUITO OBRIGADA!!!!**

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVO GERAL.....	17
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
4.1 Batata.....	18
4.2 Cádmio.....	20
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Manuscrito I: Crescimento <i>in vitro</i> de plântulas de batata em diferentes doses de cádmio.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT .....	29
INTRODUÇÃO .....	29
MATERIAL E MÉTODOS .....	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	39
5.2 Manuscrito II: Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions.....	43
ABSTRACT .....	44
INTRODUCTION .....	45
MATERIAL AND METHODS.....	47
RESULTS.....	49
DISCUSSION.....	59
REFERENCES.....	65
5.3 Manuscrito III: Cadmium-induced oxidative stress in two potato cultivars.....	71
ABSTRACT .....	72
INTRODUCTION .....	73
MATERIAL AND METHODS.....	76
RESULTS.....	82

<b>DISCUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>95</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>96</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>102</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>108</b>
<b>9 APÊNDICES.....</b>	<b>115</b>



## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito II

TABELA 1 Effect of increasing Cd level on root dry weight (RDW), shoot dry weight (SDW) and Cd content in shoot and roots of two potato cultivars ( <i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Asterix and Macaca) grown in the <i>in vitro</i> and hydroponic experiments.....	51
--	----

## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito I

FIGURA 1 – Número de raízes aos 15 dias após a inoculação (DAI) (A) e altura da parte aérea (B), número de segmentos nodais (C) e de folhas (D), comprimento radicular (E) e razão entre comprimento da raiz e altura da parte aérea (F) aos 22 DAI das plântulas de batata, cultivares Asterix e Macaca, submetidas a seis doses de cádmio no meio de cultura.....34

FIGURA 2 – Matéria fresca da raiz (A) e da parte aérea (B), matéria seca da raiz (C) e da parte aérea (D) e razão entre matérias secas da raiz e da parte aérea (E) aos 22 dias após a inoculação (DAI) das plântulas de batata, cultivares Asterix e Macaca, submetidas a seis doses de cádmio no meio de cultura.....37

### Manuscrito II

FIGURA 1 – Effect of increasing Cd level on Ca, K and Mg contents in shoot of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, respectively) and in hydroponics (B, D, F, respectively). .....52

FIGURA 2 – Effect of increasing Cd level on Ca, K and Mg contents in roots of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, respectively) and in hydroponics (B, D, F, respectively). .....54

FIGURA 3 – Effect of increasing Cd level on Cu, Fe, Mn and Zn contents in shoot of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, G, respectively) and in hydroponics (B, D, F, H, respectively). .....55

FIGURA 4 – Effect of increasing Cd level on Cu, Fe, Mn and Zn contents in roots of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, G, respectively) and in hydroponics (B, D, F, H, respectively). .....58

### Manuscrito III

FIGURA 1 – Effect of increasing external Cd concentration on the Cd concentration in roots (A) and in shoot (B), number of sprouts (C), nodal segments (D), roots (E) and leaves (F), and shoot (G) and root (H) length of two potato cultivars.....83

FIGURA 2 – Effect of increasing external Cd concentration on the carotenoids (A) and chlorophyll (B) contents, and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity (C) in leaves of two potato cultivars.....84

FIGURA 3 – Effect of increasing external Cd concentration on lipid peroxidation in roots (A) and in shoot (B) and protein oxidation in shoot (E) of two potato cultivars.....85

FIGURA 4 – Effect of increasing external Cd concentration on the hydrogen peroxide content and superoxide dismutase and catalase activities in roots (A, C and, E respectively) and, in shoot (B, D and, F respectively) of two potato cultivars.....87

FIGURA 5 – Effect of increasing external Cd concentration on ascorbic acid and non-protein thiol groups contents in root (A and C, respectively) and in shoot (B and D, respectively) of two potato cultivars.....88

## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Efeito de diferentes concentrações de cádmio (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$ ) sobre a morfologia da parte aérea das cultivares de batata, Asterix (A-F, respectivamente) e Macaca (G-L, respectivamente) após 22 dias de exposição ao metal em cultivo *in vitro*.....115

APÊNDICE 2 – Efeito de diferentes concentrações de cádmio (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$ ) sobre a morfologia do sistema radicular das cultivares de batata, Asterix (A-F, respectivamente) e Macaca (G-L, respectivamente) após 22 dias de exposição ao metal em cultivo *in vitro*.....116

APÊNDICE 3 – Efeito das concentrações 150  $\mu\text{M}$  (A) e 200  $\mu\text{M}$  (B) de cádmio sobre a morfologia da parte aérea de plântulas de batata após 7 dias de exposição ao metal em sistema hidropônico.....117

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

# RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE DUAS CULTIVARES DE BATATA (*Solanum tuberosum* L.) EXPOSTAS AO CÁDMIO

AUTOR: Jamile Fabbrin Gonçalves

ORIENTADOR: Fernando Teixeira Nicoloso

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de fevereiro de 2008.

Em muitos solos agrícolas, a concentração de cádmio (Cd) está acima dos níveis naturais devido, principalmente, às ações antropogênicas tais como a liberação desse metal a partir de fontes industriais e agrícolas. Logo, se torna necessário o estudo da toxicidade e acúmulo deste metal em plantas utilizadas na alimentação como a batata (*Solanum tuberosum* L.). Este estudo foi conduzido com o objetivo de identificar e caracterizar aspectos fisiológicos e bioquímicos da toxidez do Cd tais como análises de crescimento, conteúdo de nutrientes minerais e estresse oxidativo de duas cultivares de batata, Asterix e Macaca. Em condição de cultivo *in vitro*, as plântulas foram expostas a cinco concentrações de Cd (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$ ) por 22 dias para avaliação de efeitos em parâmetros de crescimento e nutrição mineral. Em sistema de cultivo hidropônico, as plântulas foram expostas a quatro concentrações de Cd (0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) por 7 dias para avaliação de efeitos em aspectos de crescimento, nutrição mineral e também de estresse oxidativo. Em ambas as condições de cultivo, *in vitro* e em hidroponia, as plântulas de batata de ambas as cultivares, Asterix e Macaca, apresentaram redução da altura da parte aérea, número de segmentos nodais, número de folhas e número de raízes pelo aumento dos níveis de Cd no substrato. Os resultados relacionados, principalmente, ao comprimento radicular e à produção de biomassa fresca de ambas as cultivares de batata crescidas em ambas as condições de cultivo, permitem inferir que a cv. Macaca foi mais sensível ao Cd do que a cv. Asterix, quando cultivadas *in vitro*. Entretanto, no sistema hidropônico foi verificada uma resposta contrária. A concentração de Cd nas raízes e na parte aérea de plântulas da batata crescidas tanto *in vitro* quanto hidroponicamente aumentou progressivamente de acordo com o incremento de sua concentração no meio de cultivo. Embora o conteúdo de Cd nos tecidos das plântulas cultivadas em hidroponia tenha exibido comportamento linear, nas plântulas crescidas *in vitro* foi observado um comportamento errático deste. Esta resposta errática, possivelmente, seja devido ao incremento da biomassa seca observado nas menores concentrações e a forte inibição desta nas maiores concentrações de Cd. Em geral, os macro e micronutrientes não tiveram sua absorção e acumulação alteradas pelo Cd nas plântulas cultivadas hidroponicamente. Entretanto nas plântulas cultivadas *in vitro*, altas concentrações de Cd causaram drásticas reduções no conteúdo destes nutrientes minerais. Em adição, a cultivar

Macaca apresentou aumento no conteúdo de alguns nutrientes somente quando cultivada *in vitro* e exposta as menores concentrações de Cd, corroborando com os resultados encontrados em relação ao estímulo da produção de biomassa seca. A presença de Cd em sistema de cultivo hidropônico diminuiu o conteúdo de carotenóides somente na cultivar Macaca, bem como reduziu a atividade da enzima aminolevulinato desidratase e o conteúdo de clorofila em ambas as cultivares, indicando que o Cd interfere negativamente em processos relacionados à fotossíntese em plântulas de batata. O Cd aumentou os níveis de malondialdeído na parte aérea e nas raízes de ambas as cultivares, bem como aumentou o conteúdo de grupamentos carbonil na parte aérea de ambas as cultivares na concentração mais alta de Cd. O aumento na concentração de peróxido de hidrogênio em plântulas de batata submetidas ao Cd indica que este metal alterou a produção de espécies reativas de oxigênio conduzindo à peroxidação lipídica das membranas e à oxidação protéica nestas plântulas. O Cd causou alterações na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase, além de alterar a concentração de moléculas antioxidantes não-enzimáticas, como o ácido ascórbico e grupos tióis não-protéicos em plântulas de batata. As alterações observadas no sistema de defesa antioxidante e no conteúdo de nutrientes minerais das plântulas de batata expostas ao Cd indicam que este metal promoveu estresse oxidativo e desequilíbrio no balanço nutricional nesta espécie, o que contribui para os efeitos negativos observados em relação ao crescimento da batata.

**Palavras-chave:** batata, cádmio, crescimento, estresse oxidativo, nutrição mineral

## ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Agronomy

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

# PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF TWO POTATO CULTIVARS (*Solanum tuberosum* L.) EXPOSED TO CADMIUM

AUTHOR: Jamile Fabbrin Gonçalves

ADVISER: Fernando Teixeira Nicoloso

Date and Place of Defense: February 21, 2008, Santa Maria

In much agricultural farmland, cadmium (Cd) concentrations are above the natural levels mainly due to anthropogenic actions such as metal liberation from industrial and agricultural sources. Therefore, it is necessary to study the toxicity and accumulation of this metal in plants used as food sources such as the potato (*Solanum tuberosum* L.). This study was carried out with the objective of identifying and characterizing physiologic and biochemical aspects of Cd toxicity such as growth analysis, mineral nutrient content and oxidative stress of two potato cultivars, Asterix and Macaca. The *in vitro* plantlets were exposed to five concentrations of Cd (0, 100, 200, 300, 400 and 500  $\mu\text{M}$ ) for 22 days to evaluate the effects on growth parameters and mineral nutrition. In the hydroponic system, the plantlets were exposed to four concentrations of Cd (0, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{M}$ ) for 7 days to evaluate the effects on growth parameters, mineral nutrition and oxidative stress. In both systems, *in vitro* and hydroponics, both potato cultivars, Asterix and Macaca, showed a reduction in shoot length, number of nodal segments, number of leaves, and number of roots with increasing Cd levels in substrate. The results mainly related to root length and to the production of fresh biomass of both potato cultivars grown in both systems allow us to infer that cv. Macaca is more sensitive to Cd than cv. Asterix when grown *in vitro*. However, in the hydroponic system, the opposite was verified. Cd concentrations in roots and shoot of potato plantlets grown either *in vitro* or hydroponically increased progressively with increasing Cd levels in substrate. Although Cd content in the potato tissues grown in hydroponics exhibited a linear behavior, in the plantlets grown *in vitro* the increase in Cd content showed an erratic behavior. This may be due to the fact that an increase in dry biomass was observed at the lowest Cd level, whereas a strong reduction of biomass was observed at the highest Cd level. In general, macro and micronutrient content was not altered by Cd in the plantlets grown hydroponically. However, *in vitro*, high Cd concentrations caused drastic reductions in the content of these mineral nutrients. In addition, the Macaca cultivar showed an increase in the content of some nutrients only when cultivated *in vitro* and exposed to low Cd levels, corroborating with the results observed for dry biomass production. The presence of Cd in the hydroponic system decreased the carotenoid content only in the Macaca cultivar, however it reduced the aminolevulinate dehydratase activity and chlorophyll content in both potato cultivars, indicating that Cd interferes negatively in processes related to photosynthesis. Cd increased

malondialdehyde levels in the shoot and roots of both potato cultivars, and increased the carbonyl groups in the shoot of both potato cultivars at the highest Cd level. The increase in the hydrogen peroxide concentration indicates that Cd altered the production of reactive oxygen species leading to lipid peroxidation of the membranes and to protein oxidation in these plantlets. Cd caused alterations in the activity of antioxidant enzymes such as catalase and superoxide dismutase, besides altering the content of non-enzymatic antioxidants such as ascorbic acid and non-protein thiol groups. The alterations observed in the antioxidant defense system and mineral nutrient content of potato plantlets exposed to Cd indicate that this metal promoted oxidative stress and a nutritional imbalance in this species, which contributed to the negative effects observed in relation to its growth.

**Key-words:** cadmium, growth, mineral nutrition, oxidative stress, potato



## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscritos, os quais se encontram no item RESULTADOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referência Bibliográficas encontram-se nos próprios manuscritos e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO, dispostos após os manuscritos, contêm interpretações e comentários gerais referentes aos manuscritos contidos neste estudo.

A REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e DISCUSSÃO desta dissertação.

## 1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por metais pesados tem aumentado muito devido às ações antropogênicas tais como as atividades industriais e agrícolas, as quais foram intensificadas no final do século dezenove e início do século vinte (BENAVIDES et al., 2005). No Brasil, não existem estatísticas da extensão da contaminação do solo, mas sabe-se que esta ocorre em todo o território nacional, existindo, apenas em São Paulo, em torno de 2.000 locais potencialmente contaminados (ALVES, 1996).

Os insumos ou subprodutos utilizados com finalidade corretiva ou nutricional na agricultura são, de fato, importantes fontes de contaminação com metais pesados, em especial, os fertilizantes fosfatados, os quais contêm metais a partir da rocha que os originou ou dos ingredientes usados na industrialização deste (CAMPOS et al., 2005). Além disso, se sabe que as rochas fosfatadas usadas na produção dos fertilizantes são as maiores fontes de cádmio (Cd) em solos agrícolas (MORTVEDT, 1987).

Entre os metais pesados, o Cd é um dos mais importantes para se considerar, uma vez que este metal é facilmente absorvido pelas raízes e translocado para diferentes partes das plantas (LI et al., 1995). Por este motivo, o conhecimento sobre as interações entre as plantas e os metais como o Cd é muito importante não só à segurança do meio ambiente, mas também para reduzir os riscos à saúde humana associados com a introdução destes elementos na cadeia alimentar (BENAVIDES et al., 2005).

O Cd pode causar muitas mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e estruturais nas plantas incluindo redução do crescimento, principalmente radicular (GONÇALVES et al., 2007), inibição da fotossíntese e indução de distúrbios nutricionais (OUZOUNIDOU et al., 1997) bem como ocasionar estresse oxidativo através de um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio, as quais danificam várias moléculas e estruturas celulares, prejudicando o metabolismo celular (SHAH et al., 2001; SINGH et al., 2006).

Em vista disso, o estudo das respostas fisiológicas e bioquímicas da batata (*Solanum tuberosum* L.) exposta ao Cd é muito importante, pois esta ocupa o quarto lugar em volume de produção mundial de alimentos, sendo superada somente pelo trigo (*Triticum aestivum*), pelo milho (*Zea mays*) e pelo arroz (*Oryza sativa*) (FAO, 1998). Além disso, sabe-se que o Cd que é acumulado nos tubérculos da batata pode representar uma proporção significativa do total de intoxicações causadas por este metal em humanos (STENHOUSE,

1992). E, semelhante ao que vem sendo observado com outras plantas, as cultivares de batata parecem diferir com relação a sua habilidade em acumular o Cd (DUNBAR et al., 2003).

Contudo, existem poucos estudos com relação a vários aspectos do metabolismo oxidativo e nutricional da batata quando exposta ao Cd e, embora os efeitos tóxicos do Cd nos sistemas biológicos já tenham sido relatados por vários autores, os mecanismos da sua toxicidade ainda não estão completamente esclarecidos.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o crescimento, o estresse oxidativo e a nutrição mineral de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L. cv. Asterix e Macaca) expostas ao cádmio.

## **3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar o efeito do Cd no crescimento de duas cultivares de batata submetidas a diferentes condições de cultivo, cultivo *in vitro* e em sistema hidropônico.
- Caracterizar o efeito do Cd sobre o sistema antioxidante enzimático e não-enzimático de duas cultivares de batata crescidas hidroponicamente e sua relação com o conteúdo de pigmentos fotossintéticos (clorofila e carotenóides), peroxidação lipídica e oxidação protéica.
- Caracterizar a acumulação e a distribuição do Cd e de alguns nutrientes minerais em duas cultivares de batata expostas ao Cd em diferentes condições de cultivo, cultivo *in vitro* e em sistema hidropônico.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Batata

A batata é uma planta dicotiledônea, pertencente à família Solanaceae, gênero *Solanum*, o qual contém mais de 2.000 espécies, das quais pouco mais de 150 produtoras de tubérculos. Entre as cultivadas, a que possui maior importância econômica é a espécie *Solanum tuberosum*, que é cultivada em, pelo menos, 140 países (PEREIRA et al., 2003). Esta planta é um vegetal perene, embora habitualmente seja cultivada como bianual na Região Sul do Brasil. O plantio da safra é recomendado em julho e agosto, e a safrinha é em fevereiro e março (BISOGNIN, 1996). Sua parte aérea é herbácea, com altura variável entre 50 e 70 cm, podendo, entretanto, alcançar até 1,5 m na fase adulta. O ciclo vegetativo da cultura pode ser precoce (< 90 dias), médio (90 – 110 dias) ou longo (> 110 dias), dependendo da cultivar (PEREIRA et al., 2003).

A batata é originária da Cordilheira dos Andes e ocupa o quarto lugar em quantidade de produção sendo superada apenas pelo trigo, milho e arroz (FAO, 1998). O cultivo da batata no Brasil foi intensificado na década de 20, sendo hoje considerada a principal hortaliça do país, tanto em área cultivada como em preferência alimentar (LOPES & BUSO, 1997). Esta planta é um dos alimentos mais consumidos no mundo, devido a sua composição, versatilidade gastronômica e tecnológica, assim como pelo baixo preço de comercialização dos tubérculos (COELHO et al., 1999).

A quantidade de produtos industrializados à base de batata tem crescido nos últimos anos em nível mundial, incluindo o Brasil, principalmente para produtos que podem ser consumidos diretamente, como chips e batata palha, ou produtos para serem preparados, como batatas descascadas e cortadas em palitos resfriados ou pré-fritos congelados (ZORZELLA et al., 2003).

A produção de batata concentra-se nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, sendo estes Estados responsáveis por aproximadamente 98% da produção nacional (IBGE, 2004). A cultura da batata se desenvolve sob uma variedade de altitudes, latitudes, e condições climáticas, desde o nível do mar até 4000 metros de elevação (DAVIES et al., 2005) além de tolerar uma acidez moderada no solo, produzindo bem na faixa de pH 5,0 a 6,5 (PREZOTTI et al., 1986).

Segundo estimativas, em 1994, a área plantada no Estado do Rio Grande do Sul ficou assim distribuída: 80% com a cv. Baronesa, 10% com a cv. Macaca e 10% com outras

cultivares. Já em 2000, as estimativas foram de menos de 50% para Baronesa, cerca de 30% para Asterix e 20% para outras cultivares (Macaca, Monalisa, Elvira, Achat, etc.). Na Região Central, praticamente, não se planta mais a cv. Baronesa, devido, principalmente, à dificuldade de comercialização, visto que, entre as batatas de periderme rosada, a Asterix e a Macaca têm demonstrado melhor aceitação no mercado, nas redes de supermercados, apesar das dificuldades de manejo da brotação da cv. Asterix. A aparência externa dessa cultivar é melhor em relação à cor, ao brilho e à uniformidade em comparação à cv. Baronesa. Quanto à Macaca, os principais nichos de colonização são as regiões de colonização alemã, onde as suas qualidades culinárias são muito apreciadas (PEREIRA et al., 2003).

A cultivar Asterix é originária da Holanda e apresenta plantas altas, com três a cinco hastes e boa cobertura do solo. O ciclo é médio. Os tubérculos têm formato alongado, olhos raros, periderme rosa e predominantemente áspera, polpa amarelo-clara. A brotação é tardia. É susceptível à requeima e às viroses, e possui média resistência à pinta-preta. Apresenta alto potencial produtivo, com elevada percentagem de tubérculos graúdos. Sob estresse hídrico apresenta desuniformidade no formato dos tubérculos. É muito sensível à sarna-prateada (*Helminthosporium solani*). O teor de matéria seca é de médio a alto e é boa para fritura de palitos e salada (PEREIRA et al., 2003).

A cultivar Macaca é originária do Brasil e as plantas são de porte baixo, com hábito de crescimento ereto e fechado. O ciclo é curto. Tubérculos redondos e achatados, olhos rasos, com periderme rosa escura e áspera, e polpa branca. Baixa sensibilidade ao esverdeamento. A brotação é bastante precoce. É uma cultivar susceptível à requeima e à pinta-preta e medianamente resistente às viroses. O teor de matéria seca é de médio a baixo, sendo boa para purê e regular para fritura de chips (PEREIRA et al., 2003).

As plantas de batata são expostas a vários tipos de agentes ambientais como o Cd, tanto acidentalmente, pelos compostos poluentes presentes no ar, no solo e na água quanto deliberadamente através de pesticidas e de reguladores do crescimento (GICHNER et al., no prelo). De interesse particular para este trabalho é o fato do Cd acumulado nos tubérculos de batata poder representar mais de 50% do total das intoxicações desse metal em humanos (STENHOUSE, 1992) e que os vegetais, em geral, são a maior fonte de exposição não-ocupacional ao Cde (SATARUG et al., 2003); logo se torna necessário o estudo sobre a acumulação de Cd e as respostas fisiológicas e bioquímicas a este metal em plantas agrônomicas tais como a batata, o milho, o arroz, o tomate (*Lycopersicon esculentum*) e o feijão (*Phaseolus vulgaris*), entre outras. Entretanto, não existem muitos trabalhos a respeito da toxicidade do cádmio em plantas de batata.

REID et al. (2003) relataram que as raízes basais foram as principais fontes de Cd para todos os tecidos da batata, e que estas raízes contribuíram para aproximadamente 85% do cádmio acumulado nos tubérculos. Neste mesmo trabalho, os autores descobriram que a periderme do tubérculo acumulou altas concentrações de Cd, mas que a absorção deste metal pelo tubérculo foi limitada. Estes mesmos pesquisadores descrevem a batata como um excelente sistema para o estudo do movimento do Cd em uma planta, devido à enorme importância do floema em fornecer nutrientes aos tubérculos.

DUNBAR et al. (2003) confirmaram a importância do floema no transporte dos elementos minerais e do Cd aos tubérculos e que, semelhante ao que vem sendo observado em outras plantas, as cultivares de batata (Kennebec e Wilwash) aparentemente diferem com relação a sua habilidade em acumular o Cd, embora essas diferenças não sejam consistentes. Além disso, estes pesquisadores relataram que a diferença entre as concentrações de Cd nos tubérculos das cultivares de batata não poderia ser associada às diferenças em relação ao crescimento ou a maior absorção de Cd pela planta como um todo, pois claramente as diferenças devem estar associadas com a variação na distribuição do metal entre os tubérculos e as demais estruturas da planta.

## 2.2 Cádmio

O cádmio (Cd) é o principal contaminante ambiental e um dos mais tóxicos entre os metais pesados (CHEN & KAO, 1995). O Cd é um elemento não essencial que tem sua concentração aumentada no ambiente devido às atividades humanas como a mineração, a aplicação de fertilizantes, a utilização de adubação com lodo de esgoto e de efluentes industriais contaminados, a fabricação de baterias de automóveis, as aplicações militares e aeroespaciais, entre outros (PRASAD, 1995). Solos altamente poluídos por Cd contendo cerca de 100 mg kg<sup>-1</sup> deste metal foram encontrados em países como a China e a França (ALLOWAY & STEINNES, 1999; KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001; WANG et al., 2001)

Existente na crosta terrestre em baixas concentrações (entre 0,15 e 0,20 mg kg<sup>-1</sup>), este metal associa-se geralmente ao zinco, na forma de depósito de sulfeto, de cor prata clara, dúctil e mole. Apresenta peso molecular 112,41 e número atômico 48, com ponto de fusão e ebulição iguais a 321°C e 767,2°C respectivamente, e densidade de 8,64 g/m<sup>3</sup> (BERNARD & LAUWERYS, 1984).

O Cd penetra facilmente pela raiz podendo chegar até o xilema através tanto da via simplástica quanto apoplástica (SALT et al., 1995). No processo de absorção, a membrana

plasmática das células das raízes desempenha uma importante função, prevenindo ou reduzindo a entrada deste metal na planta (BENAVIDES et al., 2005). Entretanto, exemplos de mecanismos de exclusão ou redução da absorção em plantas superiores são limitados (BENAVIDES et al., 2005). O potencial de membrana das células da epiderme radicular, o qual é negativo no interior celular e pode exceder -200 mV provê um gradiente favorável para a absorção de cátions através dos transportadores secundários (HIRSCH et al., 1998). Entretanto, as paredes celulares da camada de células da endoderme agem como uma barreira para a difusão de solutos via apoplasto para o sistema vascular (BENAVIDES et al., 2005). A maioria dos metais pesados associados à parede celular está ligada a ácidos poligalacturônicos, cuja afinidade varia de acordo com o metal (ERNST et al., 1992).

Diversos fatores podem afetar a absorção de Cd pela planta tais como a concentração de metal no meio, as condições de crescimento, o pH do meio, a presença de matéria orgânica e a espécie estudada (BROWN & BECKETT, 1985). Também os genótipos da mesma espécie podem responder diferentemente quanto à capacidade de absorver e transportar metais pesados dentro do organismo vegetal (GABBRIELLI et al., 1990; LIU et al., 2007). Normalmente, o Cd absorvido é retido em maior quantidade no sistema radicular e pouca quantidade é transportada para os tecidos superiores (STOLT et al., 2003; MISHRA et al., 2006; TIRYAKIOGLU et al., 2006). Este confinamento do metal no sistema radicular pode ser devido à imobilização do Cd na parede celular (VECCHIA et al., 2005) e aos carboidratos extracelulares (WAGNER, 1993) ou a um eficiente seqüestro do Cd nos vacúolos (NOCTOR et al., 1998).

Pelo fato do Cd ser facilmente absorvido pelas raízes das plantas e translocado para seus diferentes órgãos (PRASAD, 1995), este metal oferece grande risco à saúde humana através da sua introdução na cadeia alimentar (LIU et al., 2007). Além disso, o Cd possui uma meia-vida biológica longa (cerca de 30 anos) em humanos (COTZIAS et al., 1961; NORDBERG & KJELLSTROM, 1979). Por esse motivo, efeitos adversos à saúde podem aparecer mesmo após a redução ou cessação à exposição ao Cd, como enfisemas pulmonares, desmineralização óssea, destruição dos eritrócitos e câncer (LEWIS et al., 1972; JARUP et al., 1988; GHOSHROY et al., 1998). Sob exposição crônica, o Cd é acumulado principalmente no fígado e nos rins (NORDBERG & MILLER, 1975; KLAASSEN et al., 1999)

No caso das plantas, a presença de Cd pode causar alterações tanto enzimáticas quanto metabólicas resultando em muitas mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e estruturais (BENAVIDES et al., 2005) tais como a inibição do crescimento (AN, 2004;

WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005), inibição da germinação das sementes (RASCIO et al., 1993), desbalanço hídrico (BARCELÓ et al., 1986) bem como distúrbios na absorção e na distribuição dos nutrientes minerais (ZHANG et al., 2002). O Cd tem um forte efeito sobre a nutrição mineral das plantas visto que a absorção de Cd parece estar relacionada à competição pelos mesmos canais transmembrana que absorvem os nutrientes minerais tais como Ca, K, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, os quais são necessários para o crescimento e desenvolvimento normais das plantas (RIVETTA et al., 1997; CLEMENS, 2001). Entretanto, os resultados a respeito do efeito do Cd sobre os elementos essenciais são muito controversos. Acredita-se que estas contradições sejam devido a diferenças nos métodos de cultura, espécie e genótipos estudados, órgãos analisados, idade da planta, bem como condições de experimento incluindo o suporte físico das plantas, os níveis de nutrientes e de Cd no meio, temperatura e tempo de exposição ao contaminante (RAMOS et al., 2002; DONG et al., 2006).

Além disso, o Cd pode interferir na fotossíntese por causar vários danos ao aparelho fotossintético. O Cd pode danificar a cadeia fotossintética de elétrons, conduzindo a um aumento na produção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e de radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (ASADA & TAKAHASHI, 1987), causar diversas mudanças ultra estruturais nas folhas afetando o desenvolvimento dos cloroplastos (OUZOUNIDOU et al., 1997; VITÓRIA et al., 2001), interferir no conteúdo de carotenóides (DRAZKIEWICZ & BASZYNSKI, 2005; MISHRA et al., 2006) e, principalmente, reduzir o conteúdo de clorofila (CHUGH & SAWHNEY, 1999; DONG et al., 2005; MOBIN & KHAN, 2007). Esta redução no conteúdo de clorofila é atribuída a inúmeros fatores como a desorganização dos cloroplastos incluindo a diminuição no número de membranas fotossintéticas, o estresse oxidativo, o aumento da atividade da lipoxigenase, a degradação da clorofila bem como a inibição da síntese desta molécula (SOMASHEKARAI AH et al., 1992; MISHRA et al., 2006).

Em relação à síntese de clorofila, a enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) desempenha uma importante função uma vez que a reação catalisada por esta enzima faz parte da rota de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos como a clorofila (JAFFE et al., 2000). A  $\delta$ -ALA-D catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico (ALA) formando o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (GIBSON et al., 1955). Experimentos realizados por MORSCH et al. (2002) demonstraram que a atividade desta enzima em plântulas de rabanete (*Raphanus sativus*) foi significativamente inibida tanto *in vitro* quanto *in vivo* na presença de metais pesados, tais como o Cd. NORIEGA et al. (2007) demonstraram que o Cd inibiu fortemente a atividade da  $\delta$ -ALA-D em experimentos



realizados com soja (*Glycine max*). Segundo estes autores e REYTER & TYRRELL (2000), a inibição da  $\delta$ -ALA-D pode levar a uma acumulação do seu substrato, o ALA, o qual pode contribuir endogenamente para um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Em adição, se sabe que a exposição das plantas aos metais induz estresse oxidativo pelo fato destes estarem envolvidos em vários tipos de mecanismos que geram EROs (STOHS & BAGCHI, 1995). As EROs são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico ( $O_2$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) que tipicamente resultam da excitação do  $O_2$  formando o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), ou da transferência de um, dois, ou três elétrons para o  $O_2$  para formar, respectivamente, o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou o radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ) (DAT et al., 2000; ASADA, 1999). Estas espécies ocorrem naturalmente nos organismos aeróbicos porque são gerados durante processos metabólicos normais como a respiração e a fotossíntese (ASADA & TAKAHASHI, 1987). Entretanto, tornam-se extremamente danosas quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção destas espécies uma vez que todas as EROs quando em alta concentração são tóxicas para o organismo podendo oxidar proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e conduzir a alterações na estrutura e funções celulares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Um dos efeitos mais danosos das EROs nas células é a peroxidação lipídica da membrana plasmática e a oxidação das proteínas por estes processos terem sido observados em diversas plantas expostas ao Cd (CHAOUY et al., 1997; SHAH et al., 2001; MISHRA et al., 2006; RELLÁN-ÁLVARES et al., 2006; SING et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007).

O Cd pode ocasionar estresse oxidativo (HENDRY et al., 1992; SOMASHEKARAIAH et al., 1992). No entanto, em contraste com outros metais de transição como o Cu e o Fe, acredita-se que o Cd não interfira diretamente sobre a produção de EROs (via reações de Fenton ou de Haber-Weiss) (SALIN, 1988). Os metais como o Cd, sem capacidade redox, podem ressaltar o estado pró-oxidante por reduzirem a quantidade de glutathiona reduzida (GSH), ativando sistemas dependentes de cálcio e afetando processos mediados pelo ferro (PINTO et al., 2003).

Em resposta a essa agressão, as plantas expostas ao Cd desenvolveram algumas adaptações como a indução de um sistema antioxidante de defesa não-enzimático, que inclui componentes de baixa massa molecular tais como glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (AsA), carotenóides e  $\alpha$ -tocoferol (GRATÃO et al., 2005). Existem numerosos trabalhos descrevendo uma depleção do conteúdo de GSH pelo Cd em várias espécies de plantas

(BALESTRASSE et al., 2001; BENAVIDES et al., 2005), Por outro lado, um aumento neste conteúdo foi observado em raízes e folhas de *Phragmites australis* (IANNELLI et al., 2002; PIETRINI et al., 2003). Quando expostas a concentrações elevadas de Cd, as plântulas de pepino (*Cucumis sativus*) exibiram um aumento do conteúdo de ácido ascórbico indicando o envolvimento deste na resposta antioxidante ao Cd nesta espécie (GONÇALVES et al., 2007). TIRYAKIOGLU et al. (2006) observaram um aumento tanto de AsA quanto de grupos tios não-protéicos (NPSH) provocado pelo Cd em diferentes genótipos de cevada (*Hordeum vulgare*). Cultivares de trigo (*T. durum*) apresentaram uma forte redução do conteúdo de AsA na parte aérea e um aumento de grupos -SH nas raízes quando crescidas na presença de Cd (OZTURK et al., 2003). SING et al. (2006) relataram que as raízes e folhas de *Bacopa monnieri* apresentaram uma diminuição no conteúdo de AsA dependente do tempo de exposição e da dose de Cd, já o conteúdo de NPSH aumentou nas folhas e mostrou um aumento seguido de decréscimo nas raízes.

Os vegetais também possuem um sistema de enzimas antioxidantes capazes de remover e neutralizar as EROs. Dentre estas enzimas antioxidantes destacam-se a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a superóxido dismutase (SOD), entre outras (SCANDALIOS, 1993). A enzima SOD é a principal destoxicadora de radicais superóxido e sua ação enzimática resulta na formação de  $H_2O_2$  e  $O_2$ . O produto  $H_2O_2$  ainda é tóxico quando em altas concentrações e precisa ser convertido em  $H_2O$  em reações subseqüentes realizadas pela CAT e várias classes de peroxidases como a APX (BENAVIDES et al., 2005; GRATÃO et al., 2005). A ativação ou a inibição destas enzimas depende não somente da intensidade e da duração do estresse, mas também do tipo de tecido e da idade da planta estudados (SGHERRI et al., 2001), por isso existem muitas variações nos resultados encontrados na literatura. A diminuição na atividade da SOD pelo Cd tem sido observada em feijão (SOMASHEKARAI AH et al., 1992), *Helianthus annuus* (GALLEGO et al., 1996), e ervilha (*Pisum sativum*) (SANDALIO et al., 2001) assim como aumento em ervilha (DALURZO et al., 1997) e *Alyssum* (SCHICKLER & CASPI, 1999). A diminuição da atividade da CAT pelo Cd tem sido observada em feijão (SOMASHEKARAI AH et al., 1992), *P. aureus* (SHAW, 1995), ervilha (DALURZO et al., 1997), *Lemna minor* (MOHAN & HOSSETTI, 1997) e *Amaranthus lividus* (BHATTACHARJEE, 1998) bem como aumento em *Agropyron repens* (BREJ, 1998) e rabanete (VITÓRIA et al., 2001). O Cd aumentou a atividade da APX em *Brassica juncea* (MOBIN & KHAN, 2007) e milho (RELLÁN-ÁLVAREZ et al., 2006) enquanto em pepino (ZHANG et al., 2002) e café (*Coffea arabica*) (GOMES-JÚNIOR et al., 2006) houve uma redução da atividade. GONÇALVES et al. (2007) observaram que plântulas

de pepino expostas a 100, 400 e 1000  $\mu\text{M}$  Cd apresentaram aumento da atividade da SOD e da CAT e diminuição da APX. Segundo estes autores e MISHRA et al. (2006), a diminuição da atividade da APX aparentemente foi compensada pelo aumento da atividade da CAT uma vez que ambas possuem funções similares degradando o  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Além do sistema antioxidante não-enzimático e enzimático, outro mecanismo de defesa desenvolvido pelas plantas para conferir maior tolerância à exposição ao Cd envolve a formação de peptídeos ricos em cisteína, conhecidos como fitoquelatinas e metalotioneínas (LOZANO-RODRÍGUES et al., 1997). As metalotioneínas são codificadas geneticamente, enquanto as fitoquelatinas são sintetizadas enzimaticamente (COBBETT, 2000), mas ambas são capazes de complexar o Cd. As fitoquelatinas desempenham uma importante função na exclusão da toxicidade do Cd de processos celulares sensíveis tanto por quelar o metal no citoplasma quanto por realizar a deposição deste no vacúolo (WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005). De fato, estudos têm mostrado que o vacúolo é o local de acumulação de alguns metais como Zn e Cd (ERNST et al., 1992; WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005) e que a acumulação de Cd e fitoquelatinas no vacúolo envolve um transportador ABC (HALL, 2002). Além disso, vários estudos têm demonstrado a relação entre toxicidade de Cd e a produção de fitoquelatinas em diferentes espécies de plantas (SALT & RAUSER, 1995; STOLT et al., 2003; WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005; MISHRA et al., 2006). Associa-se também, o aumento do conteúdo NPSH ao aumento da síntese de fitoquelatinas (GONÇALVES et al., 2007).

## **5 RESULTADOS (MANUSCRITOS)**

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob forma de três manuscritos, os quais se encontram aqui organizados.

## 5.1 MANUSCRITO I

### **Crescimento *in vitro* de plântulas de batata em diferentes doses de cádmio**

Artigo submetido à revista

**CIÊNCIA RURAL**

## Crescimento *in vitro* de plântulas de batata em diferentes doses de cádmio

### *In vitro* growth of potato plantlets in different doses of cadmium

Jamile Fabbrin Gonçalves<sup>1</sup> Fernando Teixeira Nicoloso<sup>2</sup> Liana Veronica Rossato<sup>3</sup> Joseila Maldaner<sup>1</sup>

Luciane Almeri Tabaldi<sup>1</sup> Etiane Caldeira Skrebsky<sup>1</sup> Dilson Antônio Bisognin<sup>4</sup>

#### RESUMO

Devido, principalmente, às ações antropogênicas, tais como a industrialização e o uso de insumos na agricultura, os níveis de cádmio têm aumentado em muitos solos agrícolas. O presente trabalho objetivou caracterizar o efeito do cádmio no crescimento *in vitro* de duas cultivares de batata. Segmentos nodais de plantas previamente estabelecidas *in vitro* das cultivares Asterix e Macaca foram submetidas a doses de cádmio de 0 (controle), 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu$ M em meio de cultivo MS suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1g L<sup>-1</sup> de mio inositol e 6g L<sup>-1</sup> de agar. Avaliou-se o número de raízes aos 15 dias após a inoculação (DAI) dos explantes, o número de segmentos nodais e de folhas, a altura da parte aérea, o comprimento das raízes e a matéria seca e fresca das raízes e da parte aérea, aos 22 DAI (final do experimento). O cádmio afetou negativamente o crescimento das cultivares de batata, exceto em matéria seca das raízes, na cv. Macaca, e matéria seca da parte aérea, em ambas as cultivares nas menores doses. Sinais de escurecimento dos segmentos nodais e aumento no número de raízes adventícias foram observados nas duas cultivares nas três maiores doses de cádmio e, somente nas duas maiores doses, foram observados clorose e murchamento foliar. As cultivares Asterix e Macaca de batata são sensíveis ao cádmio, porém a cv. Asterix apresenta menor sensibilidade.

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, UFSM, Campus Universitário, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: [ftnicoloso@yahoo.com](mailto:ftnicoloso@yahoo.com). Autor para correspondência.

<sup>3</sup> Curso de Ciências Biológicas, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Fitotecnia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

**Palavras-chave:** *Solanum tuberosum*, metal pesado, clones, toxicidade.

## ABSTRACT

Levels of cadmium have been increasing in many agricultural soils mainly due to the anthropogenic actions, such as industrialization and use of inputs in the agriculture. The present work aimed at characterizing the effect of cadmium on *in vitro* growth of two potato cultivars. Nodal segments of plants previously *in vitro* established of cultivars Asterix and Macaca were submitted to cadmium concentration of 0 (control), 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu$ M in MS culture medium supplemented with 30g L<sup>-1</sup> of sucrose, 0.1g L<sup>-1</sup> of myo-inositol and 6g L<sup>-1</sup> of agar. Number of roots was evaluated at 15 days after inoculation (DAI) of the explants. Number of nodal segments and leaves, shoot length, root length, and fresh and dry mass of roots and shoot were evaluated at 22 DAI (end of the experiment). Cadmium negatively affected the growth of the two potato cultivars, except the dry matter of the roots, in the cv. Macaca, and dry matter of the shoot, in both cultivars at the lowest levels. Darkening of nodal segments and an increase in the number of aerial roots were observed at three highest Cd doses for both cultivars and, only at the two highest doses chlorosis and drying of leaves were observed. The potato cultivars Asterix and Macaca are both sensitive to cadmium, but the cv. Macaca is more sensitive than the cv. Asterix.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, heavy metal, clones, toxicity.

## INTRODUÇÃO

A batata (*Solanum tuberosum* L.) é uma planta dicotiledônea pertencente à família Solanaceae. A sub-espécie *tuberosum* é a mais importante economicamente sendo produzida em, pelo menos, 140 países (PEREIRA et al., 2003). A batata ocupa o quarto lugar em volume de produção mundial de alimentos (323 milhões de toneladas), sendo superada somente pelo trigo, milho e arroz (FAO, 2007). O cultivo da batata no Brasil foi intensificado na década de 20, sendo hoje considerada a principal hortaliça do país, tanto em área cultivada (cerca de 145.000 ha ano<sup>-1</sup>) como em preferência alimentar (IBGE, 2007).

Em muitos solos agrícolas, a concentração de cádmio (Cd) está acima dos níveis naturais devido, principalmente, às ações antropogênicas tais como a liberação desse metal a partir de fontes industriais e agrícolas. Isso se deve ao fato de que os insumos ou subprodutos utilizados com finalidade corretiva ou nutricional na agricultura também podem contribuir como uma fonte de contaminação com metais pesados (CAMPOS et al., 2005). As rochas fosfatadas usadas na produção dos fertilizantes são as maiores fontes de contaminação com Cd em solos agrícolas (MORTVEDT, 1987). O Cd acumulado nas plantas pode interferir em vários processos fisiológicos, declinando a produtividade agrícola (PAGE et al., 1972).

O conhecimento sobre as interações entre as plantas e os metais pesados é muito importante, não só à segurança do meio ambiente, mas também para reduzir os riscos associados com a introdução desses elementos na cadeia alimentar (BENAVIDES et al., 2005). Entre os metais pesados, o Cd é um dos mais importantes para se considerar, pelo fato de ser facilmente absorvido pelas raízes e translocado para diferentes partes das plantas (TIRYAKIOGLU et al., 2006). A exposição a altas doses de Cd tem sido relacionada a efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos para muitas espécies animais (DEGRAEVE, 1981).

O Cd acumulado nos tubérculos de batata pode representar mais de 50% do total das intoxicações desse metal em humanos (STENHOUSE, 1992). E, semelhante ao que vem sendo observado em outras plantas, as cultivares de batata podem diferir com relação a sua habilidade em acumular o Cd, embora as diferenças genéticas não sejam consistentes (DUNBAR et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do Cd no crescimento *in vitro* de duas cultivares de batata, Asterix e Macaca, com a finalidade de distingui-las quanto à sensibilidade a este metal.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Foram utilizadas as cultivares Asterix e Macaca de batata provenientes do banco de germoplasma do Programa de Genética e Melhoramento de Batata da UFSM.



Segmentos nodais provenientes de plântulas com 25 dias de cultivo foram previamente inoculados em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), suplementado com 30g L<sup>-1</sup> de sacarose, 0,1g L<sup>-1</sup> de mio inositol e 6g L<sup>-1</sup> de agar (utilizado como meio basal). Segmentos nodais (1cm) sem folhas foram inoculados no meio de cultura adicionado de cinco doses de Cd (0, 100, 200, 300, 400 e 500µM), na forma de cloreto de cádmio monohidratado (CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O). Em cada frasco de cultivo foi adicionado 50mL de meio e 10mL de solução de cádmio, com pH ajustado para 5,5 ± 0,1 e autoclavados separadamente. Os frascos de cultivo (8,0 cm de diâmetro, 13,0 cm de altura e um volume de 653,12 cm<sup>3</sup>) contendo seis explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25°C ± 1, fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 35µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, obtido por lâmpadas fluorescentes frias.

Avaliou-se o número de raízes aos 15 dias após a inoculação (DAI) dos explantes. Avaliaram-se o número de segmentos nodais e de folhas, a altura da parte aérea, o comprimento das raízes (TENNANT, 1975) e a matéria seca e fresca das raízes e da parte aérea aos 22 DAI (final do experimento). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias e teste de separação de médias Tukey 5%, com o auxílio do software científico – NTIA, desenvolvido pelo Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para Agricultura (EMBRAPA, 1997).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos demonstraram que em todas as variáveis de crescimento analisadas houve interação entre as doses de cádmio e as cultivares Asterix e Macaca de batata.

O número de raízes da cv. Asterix foi reduzido nas três maiores doses de cádmio (300, 400 e 500µM), já a cv. Macaca apresentou essa redução somente nas duas maiores doses (Figura 1a). Em 500µM de Cd, houve uma redução de 65% e 94% no número de raízes das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. Na ausência de Cd (controle) e em todas as doses de cádmio no meio de cultivo, a cv. Asterix apresentou maior número de raízes comparando-se à cv. Macaca. Os efeitos do Cd no

crescimento do sistema radicular das plantas vêm sendo estudados em várias espécies, constituindo um dos parâmetros mais sensíveis em relação à toxicidade desse metal (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001). WÓJCIK & TUKIENDORF (2005) relataram que plantas de milho crescidas em solução nutritiva por um período de 14 dias na presença de 5 a 300 $\mu$ M de Cd apresentaram redução no número de raízes laterais. No presente estudo, pôde-se, visualmente, perceber que houve um aumento no número de raízes aéreas adventícias em ambas as cultivares de batata nas três maiores doses de Cd, fato que sugere um mecanismo de defesa da planta contribuindo para uma maior retenção do metal no sistema radicular. Além disso, alguns trabalhos relatam que as raízes de várias espécies como trigo (OUZOUNIDOU et al., 1997), milho (WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005), *Bacopa monnieri* (MISHRA et al., 2006) e cevada (TIRYAKIOGLU et al., 2006) tratadas com Cd podem apresentar sinais visíveis de escurecimento, o que não foi observado em batata.

Todas as doses de Cd testadas no meio de cultura reduziram a altura da parte aérea de ambas as cultivares de batata (Figura 1b). Em 500 $\mu$ M de Cd, houve uma redução de 79% e 99% na altura da parte aérea das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior altura em comparação à cv. Asterix no controle e nas duas menores doses de Cd, enquanto na maior dose, a cv. Asterix foi superior em altura em relação à cv. Macaca. Em diferentes genótipos de cevada crescidos hidronicamente durante duas semanas, a presença de 120 $\mu$ M de Cd reduziu o comprimento da parte aérea (TIRYAKIOGLU et al., 2006). Resultados semelhantes foram observados em trigo por OUZOUNIDOU et al. (1997) e em alho por ZHANG et al. (2005).

O número de segmentos nodais da cv. Asterix sofreu redução somente nas duas maiores doses de Cd, enquanto na cv. Macaca essa redução foi observada a partir da dose 200 $\mu$ M de Cd (Figura 1c). Em 500 $\mu$ M de Cd, houve uma redução de 56% e 99% no número de segmentos nodais das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior número de segmentos nodais em comparação à cv. Asterix no controle e em 100 $\mu$ M de Cd, enquanto nas duas maiores doses, a cv. Asterix foi superior em número de segmentos nodais em relação à cv. Macaca. DANTAS et al. (2001) verificaram que o encurtamento dos internós na presença de alumínio em alguns porta-enxertos somaclonais de macieira

resultou em uma altura média menor. No presente trabalho, verificou-se que o Cd reduziu o número de segmentos nodais em ambas as cultivares de batata, o que também pode estar relacionado a uma redução da altura da parte aérea em ambas as cultivares. Além disso, observaram-se sinais visíveis de oxidação (escurecimento) dos segmentos nodais nas três maiores doses de Cd. Segundo HIRANO & HIJII (1998), de plantas tratadas com alumínio, esse escurecimento ocorre principalmente em ápices radiculares e é atribuído à oxidação de fenóis, o que pode ser causado por diminuição do pH.

O número de folhas da cv. Asterix sofreu redução somente nas duas maiores doses de Cd, enquanto na cv. Macaca esta redução foi observada a partir da dose 300 $\mu$ M de Cd (Figura 1d). Em 500 $\mu$ M de Cd, houve uma redução de 55% e 99% no número de folhas das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior número de folhas em comparação à cv. Asterix no controle e em 100 $\mu$ M de Cd, enquanto nas duas maiores doses, a cv. Asterix foi superior em número de folhas em relação à cv. Macaca. Sintomas visíveis marcantes como clorose e murchamento foliar, foram observados em ambas as cultivares de batata, somente nas duas maiores doses de Cd. Segundo LEITA et al. (1995), quando a concentração de Cd se torna elevada nas plantas, há um declínio metabólico, com perda da turgidez foliar e fechamento estomatal hidropassivo. WÓJCIK & TUKIENDORF (2005) relatam que plantas de milho apresentaram murchamento das folhas mais velhas, além de clorose e necrose das folhas mais jovens quando crescidas na presença de Cd. Em trigo foram observadas clorose e curvatura foliar (OUZOUNIDOU et al., 1997). Além disso, a toxicidade de Cd pode causar queda foliar (SOARES et al., 2005; TIRYAKIOGLU et al., 2006).

O comprimento radicular da cv. Asterix sofreu redução a partir da dose 200 $\mu$ M de Cd, por outro lado, a cv. Macaca apresentou essa redução em todas as doses de Cd testadas (Figura 1e). Em 500 $\mu$ M de Cd, houve uma redução de 92% e 99% no comprimento radicular das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. Não houve diferença entre as cultivares de batata para essa variável. De acordo com DRAZKIEWICZ & BASZYNSKI (2005), a inibição da elongação radicular é uma das principais respostas das plantas à exposição ao Cd, e ocorre mais rapidamente que outras respostas fisiológicas e

tem sido reportada em diversas espécies de plantas, tais como trigo, milho, *Brassica pekinensis* e *B. chinensis* (OUZOUNIDOU et al., 1997; WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005; LIU et al., 2007).

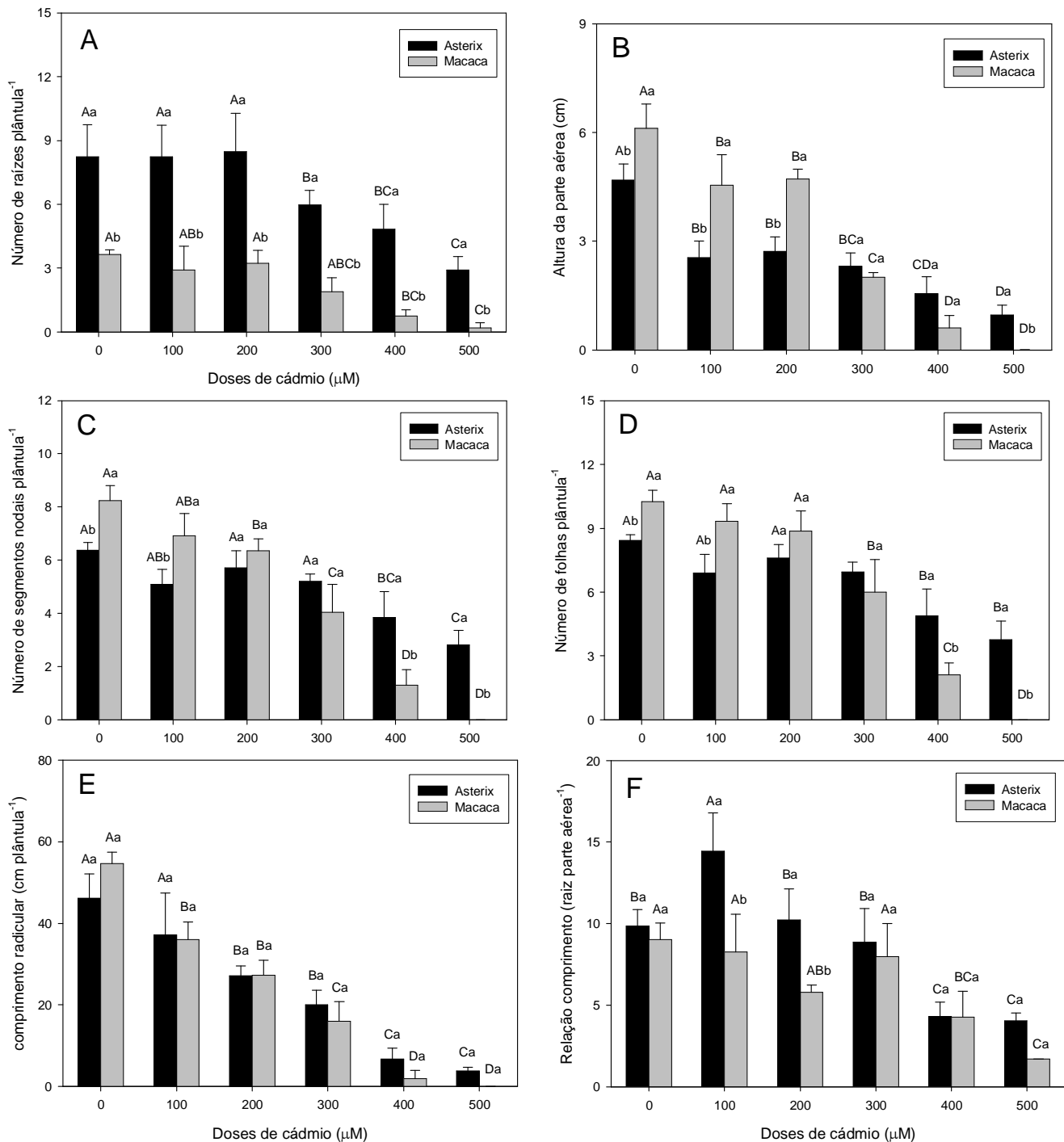


Figura 1- Número de raízes aos 15 dias após a inoculação (DAI) (A), altura da parte aérea (B), número de segmentos nodais (C) e de folhas (D), comprimento radicular (E) e razão entre comprimento da raiz e altura da parte aérea (F) aos 22 DAI das plântulas de batata, cultivares Asterix e Macaca, submetidas a cinco doses de cádmio no meio de cultura. Médias  $\pm$  desvio padrão da média. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as doses de cádmio para a mesma cultivar de batata ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as cultivares de batata para a mesma dose de cádmio ( $P < 0,05$ ).

A razão entre o comprimento de raízes e da parte aérea aumentou em 100µM de Cd para a cv. Asterix, isso se deve ao fato de que nessa dose de Cd ocorreu uma redução levemente maior do comprimento da parte aérea em relação ao da raiz. Por outro lado, nas duas maiores doses de Cd em ambas as cultivares houve uma redução desta relação, sugerindo que o comprimento da raiz é mais afetado pelo Cd que a altura da parte aérea em plântulas de batata (Figura 1f).

Todas as doses de Cd testadas no meio de cultura reduziram a matéria fresca radicular de ambas as cultivares de batata (Figura 2a). Em 500µM de Cd, houve uma redução de 87% e 95% na matéria fresca das raízes das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior produção de matéria fresca radicular em comparação à cv. Asterix no controle e nas duas menores doses de Cd, enquanto nas três maiores doses, a matéria fresca das raízes da cv. Asterix predominou em relação à da cv. Macaca. A matéria fresca da parte aérea foi reduzida a partir da dose 200µM de Cd em ambas as cultivares (Figura 2b). Em 500µM de Cd, houve uma redução de 82% e 83% na matéria fresca da parte aérea das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior produção de matéria fresca da parte aérea em comparação à cv. Asterix no controle e nas duas menores doses de Cd, enquanto na dose 400µM de Cd, a cv. Asterix apresentou maior matéria fresca da parte aérea em relação à cv. Macaca. Redução da matéria fresca da parte aérea e das raízes pela presença de Cd no meio de cultura também foi observada em *Bacopa monnieri* (MISHRA et al., 2006), trigo (OUZOUNIDOU et al., 1997) e milho (WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005).

A produção de matéria seca radicular da cv. Asterix foi reduzida a partir da dose 200µM de Cd, entretanto, a cv. Macaca apresentou um incremento na produção de matéria seca radicular na menor dose de Cd testada (100µM de Cd) com uma drástica redução a partir da dose 300µM de Cd (Figura 2c). Em 500µM de Cd, houve uma redução de 88% e 94% na matéria seca das raízes das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior produção de matéria seca radicular em comparação à cv. Asterix no controle e nas duas menores doses de Cd, enquanto nas doses 300 e 400µM de Cd, a cv. Asterix apresentou maior produção de matéria seca das raízes em relação à da cv. Macaca. A produção de matéria seca da parte aérea das cultivares Asterix e Macaca apresentou um incremento na

menor dose de Cd e nas duas menores doses, respectivamente. Após esse incremento, a matéria seca da parte aérea de ambas as cultivares decaiu drasticamente (Figura 2d). Em 500 $\mu$ M de Cd, houve uma redução de 73% e 70% na matéria seca das raízes das cultivares Asterix e Macaca, respectivamente. A cv. Macaca apresentou maior produção de matéria seca da parte aérea em comparação à cv. Asterix no controle e nas duas menores doses de Cd, enquanto na dose 400 $\mu$ M de Cd, a cv. Asterix apresentou maior produção de matéria seca da parte aérea em relação à da cv. Macaca. O efeito positivo causado no crescimento vegetal por baixas doses de cádmio tem sido pobremente discutido na literatura. De acordo com KENNEDY & GONSALVEZ (1987), baixas doses de cádmio hiperpolarizam a membrana plasmática da superfície radicular, aumentando, assim, o potencial transmembrana, o qual é uma fonte de energia para a absorção de cátions. Além disso, o cádmio induz genes relacionados à proliferação das células de mamíferos, os quais poderiam aumentar o crescimento (BEYERSMANN, 2002). A resposta temporária dos organismos de estímulo ao crescimento a baixas doses de muitas substâncias tóxicas está geralmente relacionada ao efeito hormético. A hormese representa uma resposta de supercompensação do crescimento devido a um desequilíbrio na homeostase dos tecidos (CALABRESE & BLAIN, 2005). BARAZANI et al. (2004) verificaram que houve um incremento na matéria seca radicular de plântulas de *Allium schoenoprasum* expostas a 50 e 250 $\mu$ M de Cd. Além disso, TIRYAKIOGLU et al. (2006) relataram que diferentes genótipos de cevada apresentaram redução na produção de matéria seca tanto na parte aérea quanto na raiz, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho e em outras pesquisas (SOARES et al., 2005; LIU et al., 2007).

Em ambas as cultivares de batata, a razão entre a matéria seca das raízes e da parte aérea diminuiu em todas as doses de Cd testadas, exceto na dose 200 $\mu$ M de Cd para a cv. Asterix. Isto se deve ao fato de que nessa dose de Cd ocorreu uma redução similar da matéria seca radicular e da parte aérea em relação ao controle (Figura 2e). A diminuição desta relação sugere que a biomassa radicular foi mais severamente afetada que a biomassa da parte aérea em ambas as cultivares de batata. MISRHA et al. (2006) e TIRYAKIOGLU et al. (2006) sugerem que as raízes são mais afetadas pelo Cd devido ao fato desse

órgão ser o primeiro local de exposição a esse metal, e conseqüentemente, acumularem Cd em quantidades muito maiores na raiz em comparação à parte aérea.

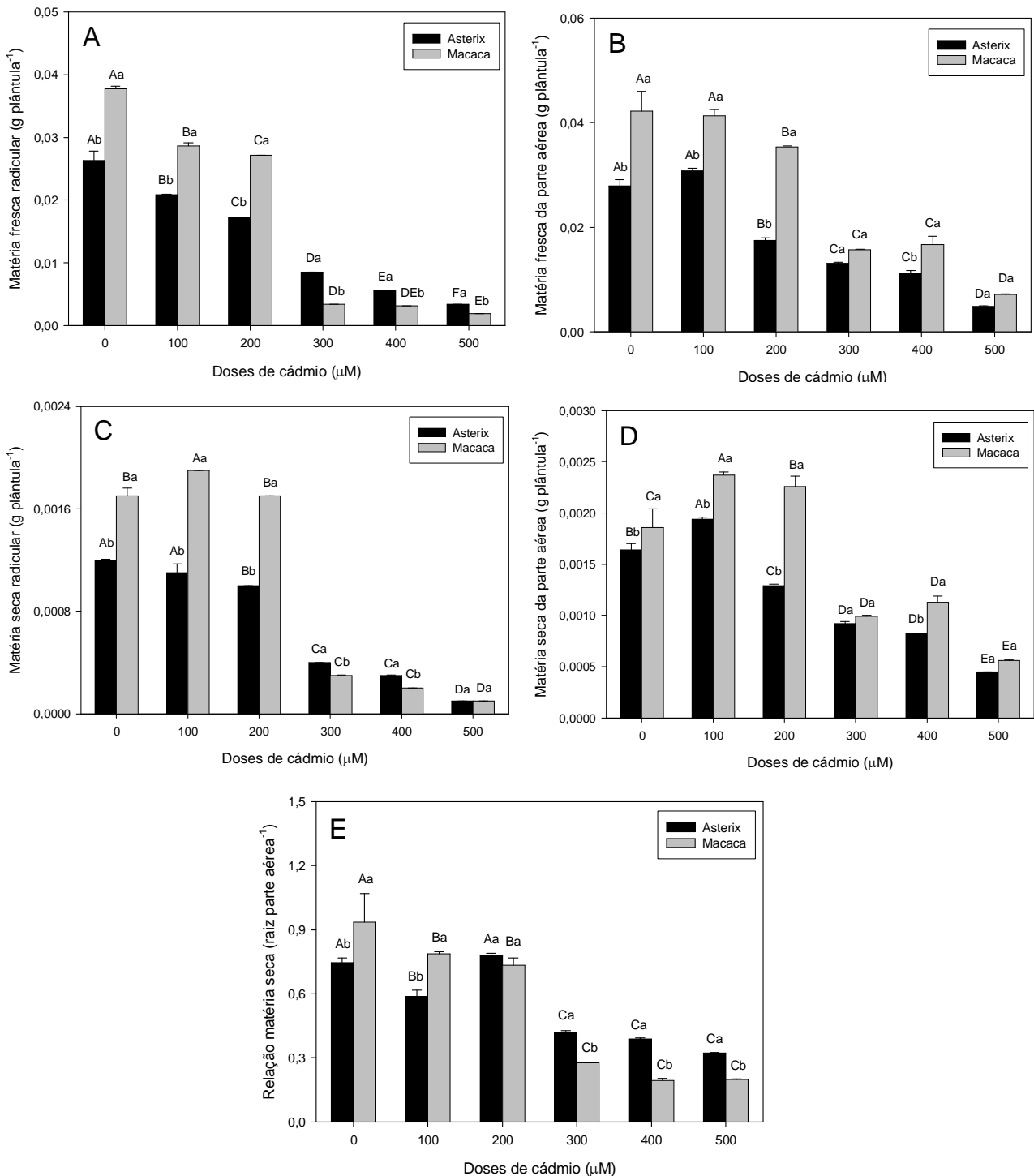


Figura 2 - Matéria fresca da raiz (A) e da parte aérea (B), matéria seca da raiz (C) e da parte aérea (D) e razão entre matérias secas da raiz e da parte aérea (E) aos 22 dias após a inoculação (DAI) das plântulas de batata, cultivares Asterix e Macaca, submetidas a cinco doses de cádmio no meio de cultura. Médias  $\pm$  desvio padrão da média. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre as doses de cádmio para a mesma cultivar de batata ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre as cultivares de batata para a mesma dose de cádmio ( $P < 0,05$ ).

Os sintomas tóxicos observados nas plantas cultivadas na presença de doses elevadas de metais pesados podem ser devido a uma variedade de interações em nível celular (HALL, 2002). A toxicidade pode resultar tanto da interferência do metal na síntese protéica quanto à ligação desses metais aos grupos sulfidrilas nas proteínas, afetando a estrutura e, conseqüentemente, a atividade catalítica (STIBOROVA et al., 1987; VAN ASSCHE & CLIJTERS, 1990), pelo fato das enzimas serem um dos principais alvos dos metais pesados. A interação entre os grupos ligantes das enzimas e os metais define sua toxicidade, e a inibição enzimática pode ser devido ao mascaramento dos grupos cataliticamente ativos ou à desnaturação protéica (DAS et al., 1997).

O excesso de metais pesados também pode estimular a formação de espécies reativas de oxigênio, que são produtos normais de várias rotas metabólicas que são realizadas em diferentes compartimentos celulares (BENAVIDES et al., 2005). Entretanto, sob condições de estresse, a formação pode exceder a capacidade celular antioxidante, gerando assim uma situação de estresse oxidativo por reagirem com várias biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (BENAVIDES et al., 2005). Um dos efeitos mais danosos das espécies reativas de oxigênio nas células é a peroxidação lipídica da membrana plasmática, afetando a permeabilidade dessa estrutura e, conseqüentemente, conduzindo a uma redução no conteúdo de água das plantas (BARCELÓ et al., 1986).

A ocorrência desses sintomas no crescimento vegetal pode estar relacionada com a deficiência múltipla de vários nutrientes essenciais à formação, multiplicação e funcionamento de cloroplastos e ao efeito fitotóxico do Cd na extensibilidade ou síntese de material de parede celular (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 1992; BRECKLE & KAHLE, 1992). Além disso, o cádmio pode afetar vários processos ligados à fotossíntese, tais como biossíntese de clorofila, atividade dos fotossistemas e transporte de elétrons (STOBART, 1985; MURTHY et al., 1990).



## CONCLUSÃO

O aumento das doses de Cd no meio de cultivo afeta o crescimento *in vitro* das plântulas das cvs. Asterix e Macaca, indicando que ambas as cultivares de batata são sensíveis a esse metal. Entretanto, a cv. Asterix apresenta menor sensibilidade ao Cd em relação à cv. Macaca.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido.

## REFERÊNCIAS

- BARAZANI, O. et al. Cadmium accumulation in *Allium schoenoprasum* L. grown in an aqueous medium. **Chemosphere**, Geneva, v.57, p.1213-1218, 2004.
- BARCELÓ, J. et al. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v.125, p.17-25, 1986.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, Ch. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, Madri, v.2, p.345-361, 1992.
- BENAVIDES, M.P. et al. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Viçosa, v.17, n.1, p.21-34, 2005.
- BEYERSMANN, D. Effects of carcinogenic metals on gene expression. **Toxicology Letters**, Pullman, v.127, p.63-68, 2002.
- BRECKLE, S.W.; KAHLE, H. Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth in mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). **Vegetatio**, Bangor, v.101, p.43-53, 1992.

- CALABRESE, E.J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Raleigh, v.202, p.289–301, 2005.
- CAMPOS, M.L. et al. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.4, p.361-367, 2005.
- DANTAS, A.C.M. et al. Tolerância ao alumínio em porta-enxertos somaclonais de macieira cultivados em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.4, p.615-623, 2001.
- DAS, P. et al. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Massachusetts, v.98, p.29-36, 1997.
- DEGRAEVE, N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. **Mutation Research**, Cincinnati, v.86, p.115-135, 1981.
- DRAZKIEWICZ, M.; BASZYNSKI, T. Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v.162, p.1013-1021, 2005.
- DUNBAR, K.R. et al. The uptake and partitioning of cadmium in two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.381, p.349-354, 2003.
- EMBRAPA. **Ambiente de software NTIA**, versão 4.2.2: manual usuário. Campinas: Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura, 1997. 258p.
- FAO. **Agricultural Statistics**. Rome. Capturado em 02 jul. 2007. Online. Disponível na Internet: <http://www.fao.org/statistics>.
- HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, p.1-11, 2002.
- HIRANO, Y.; HIJII, N. Effects of low pH and aluminum on root morphology of Japanese red cedar saplings. **Environmental Pollution**, Massachusetts, v.101, p.339-347, 1998.

- IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola, confronto das safras de 2006 e das estimativas para 2007.** Capturado em 02 jul. 2007. Online. Disponível na Internet: <http://www.ibge.gov.br>.
- KENNEDY, C.D.; GONSALVES, F.A.N. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, cooper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup> efflux of excised roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.38, p.800-817, 1987.
- LEITA, L. et al. Transpiration dynamics in cadmium-treated soybean (*Glycine max* L.) plants. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Braunschweig, v.175, p.153-156, 1995.
- LIU, C.P. et al. Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensis*. **Biologia Plantarum**, Praga, v.51, n.1, p.116-120, 2007.
- MISHRA, S. et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.44, p.25-37, 2006.
- MORTVEDT, J.J. Cadmium levels in soils and plants from some long-term soil fertility experiments in United States of America. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.16, p.137-142, 1987.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.15, p.473-497, 1962.
- MURTHY, S.D.S. et al. Mercury-induced alterations of chlorophyll a fluorescence kinetics in cyanobacteria: multiple effects of mercury on electron transport. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Debrecen, v.6, p.373-380, 1990.
- OUZOUNIDOU, G. et al. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, Paron, v.32, p.154-160, 1997.
- PAGE, A.L. et al. Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.1, p.288-291, 1972.
- PEREIRA, A.S. et al. Principais cultivares. In: PEREIRA, A.S.; DANIELS, S.J. **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2003. p.143-153.

- SCHÜTZENDÜBEL A., et al. Cadmium induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Urbana, v.127, p.887- 898, 2001.
- SOARES, C.R.F.S. et al. Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.2, p.175-183, 2005.
- STENHOUSE, F. **The 1992 Australian Market Basket Survey**. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1992. 96p.
- STIBOROVÁ, M. et al. Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley and maize seedlings. **Biologia Plantarum**, Praga, v.29, p.453-467, 1987.
- STOBART, A.K. The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.63, p.293-298, 1985.
- TENNANT, D. A test of a modified line intersect method of estimating root length. **Journal of Ecology**, Brighton, v.63, p.995-1001, 1975.
- TIRYAKIOGLU, M. et al. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v.20, p.181-189, 2006.
- VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v.13, p.195-206, 1990.
- WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. **Biologia Plantarum**, Praga, v.49, n.2, p.237-245, 2005.
- ZHANG, H. et al. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). **Journal of Plant Physiology**, Leipzig, v.162, p.977-984, 2005.

## 5.2 MANUSCRITO II

### **CADMIUM AND MINERAL NUTRIENT ACCUMULATION IN POTATO PLANTLETS GROWN UNDER CADMIUM STRESS IN TWO DIFFERENT EXPERIMENTAL CULTURE CONDITIONS**

Artigo em fase final para submissão

**CADMIUM AND MINERAL NUTRIENT ACCUMULATION IN POTATO  
PLANTLETS GROWN UNDER CADMIUM STRESS IN TWO DIFFERENT  
EXPERIMENTAL CULTURE CONDITIONS**

Jamile Fabbrin Gonçalves<sup>1,4</sup>, Fernando Teixeira Nicoloso<sup>1,4\*</sup>, Fabiane Goldschmidt Antes<sup>2,6</sup>, Joseila Maldaner<sup>1,4</sup>, Luciane Belmonte Pereira<sup>2,5</sup>, Luciane Almeri Tabaldi<sup>1,4</sup>, Renata Rauber<sup>1</sup>, Liana Veronica Rossato<sup>1</sup>, Dilson Antônio Bisognin<sup>3,4</sup>, Valderi Luiz Dressler<sup>2,6</sup>, Érico Marlon de Moraes Flores<sup>2,6</sup>

Departamento de Biologia<sup>1</sup>, Química<sup>2</sup> e Fitotecnia<sup>3</sup>, Programa de Pós-Graduação em Agronomia<sup>4</sup>, Bioquímica Toxicológica<sup>5</sup> e Química<sup>6</sup>, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105 -900, Santa Maria, RS, Brasil

**Abstract**

In order to evaluate the effect of cadmium (Cd) toxicity, two potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars, Asterix and Macaca, were cultivated both *in vitro* and in hydroponic experiments under controlled conditions and submitted to increasing levels of Cd (0, 100, 200, 300, 400 and 500  $\mu\text{M}$  *in vitro* and 0, 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{M}$  in hydroponic culture). At 22 and 7 days of exposure to Cd, for the *in vitro* and hydroponic experiment, respectively, the plantlets were separated into roots and shoot, which were analyzed for biomass as well as Cd, and macro (Ca, K and Mg) and micronutrient (Cu, Fe, Mn and Zn) contents. In the hydroponic experiment, there was no reduction in shoot and root dry weight for any Cd level, regardless of the potato cultivar. In contrast, in the *in vitro* experiment, an increase in biomass production was observed at low levels of

Cd, while higher Cd levels caused a marked decrease. Cd content in shoot and roots of both potato cultivars increased with an increasing level of Cd in the hydroponic experiment. In contrast, in the *in vitro* experiment, Cd content increased when compared to the control, but the response was not linear. In the presence of Cd, in general, the macronutrient content in the *in vitro* cultured plantlets decreased in both roots and shoot, regardless of the potato cultivar, with the exception of K and Mg in the shoot of Macaca, which increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd. In contrast, the macronutrient content in the hydroponically grown plantlets was generally not affected by Cd, with the exception of K, which decreased in the shoot of both potato cultivars at 150 and 200  $\mu\text{M}$  Cd. In general, the micronutrient content in the *in vitro* cultured plantlets decreased in both roots and shoot, regardless of the potato cultivar, with the exception of Cu, Fe and Zn in the roots of Macaca, which increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd. In contrast, the micronutrients in the hydroponically grown plantlets were generally not affected by Cd, with the exception of a decrease in Fe content in the roots of Macaca and a decrease in Cu and Mn contents in the shoot and roots, respectively, of both potato cultivars. An element-, cultivar-, organ- and growth medium-dependent response to Cd toxicity was observed in the potato plantlets.

Key words: cadmium toxicity, growth, essential elements, *Solanum tuberosum*.

## 1. Introduction

Cadmium (Cd) pollution in agricultural farmland has become a serious problem in many parts of the world, due to industrial development and the heavy use of chemical fertilizers, pesticides and herbicides, which produce serious threats to human health through the food chain (Liu et al., 2003). There is a concern that consumption of foods

containing relatively high levels of Cd may lead to chronic toxicity (Jackson and Alloway, 1992).

Although plants do not require Cd for growth and reproduction, the bioaccumulation index of Cd in plants is high and may exceed that of many essential elements (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). The effect of the interaction between Cd and essential metals on uptake and distribution in crops is a public concern and may provide clues to explain the nature of Cd accumulation in crops (Liu et al., 2003). These interactions may cause severe nutrient deficiencies that would alter the nutrient balances of plants exposed to Cd, resulting in physiological disorders as well as the reduction of growth and yield, thus affecting their productivity (Zhang et al., 2002).

Many studies have reported that Cd influences the uptake and translocation of nutrients in some crops, such as wheat (Zhang et al., 2002), rice (Wu et al., 2006) and tomato (Dong et al., 2006). However, contradictory results have been found, which may be attributed to species or cultivar differences, interactions between cultivars and metals, and between metals within plant tissues (Liu et al., 2003). Thus, further studies are needed to investigate the interactions between nutrients and contaminants in order to encourage selection for enhanced uptake efficiency of desirable elements and reduction in uptake of undesirable ones (Liu et al., 2003).

Since vegetable foods are the most important source of non-occupational exposure to Cd for humans (Satarug et al., 2003), it is necessary to study Cd accumulation in crops such as potato. Potato plants are exposed to various types of environmental agents, either accidentally, by compounds present in polluted air, soil or water, or deliberately, as in the case of agricultural pesticides and plant growth regulators (Gichner et al., 2008). Moreover, although potato ranks as the most important vegetable in terms of planted area and production in Brazil (Lopes and Buso, 1997), to



our knowledge, no research concerning the effect of Cd on the nutritional status of potato plantlets has been reported.

In this work, the accumulation and distribution of Cd and some essential elements were examined following the treatment of two potato cultivars, Asterix and Macaca, with Cd in both hydroponic and *in vitro* culture systems maintained under controlled conditions.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant materials and growth conditions

Potato plantlets (*Solanum tuberosum* L.) for tissue culture were obtained from the Potato Breeding and Genetics Germplasm Program, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Two potato cultivars widely planted in southern Brazil, Asterix and Macaca, were used in this study. Nodal segments (1.0 cm long) without leaves were micropropagated in MS medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 30 g l<sup>-1</sup> of sucrose, 0.1 g l<sup>-1</sup> of myo-inositol and 6 g l<sup>-1</sup> of agar.

*In vitro* experiment: Nodal segments (1.0 cm long) without leaves from twenty-five-day-old plantlets grown *in vitro* were inoculated in MS medium, supplemented with 30 g l<sup>-1</sup> of sucrose, 0.1 g l<sup>-1</sup> of myo-inositol, 6 g l<sup>-1</sup> of agar, and one of five Cd treatments: 0 (control), 100, 200, 300, 400 and 500 µM. To each cultivation flask (8.0 cm of diameter, 13.0 cm of height and a volume of 653.12 cm<sup>3</sup>) were added 50 ml of MS medium and 10 ml of Cd solution, both of which were adjusted to a pH of 5.50±0.1 and then autoclaved. After 22 days of Cd exposure, 50 plantlets per replicate (each treatment consisted of three replicates) were randomly harvested.

*Hydroponic experiment:* fifteen-day-old plantlets grown *in vitro* were transferred into plastic boxes (10 l) containing polystyrene plates with holes used as a physical support for the plants; the roots were submerged in an aerated full nutrient solution of low ionic strength. The nutrient solution had the following composition ( $\text{mg l}^{-1}$ ): 85.31 N; 7.54 P; 11.54 S; 97.64 Ca; 23.68 Mg; 104.75 K; 176.76 Cl; 0.27 B; 0.05 Mo; 0.01 Ni; 0.13 Zn; 0.03 Cu; 0.11 Mn and 2.68 Fe. Evaporated and transpired water was continuously replaced with distilled water and the nutrient solution was completely renewed every week. The solution pH was adjusted to  $5.50 \pm 0.1$  daily by titration with a 0.1 M solution of HCl or NaOH. After two weeks of plantlet acclimatization, Cd was added to the nutrient solution as  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  at final concentrations of 0 (control), 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{M}$ . Moreover, calculations (based on initial ion concentrations) with software “Visual Minteq” showed that approximately 74% of the nominal Cd concentration should have been in the monomeric form (data not shown). After 7 days of Cd exposure, 24 plantlets per replicate (each treatment consisted of three replicates) were randomly harvested.

Both *in vitro* and *ex vitro* cultured plantlets were grown in a growth chamber at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  on a 16/8 h light/dark cycle with  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of irradiance by cold fluorescent lamps. At the end of the experiments, the plantlets were gently washed with distilled water and then divided into roots and shoot.

The levels of Cd utilized in the present study were above the toxic thresholds of many plants in the environment. However, the hydroponic and *in vitro* culture systems were designed to study basic phytotoxic effects, and not to mimic situations found in agricultural or natural ecosystems (Hernández et al., 1998).

## 2.2. Biomass, Cd and mineral nutrient content determination

The roots and shoot of potato were oven-dried at 65°C to a constant mass for the determination of biomass as well as Cd and macro and micronutrient accumulation. Dried plant tissues (0.01-0.1 g) were ground and digested with 4 ml of concentrated HNO<sub>3</sub>. Sample decomposition was carried out using a heating block *Velp Scientifica* (Milano, Italy). Heating was set at 130°C for two hours. Plastic caps were fitted to the vessels to prevent losses by volatilization. The content of Ca, K, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, and Cd was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) using a PerkinElmer *Optima 4300 DV* (Shelton, USA) equipped with a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer. Cd and macro and micronutrient contents were calculated based on their concentration and potato biomass production.

### 2.3. Statistical analysis

The experiments were carried out in a randomized block design. The analyses of variance were computed for statistically significant differences determined based on the appropriate *F*-tests. The results are the means  $\pm$  S.D. of at least three independent replicates. The mean differences were compared utilizing the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Biomass and Cd content in roots and shoot

Biomass and Cd content in roots and shoot of potato plantlets grown under two different culture systems and supplied with different Cd levels are shown in Table 1.

In the plantlets grown *in vitro*, root dry weight (RDW) in Asterix was reduced at Cd levels exceeding 100  $\mu$ M. In contrast, RDW in Macaca was increased at 100  $\mu$ M Cd, while at the three highest levels of Cd, it was decreased. Macaca presented greater

RDW at 0, 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix, which showed a greater RDW than Macaca at 300 and 400  $\mu\text{M}$  Cd. Shoot dry weight (SDW) in Asterix increased at 100  $\mu\text{M}$  Cd, while at levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ , it was reduced. On the other hand, in Macaca SDW was increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd, while at levels exceeding 200  $\mu\text{M}$ , it was reduced. Moreover, SDW was greater in Macaca than in Asterix at 0, 100, 200, and 400  $\mu\text{M}$  Cd (Table 1).

In the hydroponically grown plantlets, there was no alteration in shoot and root dry weight of either potato cultivar at any level of Cd, and there was no difference observed between the cultivars (Table 1).

In plantlets grown both *in vitro* and hydroponically, root and shoot Cd content of both potato cultivars was higher in Cd-exposed plantlets than in the control (Table 1).

### 3.2. Macronutrient content in the shoot

Figure 1 shows the content of Ca, K and Mg in the shoot of potato plantlets grown under both systems and supplied with different Cd levels.

In the plantlets grown *in vitro*, shoot Ca content in Asterix was reduced at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ . In contrast, it was reduced only at the three highest Cd levels in Macaca. Moreover, shoot Ca content was greater in Macaca than in Asterix at 0, 100, 200 and 400  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 1A). Shoot K content in Asterix showed a continuous decrease with increasing Cd treatments. Conversely, K content in Macaca increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd and decreased at Cd levels exceeding 200  $\mu\text{M}$ . Asterix presented significantly greater K content at 0  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Macaca, while at 100, 200 and 400  $\mu\text{M}$  Cd, Macaca showed greater K content than Asterix (Fig. 1C). Shoot Mg content in Asterix was reduced at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ . In contrast, Mg

Table 1. Effect of increasing Cd level on root dry weight (RDW), shoot dry weight (SDW) and Cd content in shoot and roots of two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cv. Asterix and Macaca) grown in the *in vitro* and hydroponic experiments.

Cd treatment ( $\mu\text{M}$ )	Potato cultivars							
	Asterix				Macaca			
	RDW (g)	SDW (g)	Root Cd content (mg plant <sup>-1</sup> )	Shoot Cd content (mg plant <sup>-1</sup> )	RDW (g)	SDW (g)	Root Cd content (mg plant <sup>-1</sup> )	Shoot Cd content (mg plant <sup>-1</sup> )
<i>In vitro</i> experiment								
0	1.2x10 <sup>-3</sup> Ab	1.6x10 <sup>-3</sup> Bb	0.00Fa	0.00Da	1.7x10 <sup>-3</sup> Ba	1.8x10 <sup>-3</sup> Ba	0.01Fa	0.00Da
100	1.1x10 <sup>-3</sup> Ab	1.9x10 <sup>-3</sup> Ab	1.09Bb	0.40Bb	1.9x10 <sup>-3</sup> Aa	2.4x10 <sup>-3</sup> Aa	1.86Ba	0.52Ba
200	1.0x10 <sup>-3</sup> Bb	1.3x10 <sup>-3</sup> Cb	1.77Ab	0.46ABb	1.7x10 <sup>-3</sup> Ba	2.3x10 <sup>-3</sup> Aa	3.74Aa	1.13Ca
300	0.4x10 <sup>-3</sup> Ca	0.9x10 <sup>-3</sup> Da	1.04Ca	0.51Aa	0.3x10 <sup>-3</sup> Cb	1.0x10 <sup>-3</sup> Ca	1.06Da	0.54Ba
400	0.3x10 <sup>-3</sup> Ca	0.8x10 <sup>-3</sup> Db	0.88Db	0.45ABb	0.2x10 <sup>-3</sup> Cb	1.1x10 <sup>-3</sup> Ca	1.30Ca	0.85Aa
500	0.1x10 <sup>-3</sup> Da	0.4x10 <sup>-3</sup> Ea	0.76Ea	0.28Cb	0.1x10 <sup>-3</sup> Da	0.6x10 <sup>-3</sup> Da	0.79Ea	0.51Ba
Hydroponic experiment								
0	1.3x10 <sup>-3</sup> Aa	8.3x10 <sup>-3</sup> Aa	0.13Da	0.12Da	1.0x10 <sup>-3</sup> Aa	8.5x10 <sup>-3</sup> Aa	0.12Da	0.17Da
50	1.2x10 <sup>-3</sup> Aa	6.7x10 <sup>-3</sup> Aa	2.72Ca	2.21Ca	1.3x10 <sup>-3</sup> Aa	8.2x10 <sup>-3</sup> Aa	3.93Ca	2.87Ca
100	1.3x10 <sup>-3</sup> Aa	7.4x10 <sup>-3</sup> Aa	4.77Ba	5.60Ba	1.2x10 <sup>-3</sup> Aa	8.3x10 <sup>-3</sup> Aa	6.34Ba	5.69Ba
150	1.1x10 <sup>-3</sup> Aa	6.0x10 <sup>-3</sup> Aa	5.31Bb	6.81Ba	1.1x10 <sup>-3</sup> Aa	7.7x10 <sup>-3</sup> Aa	7.12ABa	7.21Ba
200	1.2x10 <sup>-3</sup> Aa	6.6x10 <sup>-3</sup> Aa	8.70Aa	11.67Aa	1.0x10 <sup>-3</sup> Aa	7.1x10 <sup>-3</sup> Aa	8.84Aa	9.21Ab

Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three different replicates. Different capital letters indicate significant differences between Cd levels in the same potato cultivar ( $p < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant differences between potato cultivars at the same Cd level ( $p < 0.05$ ).

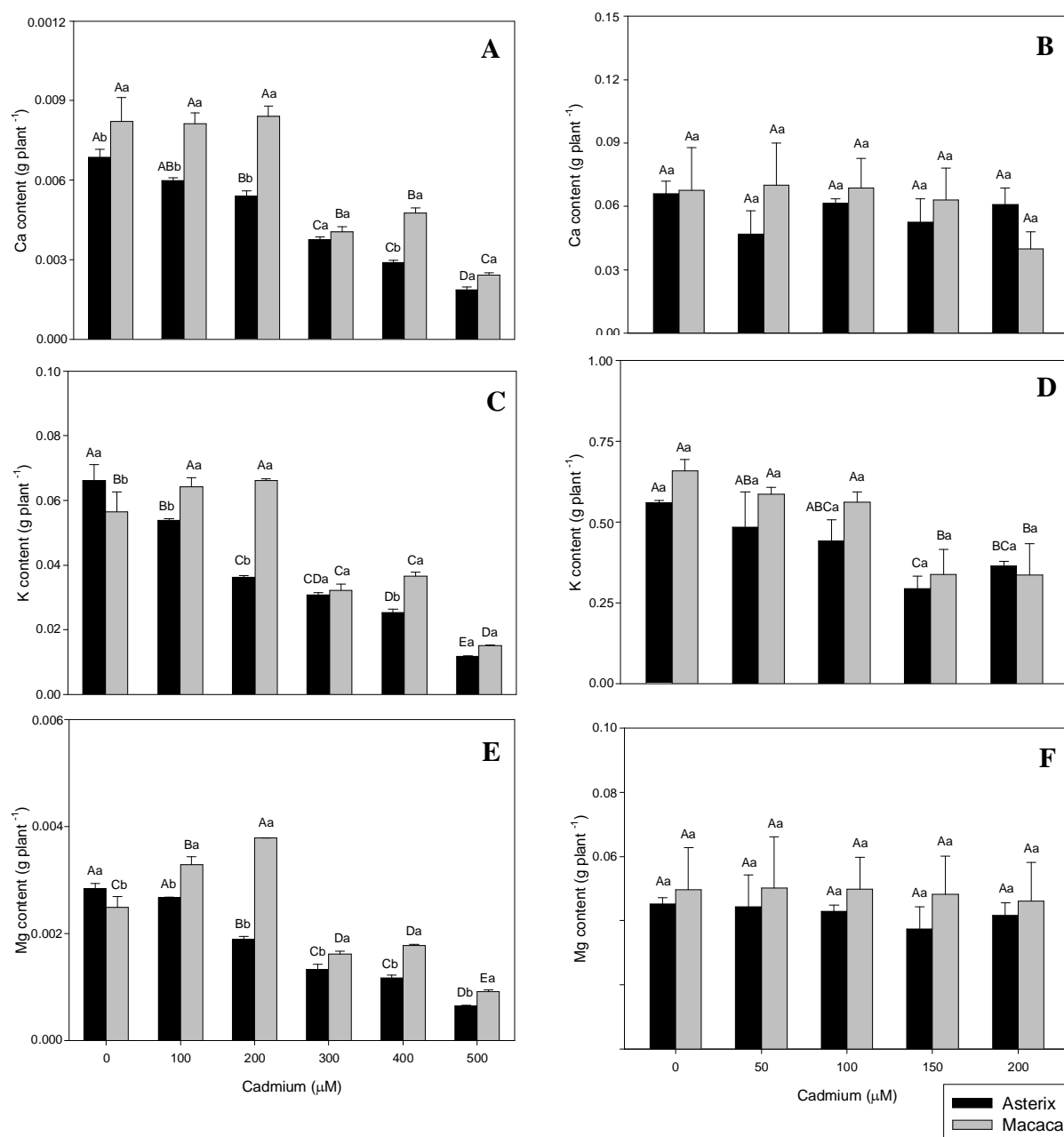


Figure 1. Effect of increasing Cd level on Ca, K and Mg contents in shoot of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, respectively) and in hydroponics (B, D, F, respectively). Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three different replicates. Different capital letters indicate significant differences between Cd levels in the same potato cultivar ( $p < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant differences between potato cultivars at the same Cd level ( $p < 0.05$ ).

content in Macaca increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd and decreased at Cd levels exceeding 200  $\mu\text{M}$ . Asterix presented significantly greater Mg content at 0  $\mu\text{M}$  Cd when

compared with Macaca, while Macaca showed greater Mg content than Asterix at all Cd levels (Fig. 1E).

In the hydroponically grown plantlets, shoot Ca and Mg contents in both potato cultivars were not affected at any level of Cd, and there was no difference observed between the cultivars (Fig. 1B and 1F, respectively). On the other hand, shoot K content in both cultivars was significantly decreased at the two highest Cd levels, yet there was no difference between the two cultivars (Fig. 1D).

### 3.3. Macronutrient content in the roots

Figure 2 shows the content of Ca, K and Mg in the roots of potato plantlets grown under both systems and supplied with different Cd levels.

In the plantlets grown *in vitro*, root Ca content in Asterix showed a continuous decrease with increasing Cd levels. In contrast, Ca content was reduced in Macaca at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ . Macaca presented significantly greater Ca content at 0, 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix, while at 300  $\mu\text{M}$  Cd Asterix showed greater Ca content than Macaca (Fig. 2A). Root K and Mg contents showed a continuous decrease with increasing Cd levels in both potato cultivars. Macaca presented significantly greater K and Mg contents at 0, 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix (Fig. 2C and 2E, respectively).

In the hydroponically grown plantlets, root Ca, K and Mg contents in both potato cultivars were not affected at any Cd level, and there was no difference observed between the cultivars (Fig. 2B, 2D and 2F, respectively).

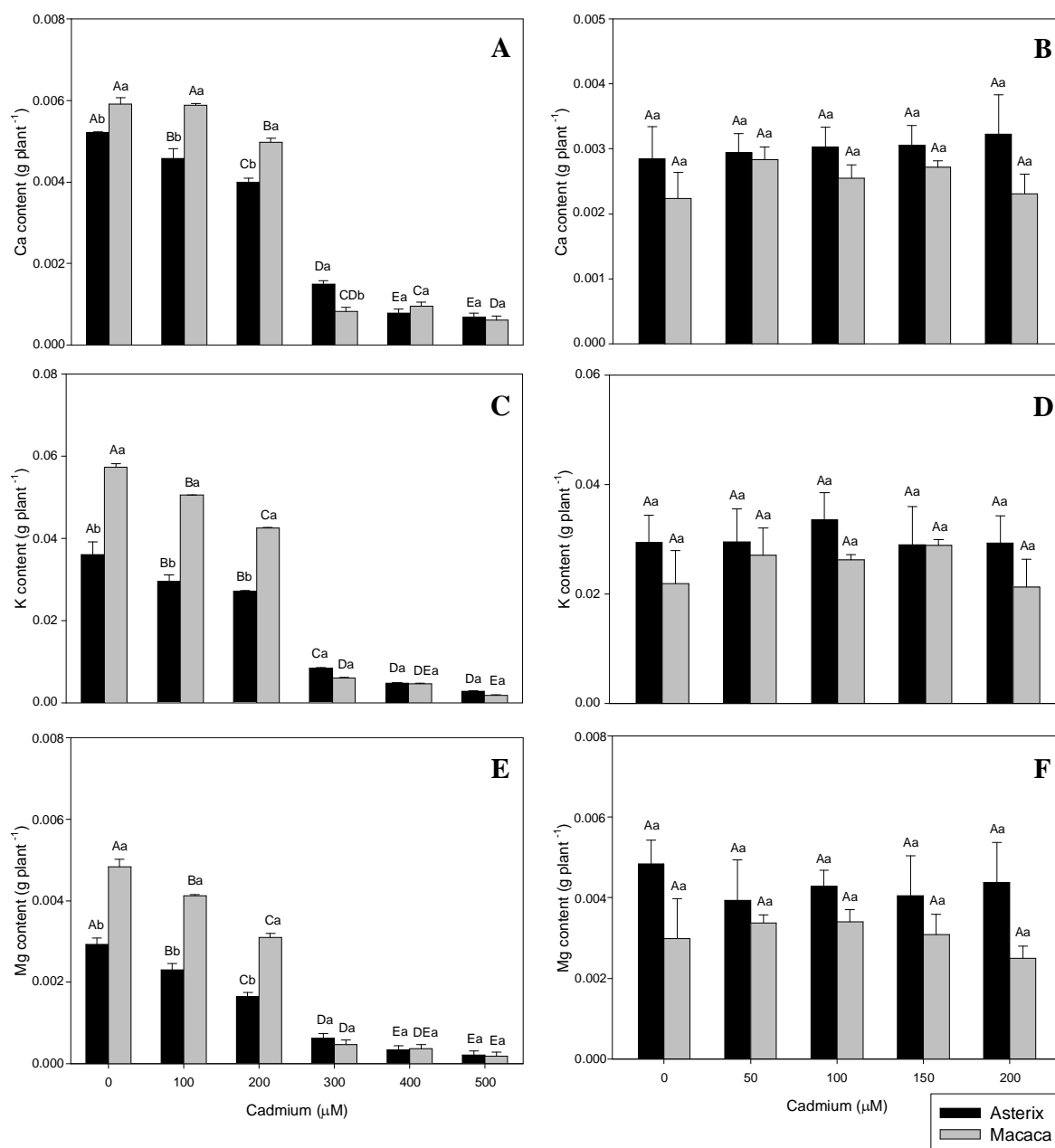


Figure 2. Effect of increasing Cd level on Ca, K and Mg contents in roots of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, respectively) and in hydroponics (B, D, F, respectively). Statistics as in Figure 1.

### 3.4. Micronutrient content in the shoot

Figure 3 shows the content of Cu, Fe, Mn and Zn in the shoot of potato plantlets grown under both systems and supplied with different Cd levels.

In the plantlets grown *in vitro*, shoot Cu content was decreased at all Cd levels in both potato cultivars, and Cu content was greater in Macaca than in Asterix at 100 and



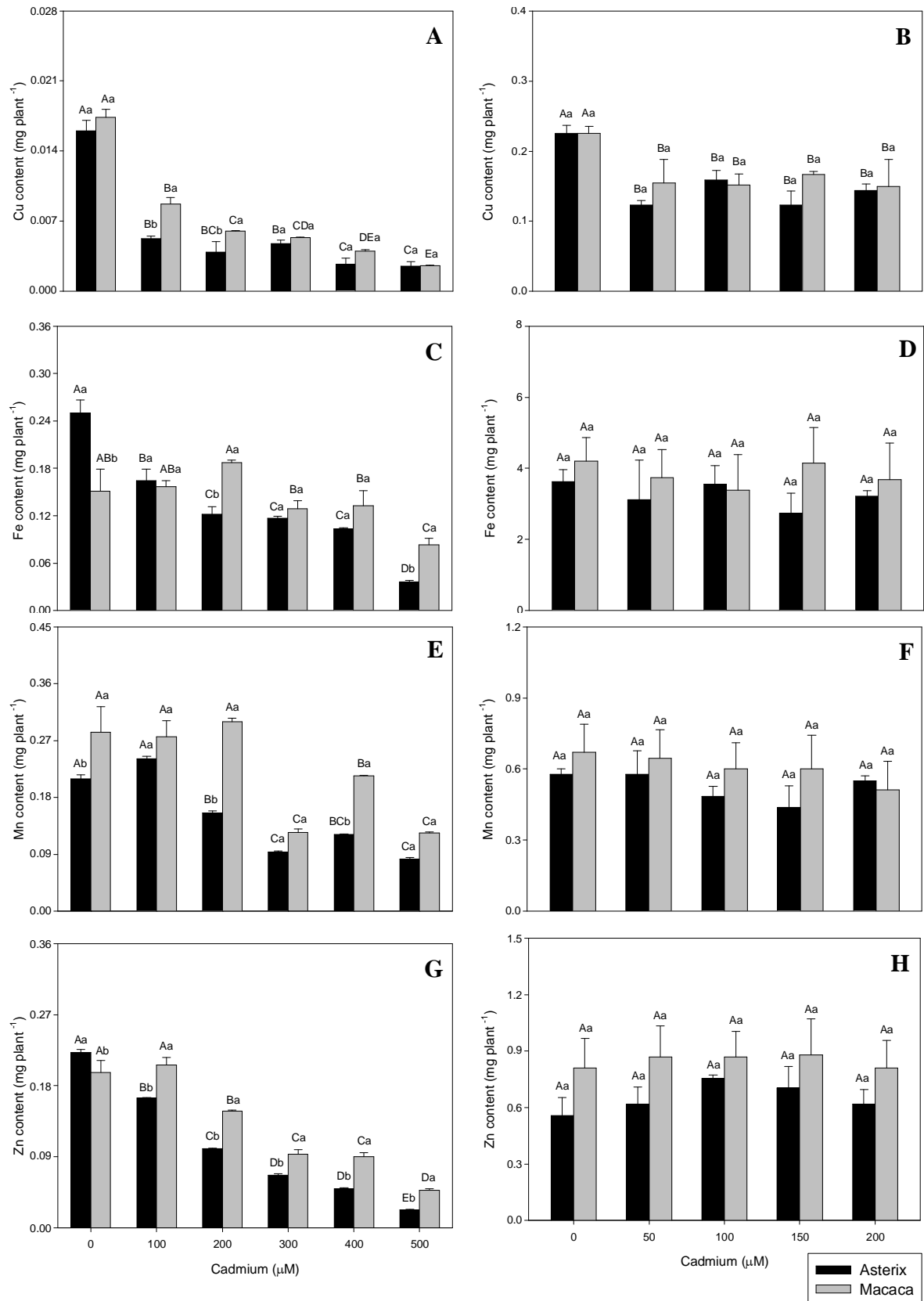


Figure 3. Effect of increasing Cd level on Cu, Fe, Mn and Zn contents in shoot of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, G, respectively) and in hydroponics (B, D, F, H, respectively). Statistics as in Figure 1.

200  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3A). Shoot Fe content in Asterix showed a continuous decrease with increasing Cd treatments. Conversely, in Macaca shoot Fe was reduced only at the highest Cd level. Asterix presented significantly greater Fe content at 0  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Macaca, while at 200 and 500  $\mu\text{M}$  Cd Macaca showed greater Fe content than Asterix (Fig. 3C). Shoot Mn content in Asterix was reduced at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ , while in Macaca shoot Mn content was reduced only at the three highest Cd levels. Moreover, shoot Mn content was greater in Macaca than in Asterix at 0, 200 and 400  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 3E). Shoot Zn content in Asterix showed a continuous decrease with increasing Cd treatments, while in Macaca it decreased at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ . Asterix presented significantly greater Zn content at 0  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Macaca, while at all Cd levels, Macaca showed greater Zn content than Asterix (Fig. 3G).

In the hydroponically grown plantlets, shoot Cu content was decreased at all Cd levels in both potato cultivars, and there was no significant difference observed between both cultivars for each level of Cd (Fig. 3B). On the other hand, shoot Fe, Mn and Zn contents in both potato cultivars were not affected at any Cd levels, nor was there any significant difference observed between both cultivars for each level of Cd (Fig. 3D, 3F and 3H, respectively).

### 3.5. Micronutrient content in the roots

Figure 4 shows the content of Cu, Fe, Mn and Zn in the roots of potato plantlets grown under both systems and supplied with different Cd levels.

In the plantlets grown *in vitro*, root Cu content in Asterix was decreased at all Cd levels. Conversely, Cu content in Macaca increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd and decreased at Cd levels exceeding 200  $\mu\text{M}$ . Macaca presented significantly greater Cu

content at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix, while at 300  $\mu\text{M}$  Cd Asterix showed greater Cu content than Macaca (Fig. 4A). Root Fe content in Asterix was reduced at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$ . On the other hand, Fe content in Macaca increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd and decreased at Cd levels exceeding 200  $\mu\text{M}$ . Moreover, Macaca presented significantly greater Fe content at 0, 100, 200 and 300  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix (Fig. 4C). Root Mn content was decreased at all Cd levels in both potato cultivars, and Macaca presented greater Mn content at 0, 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix (Fig. 4E). Root Zn content in Asterix showed a continuous decrease with increasing Cd levels. Conversely, Zn content in Macaca increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd and decreased at Cd levels exceeding 200  $\mu\text{M}$ . Asterix presented a significantly greater Zn content at 0 and 300  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Macaca, while at 100, 200, 400 and 500  $\mu\text{M}$  Cd, Macaca showed a greater Zn content than Asterix (Fig. 4G).

In the hydroponically grown plantlets, root Cu and Zn contents in both potato cultivars were not affected at any Cd level, nor was there any significant difference observed between both cultivars for each level of Cd (Fig. 4B and 4H, respectively). Root Fe content in Asterix was not affected by increasing Cd levels, but showed a decrease at the highest Cd level in Macaca. Moreover, Macaca presented a significantly greater Fe content at 200  $\mu\text{M}$  Cd when compared with Asterix (Fig. 4D). Root Mn content was decreased at all Cd levels in Asterix, while in Macaca it was reduced only at Cd levels exceeding 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 4F).

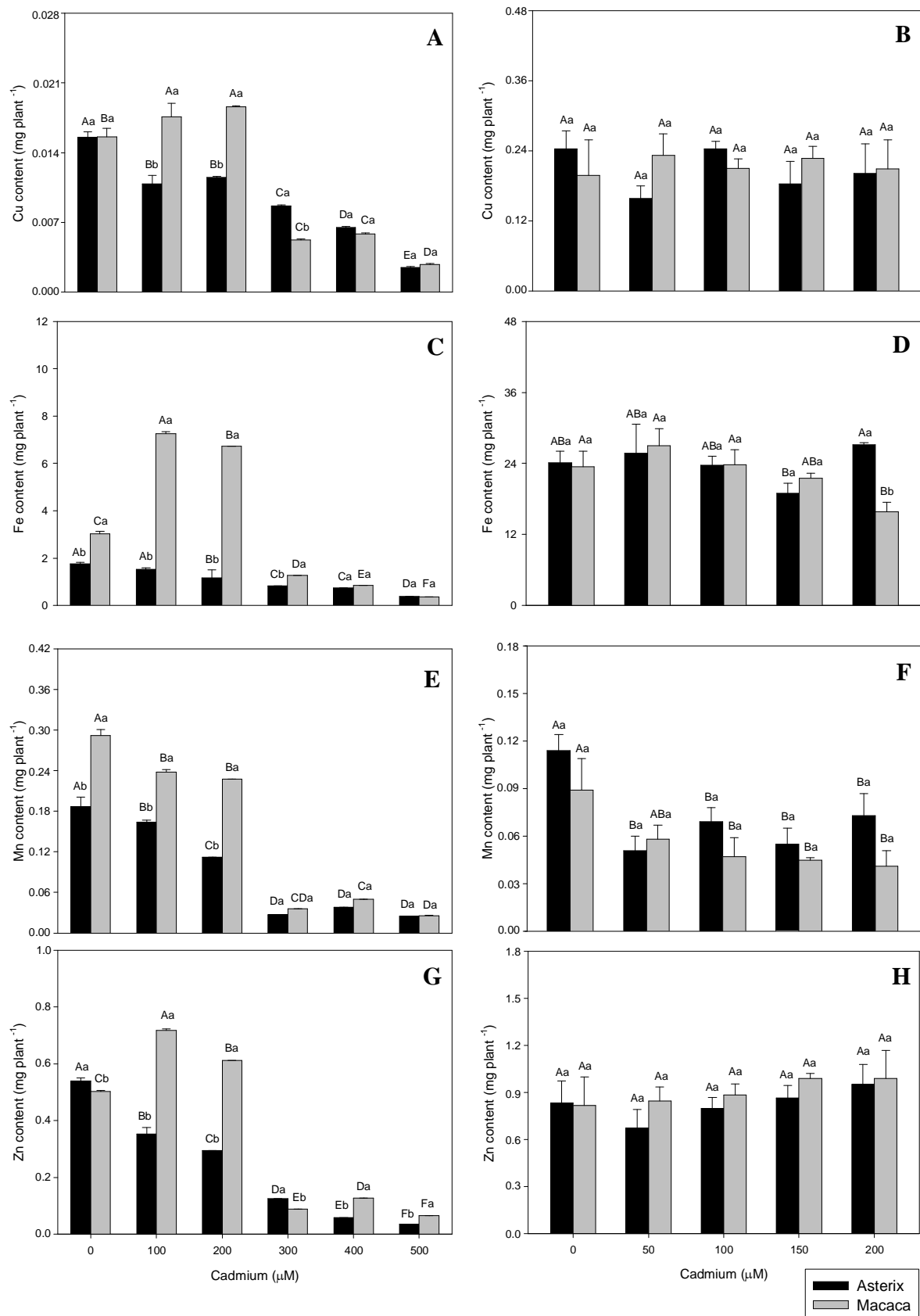


Figure 4. Effect of increasing Cd level on Cu, Fe, Mn and Zn contents in roots of potato plantlets grown *in vitro* (A, C, E, G, respectively) and in hydroponics (B, D, F, H, respectively). Statistics as in Figure 1.

#### 4. Discussion

Optimal plant growth is only achieved after controlling the level of essential minerals (Garcia et al., 2006). Mineral uptake by roots is subject to selective properties of the plasma membrane and Cd may interfere with nutrient uptake by altering plasma membrane permeability, and by affecting element transport processes across the membrane (Gussarsson, 1994; Dong et al., 2006). Cd may also alter the conformation of proteins, for example enzymes, transporters or regulator proteins, due to its strong affinity as ligand to sulfhydryl and carboxylic groups (Van Assche and Clijsters, 1990). However, the mechanisms of nutrient uptake and accumulation associated with growth responses in Cd-treated potato plants are not well understood.

In the present study, hydroponically grown plantlets showed no reduction in shoot and root dry weight at any level of Cd, regardless of the potato cultivar. In contrast, in the plantlets grown *in vitro*, the biomass production either increased at low Cd levels or decreased at higher Cd levels. The stimulating effects of low Cd levels on plant growth have been poorly discussed in the literature. This phenomenon is normally related to an hormetic effect that probably represents an “overcompensation” response to a disruption in the homeostasis of the organism by various chemical substances (Calabrese, 1999). This positive effect could be ascribed to the enhancement of cell division and proliferation caused by low levels of Cd and could be connected to the Cd’s capacity to functionally substitute Zn. This substitution allows Cd to bind to multiple transcription factors in the regulatory regions of genes and also to act as a component of key enzymes involved in replication and translation (Sobkowiak and Deckert, 2003; Aina et al., 2007; Lin et al., 2007). On the other hand, according to Dong et al. (2006), mineral deficiencies/imbances and depression of plant growth would be

a consequence of excessive Cd accumulation that affects the rate of uptake and distribution of certain nutrients in plants.

In hydroponically grown plantlets, Cd content in shoot and roots of both potato cultivars increased with increasing Cd levels. In contrast, in the *in vitro* plantlets, Cd content increased when compared to the control plantlets, but this response was not linear. It was observed that the Cd concentration in potato tissues increased with increasing Cd levels in both the hydroponic and *in vitro* experiments (data not shown). Therefore, the erratic Cd content (calculated based on its concentration and potato biomass production) observed *in vitro* may be due to a biomass enhancement at low Cd levels and a drastic biomass reduction at high Cd levels. Moreover, the quite high Cd content measured in both root and shoot tissues in the hydroponic control plantlets (Table 1) might be related to a direct uptake from the water/tray substrate (Ramos et al. 2002). However, tissue Cd content for the Cd treatments was mostly associated with an increase in the level of Cd in the nutrient solution.

Our results show that in the presence of Cd, in general, the macronutrient (Ca, K and Mg) content in the *in vitro* plantlets decreased in both roots and shoot, regardless of the potato cultivar, with the exception of K and Mg in the shoot of Macaca, which increased at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd. In contrast, the macronutrient content in the hydroponic plantlets was generally not affected by Cd, with the exception of K that decreased in the shoot of both potato cultivars at 150 and 200  $\mu\text{M}$  Cd.

The uptake of polyvalent cations, e.g. Ca and Mg, is readily depressed by the presence of other polyvalent cations such as Cd (Marschner, 2002). Almond (*Prunus dulcis*) seedlings grown hydroponically during 14 days and exposed to Cd treatments ranging from 25 to 150  $\mu\text{M}$  showed reduced Ca, Mg and K concentrations in leaves, while in roots, K and Mg concentrations were decreased only at the highest Cd

concentrations (Nada et al., 2007). Kim et al. (2003) reported that *Pinus silvestris* grown for 11 weeks in soil supplemented with 10 to 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> showed no difference in root Ca, K and Mg concentrations, while a decrease in the stem Ca concentration was found. When sunflower (*Helianthus annuus*) plants were irrigated with 500 mg Cd l<sup>-1</sup> for 40 days in a mixture of soil and vermicompost, no difference was observed in the leaf, stem and root Ca and Mg concentrations, while K concentration increased only in the stem (Garcia et al., 2006). Indian Mustard (*Brassica juncea*) grown for 10 days in soil with Cd treatments ranging from 10 to 190 mg Cd kg<sup>-1</sup> showed that Ca concentrations in shoot and roots increased at lower Cd concentrations, yet decreased at very high Cd concentrations; however, the Mg concentration demonstrated no alteration in the root and increased in the shoot (Jiang et al., 2004). A great reduction in the Mg concentration has been observed in fine roots of *Betula pendula* exposed to 0.2 mg Cd l<sup>-1</sup> (Gussarsson, 1994) and in leaves of *Pinus pinea* and *Fraxinus angustifolia* at 0.6 mg Cd l<sup>-1</sup> (Arduini et al., 1998). Ghnaya et al. (2005) reported a decrease in the K concentration at all Cd levels in the shoot of *Sesuvium portulacastrum*, while in the shoot of *Mesembryanthemum crystallinum* the K concentration was reduced only at the highest Cd levels when grown for 30 days in a culture solution with 50 to 300 µM Cd. A dramatic decrease of K content in the shoot was observed in white lupin (*Lupinus albus*) grown in nutrient solution supplemented with 18 and 45 µM Cd for 35 days (Zornoza et al., 2002). Conversely, Japanese mustard spinach (*Brassica rapa*) grown for 10 days in hydroponics at 2.5 µmol Cd l<sup>-1</sup> showed an increased concentration of K in the shoot (Kashem and Kawai, 2007).

In the present study, Cd generally decreased micronutrient (Cu, Fe, Mn and Zn) contents in both roots and shoot *in vitro*, regardless of the potato cultivar, with the exception of Cu, Fe and Zn in the roots of Macaca, which increased at 100 and 200 µM

Cd. In contrast, the macronutrient content was generally not affected by Cd in the hydroponically grown plantlets, with the exception of a decrease in Fe content in the root of Macaca, and a decrease in Cu and Mn contents in the shoot and roots of both potato cultivars.

According to Dong et al. (2006), it is well known that many toxic effects of Cd result from its interaction with essential elements, in particular those with the same valence, such as Cu, Fe, Mn and Zn. A hydroponic experiment conducted by Wu et al. (2004) showed that in cotton (*Gossypium hirsutum*), 1 and 10  $\mu\text{M}$  Cd lowered the Zn, Cu, and Fe concentrations in aboveground vegetative organs, while increased these concentrations in the root, implying that the translocation of these elements from roots to shoot was prevented by Cd treatments. In contrast, Liu et al. (2003) showed that there were positive correlations between Cd and Fe, Cd and Zn, Cd and Cu in both roots and leaves, implying that some synergistic interactions occurred in the absorption and translocation of Cd and these elements. According to Ramos et al. (2002) in lettuce (*Lactuca sativa*) plants grown for 16 days in the presence of 0.1 and 1 mg Cd  $\text{l}^{-1}$  in nutrient solution there were no alterations in Mn, Fe, Zn and Cu concentrations in roots, while in the shoot, Fe, Zn and Cu concentrations were decreased by Cd and the Mn concentration was increased. Significant negative correlations were reported between Zn, Cu, and Mn concentrations and Cd levels in different organs of barley plants, suggesting the possibility of alleviating Cd accumulation through application of these micronutrients in Cd-contaminated environments (Wu et al., 2003). Jalil et al. (1994) reported that 0.5  $\mu\text{M}$  Cd decreased the concentration of Zn and Mn in roots and shoot of *Triticum turgidum*, while Fe and Cu concentrations in shoot and roots were not affected. There was competition between Cd and Zn ions at absorption sites in the roots of Brazilian corn (*Zea mays*) grown in nutrient solutions with 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 mg Cd



$I^{-1}$  for a ten day period (Nascimento et al., 1998). Zn concentrations in *Brassica chinensis* increased at  $0.1 \mu\text{g Cd ml}^{-1}$  but decreased at higher Cd levels, while Fe concentrations in the plants rose with increasing levels of Cd (Wong et al., 1984). According to Wu et al. (2006) Zn concentrations of rice genotypes increased with Cd levels up to  $0.1 \text{ mM}$  for the shoot and  $0.5 \text{ mM}$  for roots, while at Cd levels exceeding these levels, Zn concentrations were reduced; Fe concentrations increased up to  $0.1 \text{ mM}$  Cd in both shoot and roots, while higher Cd levels resulted in a sharp decrease of Fe. A strong reduction in the concentrations of Fe, Mn, and Zn in the shoot of Cd-treated white lupin was also observed (Zornoza et al., 2002). Zn concentrations were increased in both shoot and roots, while Fe and Mn concentrations in the shoot were decreased in Japanese mustard spinach exposed to Cd (Kashem and Kawai, 2007). Fe concentrations were strongly reduced in leaves and roots of almond seedlings (Nada et al., 2007).

Moreover, in the present study, the tissue contents of Mn and Cu in potato plantlets were the most dramatically affected among all of the cationic micronutrients analyzed. This result agrees with results found by other researchers in several plant species treated by Cd (Yang et al., 1996; Hernández et al., 1998).

Interestingly, our results demonstrated that an increase in the content of mineral nutrients was only observed in the *in vitro* plantlets for K and Mg in the shoot and for Cu, Fe and Zn in the roots of *Macaca* at the lowest Cd levels. According to Kennedy and Gonsalves (1987) low Cd levels hyperpolarize the plasma membranes at the root surface, thus increasing the trans-membrane potential, which is an energy source for cation uptake. This may be a possible mechanism to explain the positive effect of Cd exposure on plant growth (Arduini et al., 2004).

It has been suggested that the contents of polyvalent cations are affected by the presence of Cd through antagonistic processes mediated either by competition for

binding sites or transporters (Gussarson et al., 1996). In fact, recently some metal transporters belonging to the Nramp (natural resistance-associated macrophage protein) and ZIP (zinc-regulated transporter/iron-regulated transporter-related protein) families have been identified as able to transport Fe, Zn, Mn as well as Cd (Guerinot, 2000; Pittman et al., 2005). Lasat et al. (2000) cloned and screened genes of the Zn transporter-ZNT1 and proved that ZNT1 enhanced the translocation of Cd in plants. Moreover, IRT1 (gene encoding a high affinity  $\text{Fe}^{2+}$  transporter) expression was induced in pea (*Pisum sativum*) seedlings under Fe deficiency, which could facilitate the transport of heavy-metal divalent cations such as Cd and Zn, in addition to Fe (Cohen et al., 1998). Cd has been also shown to inhibit Fe uptake by IRT1 possibly by competition as a substrate (Eide et al., 1996). In addition, plant LCT1 was demonstrated to mediate the uptake of both Ca and Cd in yeast (Clemens et al., 1998). Kim et al. (2002) reported that Ca and Mg inhibited the transport of Pb and Cd into roots of rice plants, which suggests that heavy metals may enter the root cells via transporters of Ca and Mg. Therefore, competition or mutual interference with such transporters may constitute the basis of the interactions between Cd and mineral nutrients in plants.

In the present study, it was observed a clear difference in relation to the mineral nutrient contents of the Cd-exposed potato plantlets when grown in two distinct culture systems, *in vitro* and *ex vitro*. In fact, differences between these two environments and their effect on plants have been recognized in numerous studies (Pospíšilová et al., 1999; Hazarika, 2003). In the *in vitro* environment, explants are enclosed in a non-ventilated vessel and are developed on a medium containing ample sugar and nutrients to allow for heterotrophic plantlet growth, low gas exchange, ethylene production and an atmosphere with high level of humidity (Hazarika, 2003). On the other hand, a reduction in relative humidity in *ex vitro* culture system either leads to increase in plant

transpiration with associated development of functional stomata, cuticle and epicuticular waxes for controlling plant water loss or may enhance the uptake and translocation of mineral elements in the xylem (Marschner, 2002).

Taken together, the data of the present study showed that the effects of Cd on mineral nutrient content are still difficult to evaluate because they frequently show conflicting results. These contradictory results are presumably due to differences in the culture methods, species, age of the plants, as well as growth conditions, including physical support of the plants, Cd and mineral nutrients levels in the medium, growth period and temperature (Ramos et al., 2002; Dong et al., 2006). In conclusion, in the present study it was observed that Cd caused a hormetic effect in the *in vitro* grown plantlets and that the influence of Cd on nutrient content in potato varied according to the level of Cd, potato cultivar, plant organ, essential element, growth medium and period. Based on these results, excessive Cd accumulation may affect the uptake and distribution of certain nutrients in the potato cultivars, and consequently may be responsible for mineral disturbances and depression of plantlet growth. Thus, further studies at the molecular level are needed to clarify the mechanisms involved between mineral nutrition and Cd uptake and would also provide more information for selecting plants that are tolerant to toxic ions contained in the soil.

## References

- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ. Exp. Bot.* 59, 381–392.

- Arduini, I., Godbold, D.L., Onnis, A., Stefani, A., 1998. Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. *Chemosphere* 36, 739–744.
- Arduini, I., Masoni, A., Mariotti, M., Ercoli, L., 2004. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. *Environ. Exp. Bot.* 52, 89-100.
- Calabrese, E.J., 1999. Evidence that hormesis represents an “overcompensation” response to a disruption in homeostasis. *Ecotox. Environ. Saf.* 42, 135-137
- Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Plant Biol.* 95, 12043-12048.
- Cohen, C.K., Fox, I.C., Garevin, D.F., Kochian, L.V., 1998. The role of iron deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116, 1063–1072.
- Dong, J., Wu, Fei-bo, Zhang, G., 2006 Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64, 1659-1666.
- Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L., 1996. A novel iron regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5624–5628.
- Garcia, J.S., Gratão, P.L., Azevedo, R.A., Arruda, M.A.Z., 2006. Metal contamination effects on sunflower (*Helianthus annuus* L.) growth and protein expression in leaves during development. *J. Agricult. Food Chem.* 54, 8623-8630.
- Ghnaya, T., Nouairi, I., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Abdelly, C., Ghorbel, M.H., 2005. Cadmium effect on growth and mineral nutrition of two halophytes:

- Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. J. Plant Physiol. 162, 1133-1140.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Znidar, I., Mukherjee, A., 2008. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and  $\gamma$ -rays. Environ. Exp. Bot. 62, 113-119.
- Guerinot, M.L., 2000. The ZIP family of metal transporters. Biochim. Biophys. Acta 1465, 190-198.
- Gussarsson, M., 1994. Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: The significance of fine roots as a primary target for cadmium toxicity. J. Plant Nutr. 17, 2151–2163.
- Gussarson, M., Asp, H., Adalsteinsson, S., Jensen, P., 1996. Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO). J Exp. Bot. 47, 211–215.
- Hazarica, B.N., 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. Current Science 85, 1704-1712.
- Hernández, L.E., Lozano-Rodríguez, E., Gárate, A., Carpena-Ruiz, R., 1998. Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. Plant Sci. 132, 139-151.
- Jackson, A.P., Alloway, B.J., 1992. The transfer of cadmium from agricultural soil to the human food chain. In: Adriano, D.C. (Ed.), Biogeochemistry of Trace Metals. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 109-158.
- Jalil, A., Selle, F., Clarke, J.M., 1994. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. J. Plant Nutr. 17, 1839-1858.

- Jiang, X.J., Luo, Y.M., Liu, Q., Liu, S.L., Zhao, Q.G., 2004. Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. *Environ. Geochem. Health* 26, 319-324.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 148.
- Kashem, A., Kawai, S., 2007. Alleviation of cadmium phytotoxicity by magnesium in Japanese mustard spinach. *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 246–251.
- Kennedy, C.D., Gonsalves, F.A.N., 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H<sup>+</sup> efflux of excised roots. *J. Exp. Bot.* 38, 800-817.
- Kim, C.-G., Bell, J.N.B., Power, S.A., 2003. Effects of soil cadmium on *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Plant Soil.* 257, 443-449.
- Kim, Y.-Y., Yang, Y.-Y., Lee, Y., 2002. Pb and Cd uptake in rice roots. *Physiologia Plantarum.* 116, 368-372.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 2000. Molecular physiology of zinc transport in the hyper-accumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 51, 71-79.
- Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., Yin, D., 2007. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69, 89-98.
- Liu, J., Li, K., Xu, J., Liang, J., Lu, X., Yang, J., Zhu, Q., 2003. Interaction of Cd and five mineral nutrients for uptake and accumulation in different rice cultivars and genotypes. *Field Crops Res.* 83, 271-281.
- Lopes, C.A., Buso, J.A., 1997. Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.). Embrapa Hortaliças, Brasília, 36p.

- Marschner, H., 2002. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, 889p.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15, 473-497.
- Nada, E., Ferjani, B.A., Ali, R., Bechir, B.R., Imed, M., Makki, B., 2007. Cadmium-induced growth inhibition and alteration of biochemical parameters in almond seedlings grown in solution culture. *Acta Physiol. Plant* 29, 57-62.
- Nascimento, C.W.A., Fontes, R.L.F., Neves, J.C.L., 1998. Mineral composition of two Brazilian corn cultivars as a function of cadmium in the nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 21, 2369-2379.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadlecěk, P., Haizel, D., Plzáková, S., 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42, 481-497,
- Pittman J.K., 2005. Managing Manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167, 733-742.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J.J., Gárate, A., 2002. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. *Plant Sci.* 162, 761-767.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P.E.B., Williams, D.J., Moore, M.R., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol. Lett.* 137, 65-83.
- Sobkowiak, R., Deckert, J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 767-772.
- Van Assche, F., Clijsters H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195-206.

- Wong, M.K., Chuah, G.K., Koh, L.L., Ang, K.P., Hew, C.S., 1984. The uptake of cadmium by *Brassica chinensis* and its effect on plant zinc and iron distribution. *Environ. Exp. Bot.* 119, 33-44.
- Wu, Fei-bo, Zhang, G., Yu, J., 2003. Interaction of cadmium and four microelements for uptake and translocation in different barley genotypes. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 34, 2003-2020.
- Wu, Fei-bo, Dong, J., Jia, G.-X., Zheng, S.-J., Zhang, G.-P., 2006. Genotypic difference in the response of seedling growth and Cd toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.). *Agricult. Sci. China* 5, 68-76.
- Wu, H., Wu, Fei-bo, Zhang, G., Bachir, D.M., 2004. Effect of cadmium on uptake and translocation of three microelements in cotton. *J. Plant Nutr.* 27, 2019-2032.
- Yang, X., Baligar, V.C., Martens, D.C., Clark, R.B., 1996. Cadmium effects on the influx and transport of mineral nutrients in plant species. *J. Plant Nutr.* 19:643–656.
- Zhang, G., Fukami, M., Sekimoto, H., 2002. Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. *Field Crops Res.* 77, 93-98.
- Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., Carpena, R., 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 1003-1009.



**5.3 MANUSCRITO III**

**CADMIUM-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN TWO POTATO CULTIVARS**

Artigo submetido à revista

**ENVIRONMENTAL AND EXPERIMENTAL BOTANY**

## CADMIUM-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN TWO POTATO CULTIVARS

Gonçalves, J.F.<sup>1,4</sup>, Nicoloso, F.T.<sup>1,4\*</sup>, Schetinger, M.R.C.<sup>2,5</sup>, Tabaldi, L.A.<sup>1,4</sup>, Cargnelutti, D.<sup>2,5</sup>, Pereira, L.B.<sup>2,5</sup>, Maldaner, J.<sup>1,4</sup>, Becker, A.G.<sup>1</sup>, Rossato, L.V.<sup>1</sup>, Rauber, R.<sup>1</sup>, Bagatini, M.D.<sup>2,5</sup>, Bisognin, D.A.<sup>3,4</sup>,

Departamento de Biologia<sup>1</sup>, de Química<sup>2</sup> e de Fitotecnia<sup>3</sup>, Programa de Pós-Graduação em Agronomia<sup>4</sup> e em Bioquímica Toxicológica<sup>5</sup>, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105 -900, Santa Maria, RS, Brasil

### Abstract

A hydroponic experiment was carried out to characterize the oxidative stress responses of two potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. cvs. Asterix and Macaca) to cadmium (Cd). Plantlets were exposed to five Cd levels (0, 50, 100, 150 and 200  $\mu\text{M}$ ) for 7 days. Cd concentration in both roots and shoot increased with external Cd level. Cd concentration was greater in roots than in shoot, and the two cultivars differed in partitioning of Cd between roots and shoot. Number of sprouts and roots was not affected by Cd in both cultivars, whereas Cd treatment decreased the number of nodal segments, and shoot and roots length only in Asterix. In addition, reduced number of leaves as well as leaves abscission and necrosis for both cultivars at high Cd levels were observed. Chlorophyll content and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity were decreased by Cd for both cultivars, whereas carotenoids content was decreased

only in Macaca. Cd caused lipid peroxidation in roots and shoot of both cultivars. Protein oxidation was only verified at the highest Cd level for both cultivars.  $H_2O_2$  content was increased in roots and shoot of Asterix, and apparently, a compensatory response between roots and shoot of Macaca was observed to Cd level exceeding 50  $\mu M$ . Superoxide dismutase (SOD) activity was inhibited in roots of Asterix at all Cd treatments, whereas in Macaca it was only increased at two highest Cd levels. Shoot SOD activity increased in Asterix and decreased in Macaca at three highest Cd levels. Root catalase (CAT) activity in Asterix decreased at 100 and 150  $\mu M$  Cd, whereas in Macaca it decreased only at 50  $\mu M$ . Shoot CAT activity in Asterix was not affected by Cd, but it was decreased in Macaca at all Cd treatments. Root ascorbic acid (AsA) content in Macaca was not affected by Cd, whereas in shoot it was reduced at 100  $\mu M$  Cd and increased at 200  $\mu M$  Cd. A compensatory response to Cd treatment between roots and shoot of Asterix was observed on AsA content. Cd caused increase in non-protein thiol groups (NPSH) content in roots and shoot of both cultivars. Our results suggest that Cd induces oxidative stress in both potato cultivars and that of the two cultivars, Asterix showed greater sensitivity to Cd levels.

*Keywords:* Antioxidant system, ALA-D, Cd toxicity, Growth, *Solanum tuberosum*, Oxidative stress.

## **1. Introduction**

Contamination of heavy metals such as cadmium (Cd) through human activities has been increased since the last century. In urban areas or agricultural land with a long history of crop production, the concentrations of trace elements, especially heavy metals, in soil can be higher than those found in parent materials (He et al., 2005).

Heavy metal inputs include those from commercial fertilizers, liming materials, and agrochemicals, sewage sludges and others wastes used as soil amendments, irrigation waters and atmospheric deposition (Senesi et al., 1999). Highly polluted soils containing over  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  Cd were reported in China, France and some other countries (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

At very high concentrations in soils, Cd can adversely affect plant growth and also human health after introduction to the food chain (Tiryakioglu et al., 2006). In plants, stomatal opening, transpiration, water balance and nutrient uptake have been reported to be affected by Cd (Barceló and Poschenrieder, 1990; Sanità di Troppi and Gabrielli, 1999). Cd also results in negative effects on photosynthetic enzymes, particularly the enzymes involved in the Calvin cycle and chlorophyll biosynthesis such as the enzyme  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) (Vitória et al., 2001). ALA-D is a metalloenzyme that catalyses the asymmetric condensation of two molecules of ALA ( $\delta$ -aminolevulinic acid) to form porphobilinogen (PBG) (Noriega et al., 2007).

One possible mechanism which elevated concentrations of Cd may damage plant tissues is the stimulation of reactive oxygen species (ROS) production, by imposing oxidative stress (Benavides et al., 2005). ROS include superoxide radicals ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), and hydroxyl radicals ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) which are necessary for the correct functioning of plants, but in elevated concentrations they react with lipids, proteins, pigments, and nucleic acids and cause membrane damage, inactivation of enzymes, thus affecting cell viability (Gratão et al., 2005).

Plants possess several antioxidative defense systems to scavenge ROS in order to protect themselves from the oxidant stress including that caused by heavy metals (Benavides et al., 2005). The antioxidative system falls into two general classes: (1) low

molecular weight antioxidants, which consist of lipid-soluble membrane-associated antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene, and water-soluble reductants such as glutathione and ascorbate and (2) antioxidative enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) (Gratão et al., 2005).

Two main research lines have been followed in studying plants exposed to Cd pollution, namely i) identification and characterization of hyperaccumulating species that are potentially useful for phytoremediation and ii) studies on Cd accumulation and effects in crops of significant economic and alimentary interest (Rascio et al., 2008). Among the latter, potato occupies the fourth place in volume of world production of food crops, being only overcome by the wheat, maize and rice (FAO, 2007). Moreover, of particular concern is the concentration of Cd in the tubers of potatoes which may contribute more than 50% of total human Cd consumption (Stenhouse, 1992).

Genotypic variations in uptake and translocation of Cd in food crops have been observed not only among plant species but also among cultivars within the same species (Dunbar et al., 2003; Liu et al., 2007). Based on these genetic differences, the manipulation of Cd uptake and translocation to plant tissues will provide a long-term effective and economical means in reducing Cd contamination in crops (Liu et al., 2007). However, the differences among potato cultivars to Cd toxicity are poorly understood. The potato cultivars have been shown to differ in their ability to accumulate Cd, although the differences between cultivars are not consistent (Dunbar et al., 2003).

In view of this, the objective of the present study was to contribute to a better understanding of the toxicology of cadmium in potato plantlets. In order to obtain these results, two potato cultivars, Asterix and Macaca, were used to evaluate the effect of

this metal on the enzymatic and non-enzymatic antioxidant system and its relation to pigments content, ALA-D activity, lipid peroxidation and protein oxidation.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant materials and growth conditions

Tissue culture potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets were obtained from the Potato Breeding and Genetics Germplasm Program, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Two potato cultivars, Asterix and Macaca, widely planted in southern Brazil, were used in this study. Explants of 1.0 cm nodal segments without leaves were micropropagated in MS medium (Murashige and Skoog, 1962), supplemented with 30 g l<sup>-1</sup> of sucrose, 0.1 g l<sup>-1</sup> of myo-inositol and 6 g l<sup>-1</sup> of agar.

Fifteen-day-old plantlets from *in vitro* culture were transferred into plastic boxes (10 l) with polystyrene plates with holes that were used as a physical support for the plants; roots were submerged in aerated full nutrient solution of low ionic strength. The nutrient solution had the following composition (mg l<sup>-1</sup>): 85.31 N; 7.54 P; 11.54 S; 97.64 Ca; 23.68 Mg; 104.75 K; 176.76 Cl; 0.27 B; 0.05 Mo; 0.01 Ni; 0.13 Zn; 0.03 Cu; 0.11 Mn and 2.68 Fe. Evaporate and transpired water was continuously replaced with distilled water and the nutrient solution was completely renewed every week. After two weeks of plantlets acclimatization, Cd was added to nutrient solution as cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O) to final concentrations of 0 (control), 50, 100, 150 and 200 μM. The Cd concentration utilized in this study was based from preliminary analyzes on the effect of several Cd concentrations (0-500 μM) on potato plantlets grown *in vitro*.

After 7 days of Cd exposure, 24 plantlets per replicate (each treatment consisted of three replicates) were randomly harvested from hydroponic recipients and potato

plantlets were carefully washed with distilled water and then divided into roots and shoot for growth and biochemical analysis.

### *2.2. Metal determination*

To metal determination plantlets were oven-dried at 65°C to constant mass to determine Cd concentration. Dried plant tissues (0.01-0.1g) were ground and digested only in 2.5 ml HNO<sub>3</sub>. Samples decomposition was made in an open system utilizing a block digester *Velp Scientifica* (Milano, Italy), heated at 130 °C, during two hours. Cd concentration was estimated by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) PerkinElmer *Optima 4300 DV* (Whaltam, USA) equipped with a cyclonic spray chamber and a concentric nebulizer.

### *2.3. Growth analysis*

Growth of potato plantlets was determined by measuring the number of nodal segments, sprouts, roots, and leaves and shoot and root (Tennant, 1975) length.

### *2.4. Carotenoids and chlorophyll contents*

Carotenoids and chlorophyll contents were determined following the method of Hiscox and Israelslam (1979) and estimated with the help of Lichtenthaler's formula (Lichtenthaler, 1987). Briefly, 0.1 g chopped fresh leaves sample was incubated at 65°C in dimethylsulfoxide (DMSO) for 2 h until the tissues were completely extracted. Absorbance of the solution was then measured at 470, 645 and 663 nm in order to determine the contents of carotenoids, chlorophyll a, and chlorophyll b, respectively.

### 2.5. *Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D; E.C. 4.2.1.24) activity*

Potato shoots were homogenized in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0, at a proportion of 1:1 (w/v). The homogenate was centrifuged at 12,000 g at 4°C for 10 min. The supernatant was pre-treated with 0.1% Triton X-100 and 0.5 mM dithiotreitol (DTT). ALA-D activity was assayed as described by Morsch et al. (2002) by measuring the rate of porphobilinogen (PBG) formation. The incubation medium for the assays contained 100 mM Tris-HCl buffer, pH 9.0 and 3.6 mM ALA. Incubation was started by adding 100 µl of the tissue preparation to a final volume of 400 µl and stopped by adding 350 µl of the mixture containing 10% trichloroacetic acid (TCA) and 10 mM HgCl<sub>2</sub>. The product of the reaction was determined with the Ehrlich reagent at 555 nm using a molar absorption coefficient of  $6.1 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Sassa, 1982) for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

### 2.6. *Estimation of lipid peroxidation*

The level of lipid peroxidation products was estimated following the method El-Moshaty et al. (1993) by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Both roots and shoot of potato plantlets were homogenized at 4°C in 20 ml of 0.2 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.5 % Triton X-100 at a proportion of 1:20 (w/v). The homogenate was filtered through two layers of paper and centrifuged for 15 min at 20,000 g. One milliliter of the supernatant fraction was added an equal volume of 20 % (w/v) TCA containing 0.5% (w/v) TBA. The mixture was heated at 95°C for 40 min and then quickly cooled in an ice bath for 15 min. After centrifugation at 10,000 g for 15 min, the absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. A correction of non-specific turbidity was made by subtracting the absorbance value taken at 600 nm.



### 2.7. Protein oxidation

The reaction of carbonyls with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) was used to determine the amount of protein oxidation, as described in Levine et al. (1990). Both root and shoot of potato plantlets were homogenized with 25 mM  $K_2HPO_4$  containing 10 ml  $l^{-1}$  Triton X-100, pH 7.0, at a proportion of 1:5 (w/v). The homogenate was centrifuged at 15,000 g for 30 min at 4°C, the supernatant was used for immediate determination of protein oxidation. After DNPH-reaction, the carbonyl content was calculated by absorbance at 370 nm, using the extinction coefficient for aliphatic hydrazones ( $22\ l\ mmol^{-1}\ cm^{-1}$ ).

### 2.8. Determination of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )

The  $H_2O_2$  content of potato plantlets were determined according to Loreto and Velikova (2001). Approximately 0.1 g of both root and shoot were homogenized at 4°C in 2 ml of 0.1% (w/v) TCA. The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 15 min and 0.5 ml of 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 1 ml of 1M KI. The  $H_2O_2$  content of the supernatant was evaluated by comparing its absorbance at 390 nm with a standard calibration curve.

### 2.9. Superoxide dismutase (SOD; E.C. 1.15.1.1) activity

The activity of superoxide dismutase was assayed according to Misra and Fridovich (1972). About 0.2 g of both root and shoot of potato plantlets were homogenized in 5 ml of 100  $mmol\ l^{-1}$  K-phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1  $mmol\ l^{-1}$  ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), 0.1% (v/v) Triton X-100 and 2%

polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v). The extract was filtered and centrifuged at 22,000 g for 10 min at 4°C, and the supernatant was utilized for assay. The assay mixture consisted of a total volume of 1 ml, containing glycine buffer (pH 10.5), 1 mmol l<sup>-1</sup> epinephrine and enzyme material. Epinephrine was the last component to be added. The adrenochrome formation in the next 4 min was recorded at 480 nm in UV- Vis spectrophotometer. One unit of SOD activity is expressed as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of epinephrine oxidation in the experimental conditions. This method is based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of epinephrine at an alkaline pH. Since the oxidation of epinephrine leads to the production of a pink adrenochrome, the rate of increase of absorbance at 480 nm, which represents the rate of autoxidation of epinephrine, can be conveniently followed. SOD has been found to inhibit this radical-mediated process.

#### *2.10. Catalase (CAT; 1.11.1.6) activity*

Catalase activity were determined from both root and shoot of potato plantlets homogenized in a solution containing 50 mmol l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.0), 10 g l<sup>-1</sup> PVP, 0.2 mmol l<sup>-1</sup> EDTA and 10 ml l<sup>-1</sup> Triton X-100, at a proportion of 1:5 (w/v). The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C. The supernatant was used for determination of catalase activity according to the modified method of Aebi (1984) by monitoring the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by measuring the decrease in absorbance at 240 nm in a reaction mixture with a final volume of 2 ml containing 15 mmol l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mmol l<sup>-1</sup> KPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0) and 30 µL of the extract.

#### *2.11. Ascorbic acid (AsA) and Non- protein thiol groups (NPSH) contents*

Both root and shoot of potato plantlets were homogenized in a solution containing 50 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl and 10 ml l<sup>-1</sup> Triton X-100 (pH 7.5), centrifuged at 6,800 g for 10 min. To the supernatant obtained was added 10% TCA at proportion 1:1 (v/v) followed by centrifugation (6,800 g for 10 min) to remove protein. The supernatant was used to determine AsA and NPSH contents.

AsA determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). An aliquot of the sample (300 µl) was incubated at 37°C in a medium containing 100 µl TCA 13.3%, 100 µl deionized water and 75 µl DNPH. After 3 h, 500 µl of 65% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added and samples were read at 520 nm. A standard curve was constructed using L(+) ascorbic acid.

NPSH content in potato plantlets was measured spectrophotometrically with Ellman's reagent (Ellman, 1959). An aliquot of the sample (400 µl) was added in a medium containing 550 µl 1 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 7.4). Reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mmol l<sup>-1</sup> 5-5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 ml). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of thiol groups in samples.

### *2.12. Protein determination*

In all the enzyme preparations, protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

### *2.13. Statistical analysis*

The experiments were done as randomized design. The analyses of variance were computed on statistically significant differences determined based on the appropriate *F*-tests. The results are the means ± S.D. of at least three independent

replicates containing 24 plantlets of each cultivar. The mean differences were compared utilizing Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Cd concentration, visible toxicity symptoms, and plantlets growth

Cd concentration in both roots and shoot increased with Cd treatments. However, most of the Cd taken up by the plantlets was accumulated in roots (Fig. 1A and 1B). Roots of Macaca had significantly greater Cd concentration than Asterix. In shoot, Asterix had greater Cd concentration at 200  $\mu\text{M}$  Cd level compared with Macaca.

As visible symptoms of toxicity, older leaves of both potato cultivars showed necrosis at two highest Cd levels (150 and 200  $\mu\text{M}$ ). With time, some leaves were abscised. Number of sprouts in both potato cultivars was not affected at all Cd treatments, and did not have any difference between the cultivars at the same Cd level (Fig. 1C). Number of nodal segments in Asterix was reduced at 200  $\mu\text{M}$  Cd, but it was not affected by increasing Cd level in Macaca. Asterix had lower number of nodal segments at two highest Cd levels compared with Macaca (Fig. 1D). Number of leaves in Asterix was reduced upon addition of Cd level exceeding 50  $\mu\text{M}$ . By contrast, number of leaves in Macaca was reduced only at two highest Cd levels. Macaca had significantly greater number of leaves at all Cd treatments than Asterix (Fig. 1E). Shoot length in Macaca was not affected by increasing Cd level, but it showed a decrease at two highest Cd levels in Asterix. Asterix showed lower shoot length at two highest Cd levels compared with Macaca (Fig. 1E). Number of roots in both potato cultivars was not affected at all Cd treatments, however Macaca showed lower number of roots than Asterix at 0, 50 and 200  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 1G). Root length in Macaca was not affected by

increasing Cd level, whereas in Asterix it showed a Cd-dependent decrease. Asterix had significantly greater root length at all Cd treatments compared with Macaca (Fig. 1H).

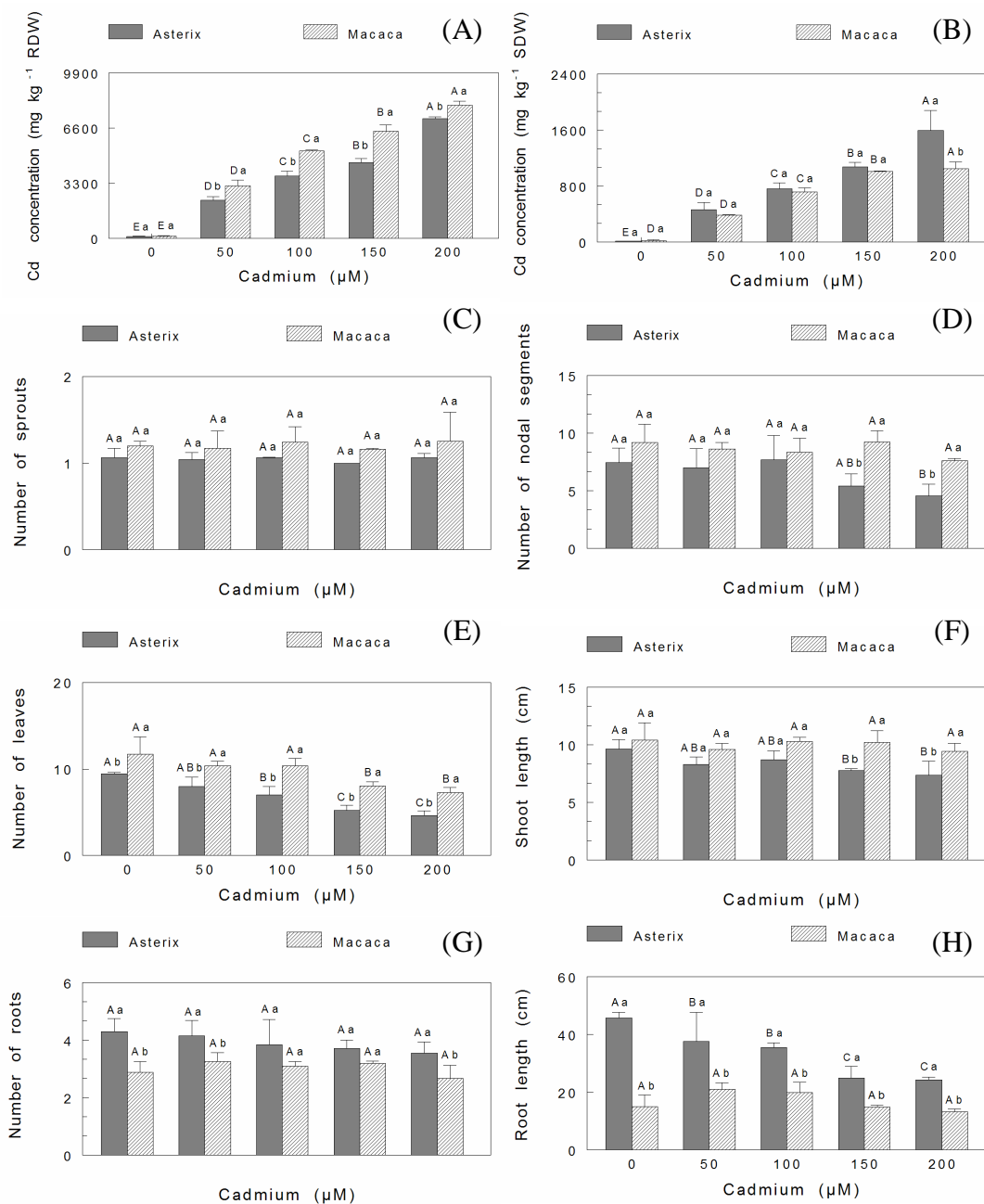


Figure 1. Effect of increasing external Cd concentration on the Cd concentration in roots (A) and in shoot (B), the number of sprouts (C), nodal segments (D), roots (E) and leaves (F), and shoot (G) and root (H) length of two potato cultivars. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three different experiments. Different capital letters indicate significant differences among the Cd concentrations in the same potato cultivar ( $p < 0.05$ ). Different lowercase letters indicate significant differences between potato cultivars in the same Cd concentration ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Photosynthetic pigments and ALA-D activity

Carotenoids content in Asterix was not affected by increasing Cd level, but in Macaca it showed a decrease at two highest Cd levels. Moreover, Macaca had greater carotenoids content at 0 and 50  $\mu\text{M}$  Cd compared with Asterix (Fig. 2A). Total chlorophyll content of both cultivars was significantly decreased at two highest Cd levels, but in Macaca chlorophyll content was greater than in Asterix at 50  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 2B).

ALA-D activity in Asterix showed a continuous inhibition with increasing Cd level, whereas in Macaca it was reduced only upon addition of Cd level exceeding 50  $\mu\text{M}$ . Moreover, Asterix showed greater ALA-D activity than Macaca at 0 and 50  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 2C).

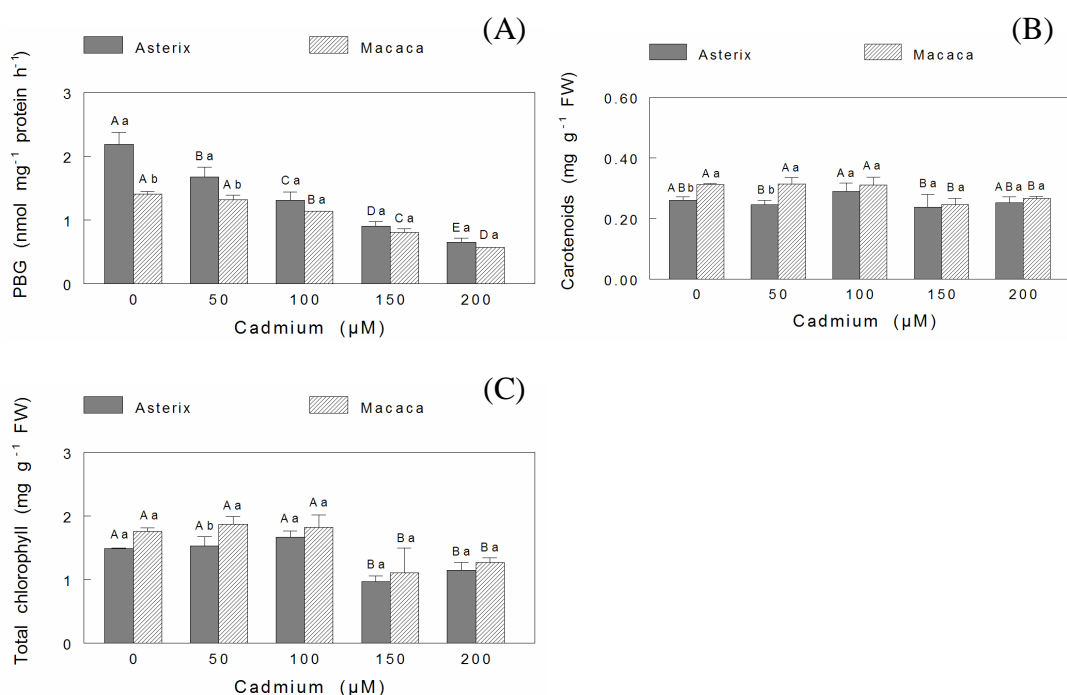


Figure 2. Effect of increasing external Cd concentration on the carotenoids (A) and chlorophyll (B) contents, and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity (C) in leaves of two potato cultivars. FW= fresh weight. Statistics as in Figure 1.

### 3.3. Lipid peroxidation and protein oxidation

The level of lipid peroxidation was measured in terms of MDA accumulation. As shown in Figure 3A, roots MDA content was significantly increased at all Cd treatments in Asterix, whereas in Macaca it increased only at two highest Cd levels. Roots of Asterix had significantly higher MDA accumulation compared with Macaca. Shoot MDA content was significantly increased in Asterix at all Cd treatments, whereas Macaca showed an increase only at three highest Cd levels. Shoot of Macaca had significantly higher MDA accumulation upon addition of Cd level exceeding 50  $\mu\text{M}$  compared with Asterix (Fig. 3B).

The level of protein oxidation was measured in terms of carbonyl accumulation only in shoot. Carbonyl content was significantly increased in shoot of both cultivars only at 200  $\mu\text{M}$  Cd, and at this level Asterix had significantly lower carbonyl accumulation compared with Macaca (Fig. 3C).

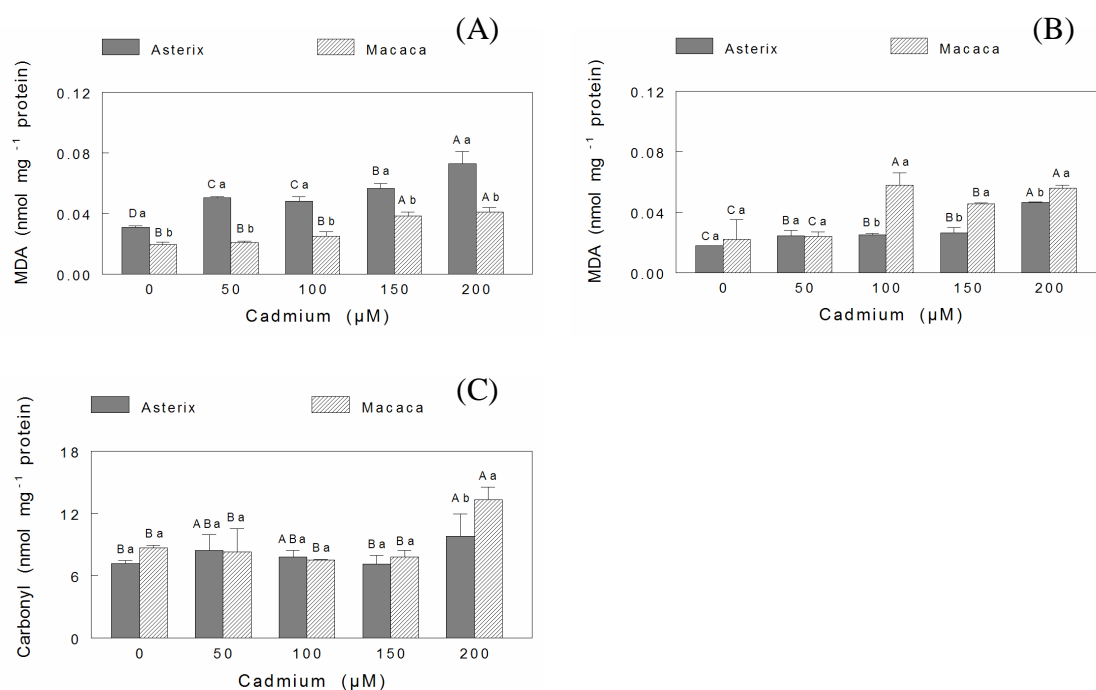


Figure 3. Effect of increasing external Cd concentration on lipid peroxidation in roots (A) and in shoot (B) and protein oxidation in shoot (E) of two potato cultivars. Statistics as in Figure 1.

### 3.4. $H_2O_2$ content and SOD and CAT activities

As shown in Figure 4A, roots  $H_2O_2$  content in Asterix was significantly increased at all Cd treatments. Conversely, roots  $H_2O_2$  content in Macaca increased at 50  $\mu M$  Cd, whereas upon addition of Cd exceeding this level it was reduced compared with control.  $H_2O_2$  content of roots was greater in Macaca than in Asterix at 0 and 50  $\mu M$  Cd, whereas at 100 and 200  $\mu M$  Cd Asterix showed greater  $H_2O_2$  content than Macaca. As shown in Figure 4B, shoot  $H_2O_2$  content in both potato cultivars was increased at three highest Cd levels compared with control, whereas in Macaca it was reduced at 50  $\mu M$  Cd. Moreover, Macaca had greater shoot  $H_2O_2$  content than in Asterix at 0, 150 and 200  $\mu M$  Cd, whereas at 100  $\mu M$  Cd Asterix showed greater  $H_2O_2$  content than Macaca.

SOD activity was significantly inhibited in roots of Asterix at all Cd treatments. By contrast, SOD activity in Macaca increased significantly upon addition of Cd levels exceeding 100  $\mu M$ . The roots of Macaca had significantly lower SOD activity at 0, 50 and 100  $\mu M$  Cd compared with Asterix (Fig. 4C). Shoot SOD activity was significantly activated in Asterix at three highest Cd levels. On the other hand, in Cd treatment ranging from 100 to 200  $\mu M$  Cd shoot SOD activity in Macaca was reduced. At such Cd levels, Asterix had higher SOD activity than Macaca (Fig. 4D).

CAT activity was significantly inhibited in roots of Asterix at 100 and 150  $\mu M$  Cd, whereas in Macaca it showed an inhibition only at 50  $\mu M$  Cd. Roots of Asterix had greater CAT activity at 50  $\mu M$  Cd than Macaca, whereas Macaca showed greater CAT activity at 150  $\mu M$  Cd compared with Asterix (Fig. 4E). Shoot CAT activity in Asterix was slight, but not significantly, reduced at 200  $\mu M$  Cd. On the other hand, shoot CAT activity in Macaca was significantly inhibited at all Cd treatments. Asterix had greater



shoot CAT activity at 50, 100 and 150  $\mu\text{M}$  Cd compared with Macaca, whereas at 0  $\mu\text{M}$  Cd CAT activity was greater in Macaca than Asterix (Fig. 4F).

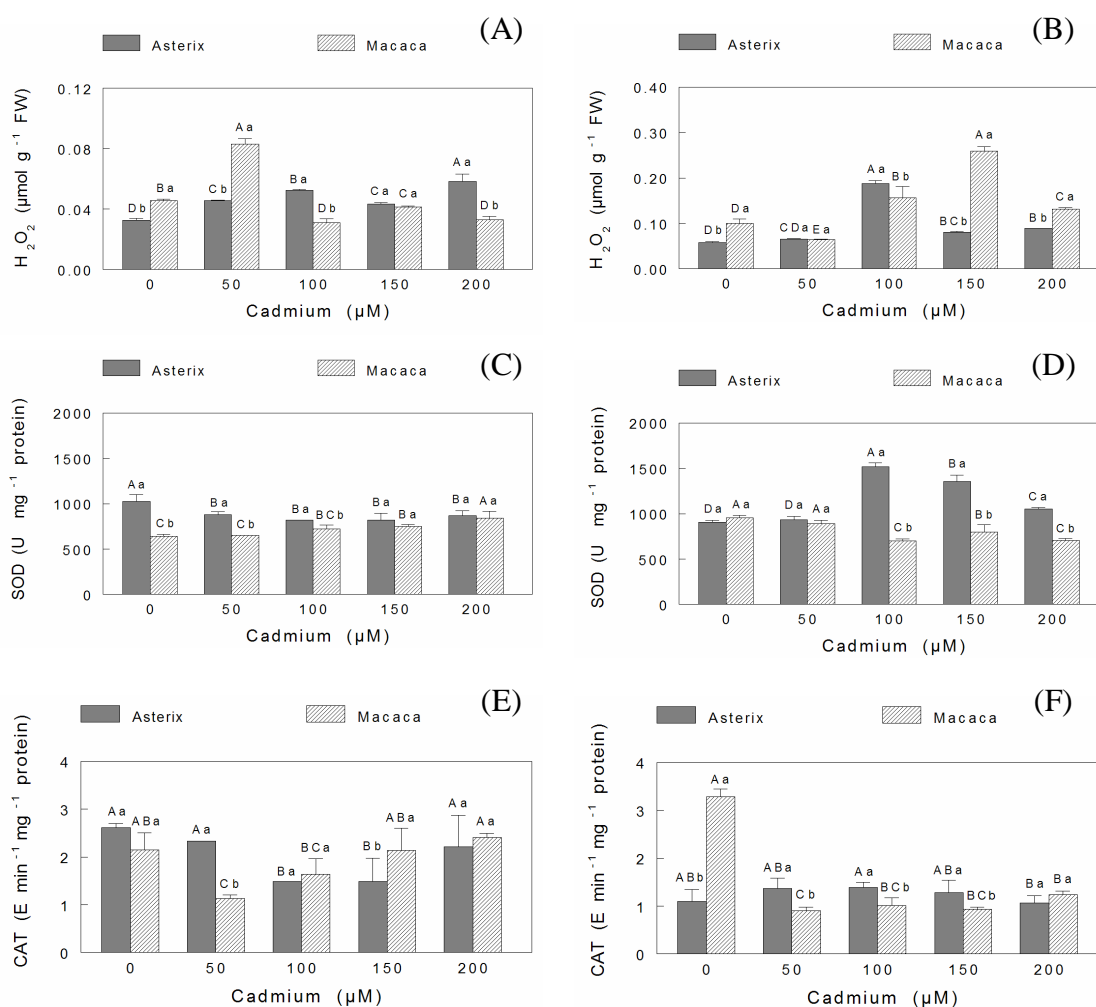


Figure 4. Effect of increasing external Cd concentration on the hydrogen peroxide content and superoxide dismutase and catalase activities in roots (A, C and, E respectively) and, in shoot (B, D and, F respectively) of two potato cultivars. FW= fresh weight. Statistics as in Figure 1.

### 3.5. AsA and NPSH contents

Roots AsA content in Asterix was significantly increased at 150  $\mu\text{M}$  Cd, whereas at 200  $\mu\text{M}$  Cd it was decreased. By contrast, roots AsA content in Macaca was not affected by increasing Cd treatments. Roots of Macaca had lower AsA content at 150  $\mu\text{M}$  Cd compared with Asterix (Fig. 5A). Shoot AsA content in Asterix was

significantly decreased at 150  $\mu\text{M}$  Cd, whereas at 200  $\mu\text{M}$  Cd it was increased. Conversely, shoot AsA content in Macaca was significantly decreased at 100  $\mu\text{M}$  Cd, but it was increased at 200  $\mu\text{M}$  Cd. Shoot of Macaca had lower AsA content at 100  $\mu\text{M}$  Cd compared with Asterix, whereas at 150  $\mu\text{M}$  Cd AsA content was greater in Macaca than Asterix (Fig. 5B).

Roots NPSH content of both cultivars was significantly increased at all Cd treatments. Excepting at 100  $\mu\text{M}$  Cd in the substrate, NPSH content was higher in roots of Macaca than Asterix (Fig. 5C). Shoot NPSH content increased at two highest Cd levels in Asterix, but in Macaca it was increased at three highest Cd levels. Shoot of Macaca had greater NPSH content at 100 and 200  $\mu\text{M}$  Cd compared with Asterix, whereas Asterix had greater NPSH content at 150  $\mu\text{M}$  Cd than Macaca (Fig. 5D).

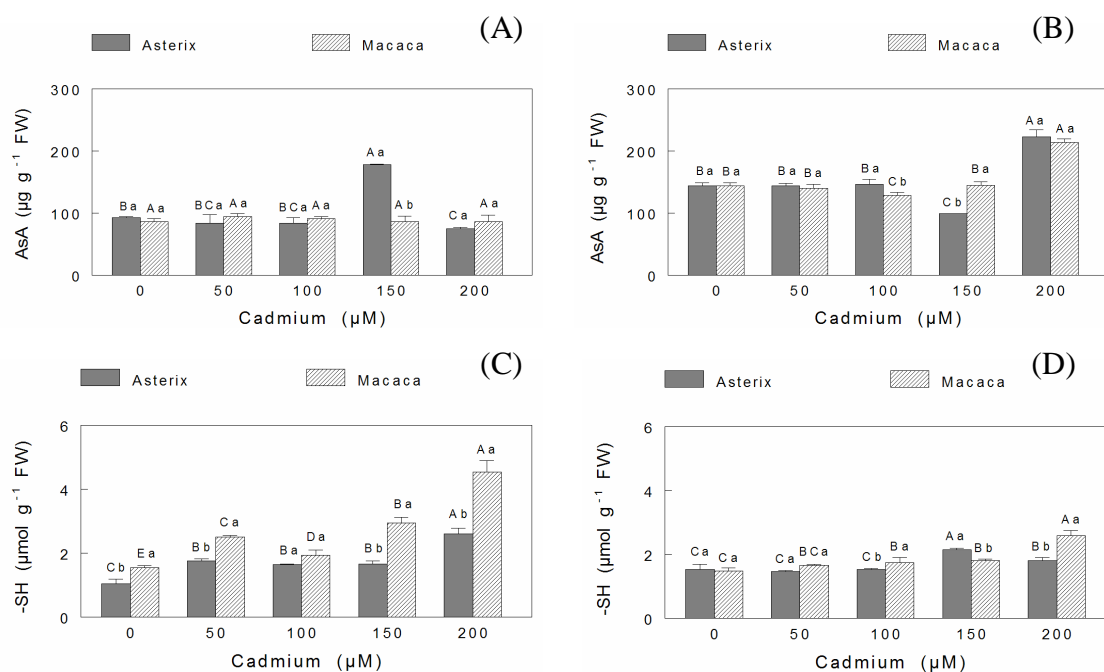


Figure 5. Effect of increasing external Cd concentration on ascorbic acid and non-protein thiol groups contents in root (A and C, respectively) and in shoot (B and D, respectively) of two potato cultivars. FW= fresh weight. Statistics as in Figure 1.

## 4. Discussion

### 4.1. Cd concentration, visible toxicity symptoms, and plantlets growth

In the present study, both potato cultivars showed a continuous increase in the concentration of Cd in roots and shoot with increasing Cd external concentration and accumulated significantly higher Cd concentration in roots. This finding has been reported by other researches working with distinct plant species exposed to varied Cd concentrations (Mishra et al., 2006; Tiryakioglu et al., 2006; Gichner et al., 2008; Rascio et al., 2008). Such metal confinement in the root tissues may be due to an efficient binding and sequestration to the vacuoles by glutathione and phytochelatins, or by immobilization of Cd by cell wall and extracellular carbohydrates (Mishra et al., 2006 and references herein). This Cd accumulation in the root system can indicate that roots serve as a partial barrier to Cd transport to the shoots. Moreover, Macaca accumulated more Cd in the roots than Asterix. On the other hand, in shoot, Asterix had higher Cd concentration at 200  $\mu\text{M}$  Cd compared with Macaca. This data suggests a genotypic difference between potato cultivars concerning the partitioning of Cd. In fact, differences in metal accumulation among cultivars of the same species have been observed in different plants (Dunbar et al., 2003; Liu et al., 2007).

According to Rascio et al. (2008) inhibition of seedling growth is a common effect of many heavy metals and is used as a parameter to characterize phytotoxicity. The growth analyses of potato plantlets showed that number of sprouts and roots was not affected by Cd in both cultivars, whereas Cd treatment affected the number of nodal segments, and shoot and roots length only in Asterix. Reduction in shoot and roots length have been reported by other researches for distinct species exposed to Cd (Zhang et al., 2005; Tiryakioglu et al., 2006; Liu et al., 2007; Rascio et al, 2008). In addition, it

was observed a reduced number of leaves as well as leaves abscission and necrosis for both cultivars at high Cd levels. Soares et al. (2005) and Tiryakioglu et al. (2006) also reported necrosis and shedding of leaves in eucalyptus and barley, respectively, exposed to Cd. Therefore, in the present study, regarding the growth analysis, it seems that Asterix was more sensible to Cd toxicity compared with Macaca.

#### *4.2. Photosynthetic pigments and ALA-D activity*

The level of chlorophyll and total carotenoids was postulated as a simple and reliable indicator of heavy metal toxicity for higher plants (Gratão et al., 2005). Carotenoids are essential for photosynthesis where they serve as accessory light-harvesting pigments and as photoprotectants that quench tissue-damaging free radicals such as singlet oxygen species (Demmig-Adams and Adams, 1996; Frank and Cogdell, 1996; Behera et al., 2002 and references herein). Results of the present study showed a decrease of carotenoids content only in Macaca at two highest Cd levels. This genotypic variations has been reported for other species (Drazkiewicz and Baszynski, 2005; Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006) and, in the present study, it suggests that might be occurred an overproduction of ROS in leaves of Macaca. Interestingly, Macaca had higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content at two highest Cd levels than Asterix which can be correlated with the decreased content of carotenoids.

Lower amounts of chlorophyll were found in leaves of both potato cultivars exposed at both 150 and 200 µM Cd. A bleaching effect of Cd on leaf tissues has been reported, although the mechanism by which the metal brings about chlorosis is still unclear (Rascio et al., 2008). This event has been attributed to a number of effects including inhibition of chlorophyll biosynthesis, chlorophyll degradation, hastened senescence and disorganization of chloroplasts, decreased number of photosynthetic

membranes, and oxidative stress (Mishra et al., 2006; Rascio et al., 2008 and references herein).

Cd-exposure caused a severe inhibition of ALA-D activity in both potato cultivars. The reaction catalyzed by ALA-D is common to tetrapyrrol biosynthesis, including chlorophyll molecules, and is essential for cellular life (Noriega et al., 2007). So, the reduced chlorophyll content verified in the present study may be attributed to reduced chlorophyll synthesis because Cd interferes with heme biosynthesis and chlorophyll formation by interacting with functional –SH groups of sulfhydryl-requiring enzymes like ALA-D (Morsch et al., 2002; Noriega et al., 2007). Indeed, the substrate of reaction catalyzed by ALA-D, the ALA, undergoes enolization and further metal-catalyzed aerobic oxidation at physiological pH to yield superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical (Reyter and Tyrrell, 2000). So, ALA-D inhibition could have led to an ALA accumulation that might endogenously contribute to enhanced level of ROS (Noriega et al., 2007).

#### *4.3. Lipid peroxidation and protein oxidation*

In the present study, there was a gradual increase in MDA content in roots and shoot of both potato cultivars, which was positively correlated with the Cd concentration in the tissues (root:  $r = 0.93$  and  $r = 0.87$  to Asterix and Macaca, respectively; shoot:  $r = 0.87$  and  $r = 0.82$  to Asterix and Macaca, respectively). The significant increase in MDA concentration observed at highest Cd levels suggests that Cd caused oxidative damage to the plant (Singh et al., 2006). Interestingly, Asterix had higher lipid peroxidation in roots than Macaca which can be correlated with the reduction observed in root length only in Asterix. Corroborating with our results, other researches have shown an increased MDA content in Cd-exposed plants (Mishra et al.,

2006; Singh et al., 2006; Rellán-Álvarez et al., 2006; Lee et al., 2007). Mishra et al. (2006) reported that ROS induce severe lipid peroxidation due to removal of hydrogen from unsaturated fatty acids leading to formation of lipid radicals and reactive aldehydes. This results in cyclic cascade of reactions causing distortion of lipid bilayer and membrane proteins (Reinheckel et al., 1998).

In addition, the present work showed an increased carbonyl content in both cultivars at highest Cd treatments, indicating that Cd toxicity caused protein oxidation in potato plantlets. This result corroborates with reports of Arvind and Prasad (2005), Ortega-Villasante et al. (2005) and Rellán-Álvares et al. (2006), who noticed carbonyl accumulation in *Ceratophyllum demersum*, *Medicago sativa* and *Zea mays* plants, respectively, exposed to Cd. Oxidatively modified proteins can undergo chemical fragmentation or form aggregates because of covalent cross-linking reactions and increase surface hydrophobicity, leading to a loss of function (Berlett and Stadman, 1997). In fact, protein carbonylation is an irreversible oxidative process and it appears to contribute to inhibition or the impairment of multiple enzymes (Sohal et al., 2002).

#### 4.4. $H_2O_2$ content and SOD and CAT activities

$H_2O_2$  serves as a signaling molecule to activate a rescue/defense system for restoring the redox homeostasis in plant cells (Gratão et al., 2005). Conversely, during oxidative stress,  $H_2O_2$  is a strong toxic oxidant causing cell damage or even cell death and also can contribute to the carbonylation of proteins (Bienert et al., 2006) which was observed in the present paper. The present investigation indicates that Cd-exposure resulted in increased  $H_2O_2$  content in roots and shoot of Asterix, and apparently, a compensatory response to Cd level exceeding 50  $\mu M$  between roots and shoot of Macaca. According to Aebi (1984) increased  $H_2O_2$  levels may be related with low levels

of SOD because  $H_2O_2$  may inactivate enzymes by oxidizing their thiol groups. In fact, in the present study, the content of  $H_2O_2$  was negatively correlated with SOD activity in roots of both potato cultivars ( $r^2 = 0.62$  and  $r^2 = 0.55$  to Asterix and Macaca, respectively). However, it was observed a positive correlation between these parameters in shoot of Asterix ( $r^2 = 0.82$ ). Therefore, SOD activity had an organ- and cultivar-dependent response to Cd treatments. Increase in SOD activity may be due to increase in superoxide radical concentration and due to *de novo* synthesis of enzymatic proteins (Verma and Dubey, 2003), which is associated with an induction of genes of SOD by superoxide mediated signal transduction (Fatima and Ahmad, 2004). On the other hand, the reduction of the SOD activity is probably due to enhanced level of  $H_2O_2$  as explained above.

Root CAT activity in Asterix decreased at 100 and 150  $\mu M$  Cd, whereas in Macaca it was inhibited only at 50  $\mu M$ . In shoot, CAT activity in Asterix was not affected by Cd, but in Macaca it was decreased at all Cd treatments. According to Ogawa et al. (1997) the decline observed in CAT activity may be due to inhibition of enzyme synthesis or change in assembly of enzyme subunits. Although CAT catalyses the detoxification of  $H_2O_2$ , the CAT activity in roots of Macaca was negatively correlated ( $r^2 = -0.67$ ) with  $H_2O_2$  concentration. This result might be due to the fact that other enzymes have similar role in antioxidant system such as ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GOPX) (Gratão et al., 2005; Mishra et al., 2006).

Previous reports have demonstrated erratic and contradictory responses of antioxidant enzymes to Cd treatment depending on the species and the growing experimental conditions (Gomes-Junior et al., 2006; Tiryakioglu et al., 2006).

In future studies it will be necessary to analyze the effects of Cd on antioxidant enzymes activities in native polyacrylamide gel electrophoresis to verify possible

differences in activity among specific isoenzymes as showed by some authors (Vitória et al., 2001; Gomes-Júnior et al., 2006; Lee et al., 2007).

#### 4.5. AsA and NPSH contents

Ascorbic acid (AsA) is a key antioxidant for elimination of ROS especially  $H_2O_2$  (Noctor and Foyer, 1998). The reaction of AsA with  $H_2O_2$  can occur directly or it can be catalysed by APX (Chen and Gallie, 2004). Root AsA content in Macaca was not affected by Cd, whereas in shoot it was reduced at 100  $\mu M$  Cd and increased at 200  $\mu M$  Cd. On the other hand, a compensatory response to Cd (150 and 200  $\mu M$ ) between roots and shoot of Asterix was observed on AsA content. The increase of AsA content for both potato cultivars indicates that AsA is involved in antioxidant response to Cd toxicity (Tiryakioglu et al., 2006). Moreover, ROS are assumed to be involved in the oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid, leading to reduction in the ascorbic acid content of the plant (Singh et al., 2006).

NPSH are known to be affected by the presence of several metals (Xiang and Oliver, 1998). In the present study, there was a gradual increase in NPSH content in roots and shoot of both potato cultivars, which was positively correlated with the Cd concentration in the tissues (root:  $r^2 = 0.91$  and  $r^2 = 0.81$  to Asterix and Macaca, respectively; shoot:  $r^2 = 0.57$  and  $r^2 = 0.71$  to Asterix and Macaca, respectively). Other investigations have showed an <sup>increased</sup> NPSH in Cd-treated plants (Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006; Tiryakioglu et al., 2006; Rascio et al., 2008). Noctor and Foyer (1998) reported that such increase may be due to stimulation of enzymes of sulfate reduction pathway. In addition, increased synthesis of phytochelatin that play an important role in Cd detoxification could be related to NPSH enhancement (Romero-Puertas et al., 2007).



## 5. Conclusion

In conclusion, the growth reduction of potato plantlets may be related to decreased chlorophyll content with consequent reduction on the photosynthetic rate and an increase in tissue damage, which is evidenced by high levels of lipid peroxidation and protein oxidation. In general, Cd availability above of 100  $\mu\text{M}$  caused great oxidative stress and the antioxidant system of the plantlets was not sufficiently efficient to revert the stress burst. In addition, there is a significant difference in partitioning of Cd between two cultivars, where Macaca accumulated higher levels of Cd in root tissues than Asterix. Such characteristic was accompanied by some detoxification mechanisms. Under Cd treatment, roots of Macaca had increased SOD activity and higher NPSH content, which might be important to detoxify ROS. In parallel, root lipid peroxidation was not altered upon addition of Cd for up to 150  $\mu\text{M}$ , whereas ALA-D activity decreased only upon addition of Cd exceeding 50  $\mu\text{M}$ . These data suggest that Asterix seems to be more sensitive to Cd toxicity compared with Macaca.

## Acknowledgements

The authors thank to Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for the researches fellowships.

## References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
- Arvind, P., Prasad, M.N.V., 2005. Cadmium-zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptative ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 3-20.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.* 13, 1-37.
- Behera, R.K., Mishra, PCh., Choudhury, N.K., 2002. High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *J. Plant Physiol.* 159, 967-973.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 21-34.
- Berlett, B.S., Stadman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316.
- Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., Jahn, T.P., 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 994-1003.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chen, Z., Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* 16, 1143-1162.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W., 1996. The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection in photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1, 21-26.

- Drazkiewicz, M.; Baszynski, T., 2005. Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. *J. Plant Physiol.* 162, 1013-1021.
- Dunbar, K.R., McLaughlin, M.J., Reid, R.J., 2003. The uptake and partitioning of cadmium in two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *J. Exp. Bot.* 54, 349-354.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- El – Moshaty, F.I.B., Pike, S.M., Novacky, A.J., Sehgal, O.P., 1993. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Path.* 43, 109-119.
- Fatima, R.A., Ahmad, M., 2004. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Sci. Total Environ.* 346, 256-273.
- FAO. 2007. Agricultural Statistics. <http://www.fao.org/statistics>.
- Frank, H.A., Cogdell, R.J., 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63, 257-264.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Znidar, I., Mukherjee, A., 2008. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and  $\gamma$ -rays. *Environ. Exp. Bot.* 62, 113-119.
- Gomes-Júnior, R.A, Moldes, C.A., Delite, F.S., Pompeu, G.B., Gratão, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2006. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65, 1330-1337.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy-metal stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biol.* 32, 481-494.

- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agrosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125-140.
- Hiscox, J.D., Israelstam, G.F., 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57, 1132-1334.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M.M., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 88, 119–125.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 148.
- Lee, S-H., Ahsan, N., Lee, K-W., Kim, D-H., Lee, D-G., Kwak, S-S., Kwon, S-Y., Kim, T-H., Lee, B-H., 2007. Simultaneous over expression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 164, 1626-1638.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350-382.
- Liu, C.P., Shen, Z.G., Li, X.D., 2007. Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensis*. *Biol. Plantarum* 51, 116-120.
- Liu, J., Qian, M., Cai, G., Yang, J., Zhu, Q., 2007. Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. *J. Hazard. Mater.* 143, 443-447.

- Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781–1787.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathia, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 25–37.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.
- Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Martins, A.F., Rocha, J.B.T, 2002. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. *Biol. Plantarum* 45, 85–89.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growht and bioassays with tabbaco tissue culture. *Plant Physiol.* 15, 473-497.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Noriega, G.O., Balestrasse, K.B., Batlle, A., Tomaro, M.A., 2007. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Biometals.* 20, 841-851.
- Ogawa, K., Kanematsu, S., Asada, K., 1997. Generation of superoxide anion and localization of Cu – Zn superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38, 1118-1126.
- Ortega-Villasante, C., Rellán-Álvarez, R., Del Campo, F.F., Carpena-Ruiz, R.O., Hernández, L.E., 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J. Exp. Bot.* 56, 2239-2251.

- Rascio, N., Dalla Vecchia, F., La Rocca, N., Barbat, R., Pagliano, C., Raviolo, M., Gonnelli, C., Gabbriellini, R., 2008. Metal Accumulation and damage in rice (cv. Vilone Nano) seedlings exposed to cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 62, 267-278.
- Reinheckel, T., Noack, H., Lorenz, S., Wissedel, I., Augustin, W., 1998. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria, *Free Radic. Res.* 29, 297-305.
- Rellán-álvarez, R., Ortega-Villasante, C., Álvarez-Fernández, A., Campo, F.F., Hernández, L.E., 2006. Stress Responses of *Zea mays* to Cadmium and mercury. *Plant Soil* 279, 41–50.
- Reyter, S.W., Tyrrel, R.M., 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 289-309.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J. Plant Physiol.* 164, 1346-1357.
- Sanità di Toppi, L., Gabbriellini, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41, 105-130.
- Sassa, S., 1982.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133-145.
- Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N., Radina, B., 1999. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* 39, 343-377.
- Singh, S., Eapen, S., D'Souza, S.F., 2006. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62, 233-246.

- Soares, C.R.F.S., Siqueira, J.O., De Carvalho, J.G., Moreira, F.M.S., 2005. Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. Rev. Árvore 29, 175-183 (in Portuguese).
- Stenhouse, F., 1992. The 1992 Australian Market Basket Survey. National Food Authority. Australian Government Publishing Service. Canberra, ACT, Australia.
- Tennant, D., 1975. A test of a modified line intersect method of estimating root length. J. Ecol. 63, 995-1001.
- Tiryakioglu, M., Eker, S., Ozkutlu, F., Husted, S., Cakmak, I., 2006. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance on the environment. J. Trace Elem. Med. Biol. 20, 181-189.
- Verma, S, Dubey, RS., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci. 164, 645-655.
- Vitória, A.P.; Lea, P.J.; Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. Phytochemistry. 57, 701-710.
- Xiang, C.; Oliver, D.J., 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. Plant Cell 10, 1539-1550.
- Zhang, H., Jiang, Y., He, Z., Ma, M., 2005. Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). J. Plant Physiol. 162, 977-984.

## 6 DISCUSSÃO

Em ambas as condições de cultivo, cultivo *in vitro* e em hidroponia, verificou-se efeito negativo do cádmio (Cd) no crescimento de plântulas de batata de ambas as cultivares, Asterix e Macaca. De modo geral, as variáveis tais como altura da parte aérea, número de segmentos nodais, número de folhas e número de raízes foram reduzidas quando em exposição a altas concentrações de Cd. A redução do comprimento radicular, que é uma resposta clássica das plantas estressadas pelo Cd (DRAZKIEWICZ & BASZYNSKI, 2005), ocorreu em ambas as cultivares cultivadas *in vitro*. Entretanto, a Macaca apresentou uma inibição mais drástica em relação à Asterix. Já na hidroponia, a Macaca não sofreu redução do sistema radicular, enquanto a Asterix apresentou redução em todas as concentrações de Cd. A biomassa fresca de raízes e parte aérea de ambas as cultivares foram reduzidas na presença do Cd no cultivo *in vitro*, porém em hidroponia somente a cultivar Asterix apresentou redução quando exposta às concentrações mais altas de Cd (dados não apresentados). Em relação à biomassa seca de raízes e parte aérea, não se observou diferença nas plântulas de batata cultivadas hidroponicamente, enquanto que naquelas do cultivo *in vitro* verificou-se um aumento nas menores concentrações de Cd seguido de decréscimo. A ocorrência de incremento no crescimento das plântulas na condição *in vitro* e não em sistema hidropônico pode ser atribuído ao fato do Cd estar menos disponível em meio geleificado, podendo seus efeitos ser compatíveis aos observados em concentrações efetivas inferiores. Este incremento no crescimento das plântulas expostas a baixas concentrações de Cd tem sido atribuído a um mecanismo denominado hormese, que representa uma resposta de supercompensação do organismo em relação a uma alteração em sua homeostase (CALABRESE, 1999).

A concentração de Cd nas raízes e na parte aérea de plântulas da batata crescidas tanto *in vitro* (dados não apresentados) quanto hidroponicamente aumentou progressivamente de acordo com o incremento de sua concentração no meio de cultivo. Por outro lado, embora o conteúdo de Cd (baseado na concentração de Cd e na produção de biomassa seca) nas raízes e na parte aérea tenha aumentado progressivamente de acordo com o incremento de sua concentração na solução nutritiva, nas plântulas cultivadas *in vitro* foi observada uma resposta errática deste conteúdo que, possivelmente, seja devido ao incremento da biomassa seca observado nas menores concentrações e a forte inibição desta nas maiores concentrações de Cd.



Neste trabalho também foram observados diferentes sintomas visíveis de toxicidade nas plântulas cultivadas em diferentes sistemas de cultivo sob altas concentrações de Cd. Na condição de cultivo *in vitro* observou-se aumento no número de raízes adventícias, clorose, murchamento foliar e escurecimento (oxidação) dos segmentos nodais, enquanto nas plântulas submetidas à hidroponia observou-se necrose das folhas mais velhas seguido de abscisão foliar.

Em relação ao balanço nutricional, verificou-se notáveis diferenças entre as plântulas expostas ao Cd nas condições de cultivo *in vitro* ou em sistema hidropônico e, entre o sistema radicular e a parte aérea. Em geral, os nutrientes minerais (macro e micronutrientes) não tiveram sua absorção e acumulação alteradas pelo Cd no sistema hidropônico, entretanto nas plântulas cultivadas *in vitro*, altas concentrações de Cd causaram drásticas reduções. Interessantemente, as plântulas de batata apresentaram um aumento no conteúdo de alguns nutrientes somente quando crescidas *in vitro* e expostas as menores concentrações de Cd, corroborando com os resultados encontrados em relação à produção de biomassa seca. Existem muitos resultados contraditórios na literatura em relação à nutrição mineral de plantas estressadas pelo Cd devido, principalmente, às diferentes espécies, órgãos e idades das plantas estudadas, bem como às condições de crescimento destas incluindo o tipo de substrato, a concentração de Cd e de outros elementos minerais no meio de cultivo e ao período de exposição das plantas ao metal (DONG et al., 2006).

STOLTZ & GREGER (2002) observaram diferença na absorção e translocação de metais entre a mesma espécie de planta cultivada em solo e hidroponia. Segundo estes autores estas diferenças seriam, provavelmente, devido às diferentes condições de crescimento, uma vez que ocorrem processos na interface raiz-solo que não ocorrem na solução nutritiva e devem afetar a absorção e translocação dos metais. Além disso, o Cd presente em solução nutritiva é mais facilmente absorvido pelas plantas em relação ao Cd no solo (SANITÀ DI TROPPI & GABRIELLI, 1999). Desse modo, os dados do presente trabalho sugerem que as diferenças observadas nas respostas do crescimento e acumulação de nutrientes minerais das plântulas de batata expostas ao Cd em diferentes sistemas de cultivo sejam diretamente relacionadas aos diferentes tipos de interação entre o sistema radicular e o Cd, bem como com os nutrientes minerais.

No presente estudo, também se verificou o efeito do Cd sobre alguns parâmetros relacionados à fotossíntese. A presença de Cd diminuiu o conteúdo de carotenóides somente na cultivar Macaca, por outro lado, reduziu a atividade da enzima aminolevulinato desidratase (ALA-D) e o conteúdo de clorofila em ambas as cultivares. A diminuição do conteúdo de

carotenóides é prejudicial, uma vez que eles atuam como pigmentos fotossintéticos e antioxidantes não-enzimático (BEHERA et al., 2002). O conteúdo reduzido de clorofila pode estar relacionado a vários fatores, como a diminuição da síntese desta molécula. A enzima ALA-D está envolvida na rota de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos como a clorofila, assim a inibição desta enzima pode ser associada ao conteúdo diminuído deste pigmento fotossintético (NORIEGA et al., 2007). A inibição da ALA-D também ocasiona um acúmulo do seu substrato, o aminolevulinato (ALA), o que contribui para a geração de estresse oxidativo (NORIEGA et al., 2007).

Também foi demonstrada a toxidez do Cd neste trabalho pela indução de estresse oxidativo em plântulas de batata cultivadas hidronicamente. O Cd aumentou os níveis de MDA na parte aérea e nas raízes de ambas as cultivares, o que indica peroxidação lipídica das membranas (SINGH et al., 2006). Houve um aumento no conteúdo de grupamentos carbonil na parte aérea de ambas as cultivares na concentração mais alta de Cd, indicando que altas concentrações de Cd também causam oxidação protéica (RELLÁN-ÁLVARES et al., 2006). Tanto a oxidação de proteínas quanto a de lipídios são acentuadas quando há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou o radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ) (GRATÃO et al., 2005). O conteúdo de  $H_2O_2$  foi aumentado pelo Cd na parte aérea e nas raízes da cultivar Asterix, enquanto nas raízes da Macaca houve um aumento somente na menor concentração de Cd seguido de decréscimo e na parte aérea houve uma resposta contrária. Para a destoxificação destas EROs existe um sistema antioxidante enzimático e um não-enzimático responsáveis pela neutralização e/ou remoção destas EROs e incluem moléculas como ácido ascórbico, glutathione reduzida, tocoferol e algumas enzimas como ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (GRATÃO et al., 2005). A atividade da SOD da Asterix foi aumentada na parte aérea e diminuída nas raízes, enquanto a Macaca apresentou resposta contrária. A atividade da CAT em Macaca foi diminuída em todas as concentrações de Cd na parte aérea e em  $50 \mu M$  de Cd nas raízes, enquanto na cultivar Asterix a CAT da parte aérea não foi influenciada pelo Cd e a das raízes foi inibida em 100 e  $150 \mu M$  Cd. Essas alterações na atividade das enzimas antioxidantes têm sido citadas por vários autores em diferentes espécies de plantas expostas ao Cd. Entretanto, existem muitos resultados contraditórios na literatura, uma vez que tanto aumento quanto diminuição e inalteração da atividade enzimática antioxidante em plantas expostas ao Cd têm sido relatados (BENAVIDES et al., 2005; GRATÃO et al., 2005; GOMES-JUNIOR et al., 2006).

Em relação aos antioxidantes não-enzimáticos, o conteúdo de NPSH aumentou nas raízes e na parte aérea de ambas as cultivares expostas ao Cd, salientando a importância destas moléculas no processo de destoxificação deste metal, uma vez que este aumento pode ser associado ao estímulo na síntese de fitoquelatinas (GONÇALVES et al., 2007), as quais são responsáveis tanto por quelar o Cd no citoplasma quanto por realizar a deposição deste no vacúolo (WÓJCIK & TUKIENDORF, 2005). O conteúdo de AsA aumentou em 150  $\mu\text{M}$  de Cd nas raízes da Asterix e em 200  $\mu\text{M}$  de Cd na parte aérea de ambas as cultivares. Por outro lado, houve redução no conteúdo de AsA em 200  $\mu\text{M}$  de Cd nas raízes da Asterix e em 150 e 100  $\mu\text{M}$  de Cd na parte aérea de Asterix e Macaca, respectivamente, enquanto que nas raízes da Macaca não houve alteração. O aumento do conteúdo de AsA em ambas as cultivares indica que esta molécula está envolvida na resposta antioxidante da batata à toxidez de Cd, enquanto o conteúdo diminuído de AsA pode ser associado a uma oxidação desta molécula pelas EROs transformando-a em desidroascorbato (SINGH et al., 2006; TIRYAKIOGLU et al., 2006).

De modo geral, os resultados do presente trabalho mostraram que o Cd presente no meio de cultura afeta o crescimento, desorganiza o balanço nutricional e induz ao estresse oxidativo em plântulas de batata. Os resultados relacionados, principalmente, ao comprimento radicular e à produção de biomassa fresca de ambas as cultivares de batata submetidas a duas diferentes condições de cultivo permitem inferir que a Macaca foi mais sensível ao Cd do que a Asterix, quando cultivadas *in vitro*. Entretanto, no sistema hidropônico foi verificada uma resposta contrária. Portanto, é necessário a realização de trabalhos com outras abordagens, como em nível molecular, para que se possa caracterizar mais detalhes relacionados ao transporte e acumulação dos nutrientes minerais e do Cd e a influência deste no sistema antioxidante. Além disso, em estudos posteriores, as plântulas de ambas as cultivares devem ser submetidas ao crescimento em solo contaminado com Cd para haver um maior entendimento quanto à tolerância ou sensibilidade destas cultivares a este metal.

## 7 CONCLUSÕES

- Em ambas as condições de cultivo, *in vitro* e em hidroponia, as plântulas de batata de ambas as cultivares, Asterix e Macaca, apresentaram redução da altura da parte aérea, número de segmentos nodais, número de folhas e número de raízes pelo aumento de Cd no substrato.
- Os resultados relacionados, principalmente, ao comprimento radicular e à produção de biomassa fresca de ambas as cultivares de batata submetidas a duas diferentes condições de cultivo permitem inferir que a Macaca foi mais sensível ao Cd do que a Asterix, quando cultivadas *in vitro*. Entretanto, no sistema hidropônico foi verificada uma resposta contrária.
- A concentração de Cd nas raízes e na parte aérea de plântulas da batata crescidas tanto *in vitro* quanto hidroponicamente aumentou progressivamente de acordo com o incremento de sua concentração no meio de cultivo e, embora o conteúdo de Cd nos tecidos das plântulas cultivadas em hidroponia tenha exibido o mesmo comportamento linear da concentração, nas plântulas crescidas *in vitro* foi observada uma resposta errática deste conteúdo que, possivelmente, seja devido ao incremento da biomassa seca observado nas menores concentrações e a forte inibição desta nas maiores concentrações de Cd.
- Em geral, os macro e micronutrientes não tiveram sua absorção e acumulação alteradas pelo Cd nas plântulas cultivadas hidroponicamente. Entretanto nas plântulas cultivadas *in vitro*, altas concentrações de Cd causaram drásticas reduções no conteúdo destes nutrientes minerais. Em adição, a cultivar Macaca apresentou aumento no conteúdo de alguns nutrientes somente quando cultivada *in vitro* e exposta as menores concentrações de Cd, corroborando com os resultados encontrados em relação ao estímulo da produção de biomassa seca.
- A presença de Cd em sistema de cultivo hidropônico diminuiu o conteúdo de carotenóides somente na cultivar Macaca, bem como reduziu a atividade da enzima ALA-D e o conteúdo de clorofila em ambas as cultivares, indicando que o Cd interfere negativamente em processos relacionados à fotossíntese em plântulas de batata;
- O Cd aumentou os níveis de MDA na parte aérea e nas raízes de ambas as cultivares, bem como aumentou o conteúdo de grupamentos carbonil na parte aérea de ambas as cultivares na concentração mais alta de Cd. O aumento na concentração de peróxido de hidrogênio em plântulas de batata submetidas ao Cd indica que este metal alterou a produção de espécies reativas de oxigênio conduzindo à peroxidação lipídica das membranas e à oxidação protéica nestas plântulas;

- O Cd causou alterações na atividade de enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD, além de alterar a concentração de moléculas antioxidantes não-enzimáticas, como o AsA e NPSH em plântulas de batata. Em especial, o aumento do conteúdo de NPSH, tanto nas raízes quanto na parte aérea de ambas as cultivares, indica a produção aumentada de fitoquelatinas que são importantes no processo de destoxificação do metal. As alterações observadas no sistema de defesa antioxidante e no conteúdo de nutrientes minerais das plântulas de batata expostas ao Cd indicam que este metal promoveu estresse oxidativo e desequilíbrio no balanço nutricional nesta espécie, o que contribuiu para os efeitos negativos observados em relação ao crescimento da batata.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOWAY, B. J.; STEINNES, E. Anthropogenic additions of cadmium to soils. In: McLAUGHLIN, M. J.; SING, B. R. (Org.). **Cadmium in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. 98p.

ALVES, F. Poluição industrial: São Paulo tem mais de 2000 áreas potencialmente contaminadas. **Revista de Saneamento Ambiental**, v.37, p. 12-13, 1996.

AN, Y-J. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. **Environmental Pollution**, v.127, p. 21-26, 2004.

ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D. J.; OSMOND, C.; ARNTZEN, C. J. (Org.). **Photoinhibition**. New York: Elsevier, 1987. p. 227-297.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p. 601-639, 1999.

BALESTRASSE, K. B. et al. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p. 497-504, 2001.

BARCELÓ, J. et al. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity. **Journal of Plant Physiology**, v.125, p. 17-25, 1986.

BEHERA, R. K.; MISHRA, P. Ch.; CHOUDHURY, N. K. High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p. 967-973, 2002.

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

BERNARD, A.; LAUWERYS, R. Cadmium in human population. **Experientia**, v.40, p. 143-152, 1984.

BHATTACHARJEE, S. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. **Biologia Plantarum**, v.40, p. 131-135, 1998.

BROWN, D. P.; BECKETT, R. P. Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus Squarrosus*. **Annals of Botany**, v.55, p. 179-188, 1985.

BISOGNIN, D. A. **Recomendação técnica para o cultivo da batata no Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 1996. 64p.

- BREJ, T. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. Populations from Legnica copper smelter area, Lower Silesia. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v.67, p. 325–333, 1998.
- CALABRESE, E. J. Evidence that hormesis represents an “overcompensation” response to a disruption in homeostasis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.42, p. 135-137, 1999.
- CAMPOS, M. L. et al. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n. 4, p. 361-367, 2005.
- CHAOUI, A. et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v.127, p. 139-147, 1997.
- CHEN, S. L.; KAO, C. H. Glutathione reduces the inhibition of rice seedlings root growth caused by cadmium. **Plant Growth Regulation**, v.16, p. 249-252, 1995.
- CHUGH, L. K.; SAWHNEY, S. K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* grown in presence of cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, n. 4, p. 297-303, 1999.
- CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v.212, p. 475-486, 2001.
- COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, v.123, p. 825-832, 2000.
- COELHO, A. H. R.; VILELA, E. R.; CHAGAS, S. J. R. Qualidade de batata (*Solanum tuberosum* L.) para fritura, em função dos níveis de açúcares redutores e amido, durante o armazenamento refrigerado e à temperatura ambiente com atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, n. 4, p. 899-910, 1999.
- COTZIAS, G. C.; BORG, D. C.; SELLECK, B. Virtual absence of turnover in cadmium metabolism: Cd109 studies in the mouse. **American Journal of Physiology**, v.201, p. 927–930, 1961.
- DALURZO, H. C. et al. Cadmium infiltration of detached pea leaves: effect on its activated oxygen metabolism. **Phyton-Annales Rei Botanicae**, v.37, p. 59–64, 1997.
- DAT, J. F. et al. Dual action of active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.57, p. 779-795, 2000.
- DONG, J.; WU, Fei-bo; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, v.64, p. 1659-1666, 2006.
- DRAZKIEWICZ, M.; BASZYNSKI, T. Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p. 1013-1021, 2005.

- DUNBAR, K. R.; REID, R. J.; McLAUGHLIN, M. J. The uptake and partitioning of cadmium in two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) **Journal of Experimental Botany**, v.54, n. 381, p. 349-354, 2003.
- ERNST, W. H. O; VERKLEIJ, J. A. C.; SCHAT, H. Metal tolerance in plants. **Acta Botanica Neerlandica**, v.41, p. 229-248, 1992.
- FAO. **FAO production yearbook 1998**. Rome: FAO Statistics, Series, v.52, 1998.
- GABBRIELLI, R. et al. Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. **Plant and Soil**, v.122, p. 271-277, 1990.
- GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, v.121, p. 151-159, 1996.
- GHOSHROY, S. et al. Inhibition of plant viral systemic infection by non-toxic concentrations of cadmium. **The Plant Journal**, v.13, p. 591-602, 1998.
- GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochemical Journal**, v.61, p. 618-676, 1955.
- GICHNER, T. et al. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and  $\gamma$ -rays. **Environmental and Experimental Botany**, v.62, n. 2, p. 113-119, 2008.
- GOMES-JÚNIOR, R. A. et al. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v.65, p. 1330-1337, 2006.
- GONÇALVES, J. F. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, n. 3, p. 223-232, 2007.
- GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy-metal stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, p. 481-494, 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p. 1-11, 2002.
- HENDRY, G. A. F.; BAKER, A. J. M.; EWART, C. F. Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium sensitive clones of *Holcus lanatus*. **Acta Botanica Neerlandica**, v.41, p. 271-281, 1992.
- HIRSCH, R. E. et al. A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. **Science**, v.280, p. 918-921, 1998.
- IANNELLI, M. A. et al. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.40, p. 977-982, 2002.



IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola, confronto das safras de 2003 e das estimativas para 2004**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 de abr. 2004.

JAFFE, E. K. et al. Porphobilinogen synthase from pea: expression from an artificial gene, kinetic characterization, and novel implications for subunit interactions. **Biochemistry**, v.39, p. 9018–9029, 2000.

JARUP, L.; ELINDER, C. G.; SPANG, G. Cumulative blood-cadmium and tubular proteinuria: a dose-response relationship. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v.60, p.223, 1988.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. Boca Raton : CRC Press Inc, 2001. 148p.

KLAASSEN, C. D.; LIU, J.; CHOUDHURI S. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.39, p. 267–94, 1999.

LEWIS, G. P. et al. Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man. **Lancet**, v.1, p.291-292, 1972.

LI, Y. M.; CHANNEY, L. R.; SCHNEITER, A. A. Genotypic variation in kernel cadmium concentration in sunflower germplasm under varying soil conditions. **Crop Science**, v.35, p.137-141, 1995.

LIU, J. et al. Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. **Journal of Hazardous Materials**, v.143, p. 443-447, 2007.

LOPES, C. A.; BUSO, J. A. **Cultivo da batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 1997. 36p.

LOZANO-RODRÍGUEZ, E. et al. Distribution of Cd in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. **Journal of Experimental Botany**, v.48, p. 123-128, 1997.

MISHRA, S. et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p. 25-37, 2006.

MOBIN, M.; KHAN, N. A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p. 601-610, 2007.

MOHAN, B. S., HOSETTI, B. B. Potential phytotoxicity of leaf and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. **Environmental Pollution**, v.98, p. 233–238, 1997.

MORSCH, V. M. Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves. **Biologia Plantarum**, v.45, p. 85–89, 2002.

- MORTVEDT, J. J. Cadmium levels in soils and plants from some long-term soil fertility experiments in United States of America. **Journal of Environmental Quality**, v.16, p.137-142, 1987.
- NOCTOR G. et al. Glutathione biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p. 623-647, 1998.
- NORDBERG, G. F., KJELLSTROM, T. Metabolic model for cadmium in man. **Environmental Health Perspectives**, v.28, p. 211–217, 1979.
- NORDBERG, M. W.; MILLER, W. J. Metabolism and toxicity of cadmium, mercury, and lead in animals. **Journal of Dairy Science**, v.58, p. 1767–1781,1975.
- NORIEGA, G. O. et al. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of  $\delta$ -aminolevulinic acid. **Biometals**, v.20, p. 841-851, 2007.
- OUZOUNIDOU, G.; MOUSTAKAS, M.; ELEFThERIOU, E. P. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.32, p. 154-160, 1997.
- OZTURK, L.; EKER, S.; OZKUTLU, F. Effect of cadmium on growth and concentrations of cadmium, ascorbic acid and sulphhydryl groups in durum wheat cultivars. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.27, p. 161-168, 2003.
- PEREIRA, A. S.; SOUZA, Z. S.; CHOER, E. Principais cultivares. In: PEREIRA, S. A.; DANIELS, S. J. (Org.). **O cultivo da batata na região sul do Brasil**. Brasília: Embrapa, 2003, p. 143-153.
- PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves an chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, v.133, p. 829-837, 2003.
- PINTO, E. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Ecology**, v.39, p. 1008 – 1018, 2003.
- PRASAD, M. N. V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.35, p. 525-545, 1995.
- RAMOS, I. et al. Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction. **Plant Science**, v.162, p. 761-767, 2002.
- RASCIO, N. et al. Some effects of cadmium on maize plants. Archives of **Environmental Contamination and Toxicology**, v.25, p. 244-249, 1993.
- REID, R. J.; DUNBAR, K. R.; McLAUGHLIN, M. J. Cadmium loading into potato tubers: the roles of the periderm, xylem and phloem. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p. 201-206, 2003.
- RELLÁN-ÁLVAREZ, R. et al. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. **Plant and Soil**, v.279, p. 41-50, 2006.

REYTER, S. W.; TYRREL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v.28, p. 289-309, 2000.

RIVETTA, A; NEGRINI, N.; COCUCCI, M. Involvement of  $Ca^{2+}$ -calmodulin in  $Cd^{2+}$  toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. **Plant, Cell and Environment**, v.20, p. 600-608, 1997.

SALIN, M. L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplasts. **Physiologia Plantarum**, v.72, p. 681-689, 1988.

SALT, D. E.; RAUSER, W. E. MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. **Plant Physiology**, v.107, p.1293-1301, 1995.

SALT, D. E. et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, v.109, p.427-433, 1995.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium induces changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p. 2115-2126, 2001.

SANITÀ di TROPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.41, p. 105-130, 1999.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v.101, p.7-12, 1993.

SATARUG, S. et al. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicology Letters**, v.137, p. 65-83, 2003.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidant enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, v.105, p. 39-44, 1999.

SGHERRI, C. L. M. et al. Antioxidative enzymes in two wheat cultivars, differently sensitive to drought and subjected to sub-symptomatic copper doses. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.1439-1447, 2001.

SHAH, K. et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, v.161, p. 1135-1144, 2001.

SHAW, B. P. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. **Biologia Plantarum**, v.37, p. 587-596, 1995.

SINGH, S., EAPEN, S., D'SOUZA, S. F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, v.62, p. 233-246, 2006.

SOMASHEKARAIHAH, B. V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A. R. K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mungbean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, v.85, p. 85-89, 1992.

STENHOUSE, F. **The 1992 Australian Market Basket Survey**. Canberra: Australian Government Publishing Service, 1992. 96p.

STOLT, J. P. et al. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, v.49, p. 21-28, 2003.

STOLTZ, E.; GREGER, M. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. **Environmental and Experimental Botany**, v.47, p. 271-280, 2002.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biological Medicine**, v.18, p.321-336, 1995.

TIRYAKIOGLU, M. et al. Antioxidant defense system and cadmium uptake in barley genotypes differing in cadmium tolerance. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.20, p. 181-189, 2006.

VECCHIA, F. D. et al. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea Canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**, v.168, p. 329-338, 2005.

VITÓRIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, v.57, p. 701-710, 2001.

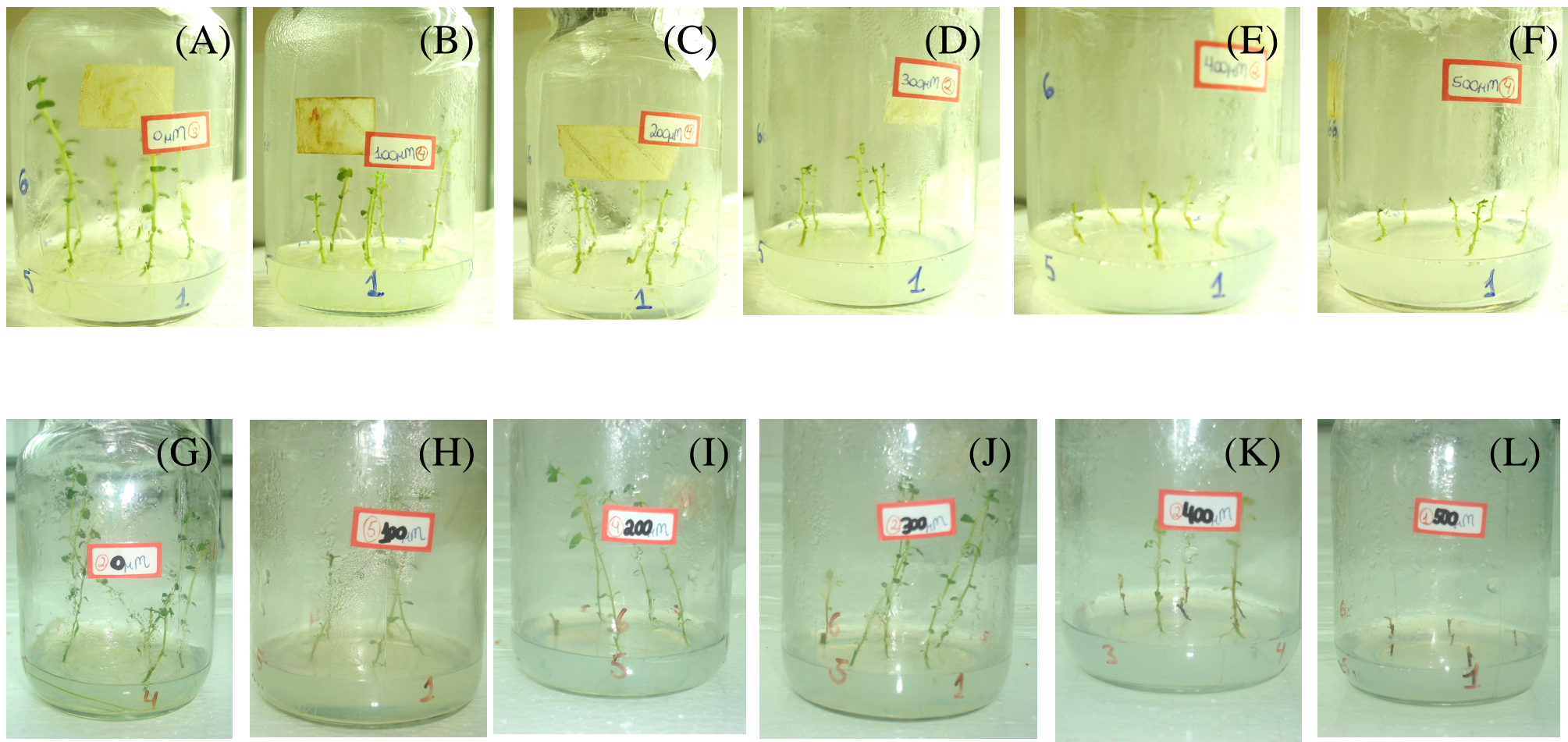
WAGNER, R. C. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, v.51, p. 173-212, 1993.

WANG, Q. et al. Instances of soil and crop heavy metal contamination in China. **Journal of Soil Contamination**, v.10, p. 497-510, 2001.

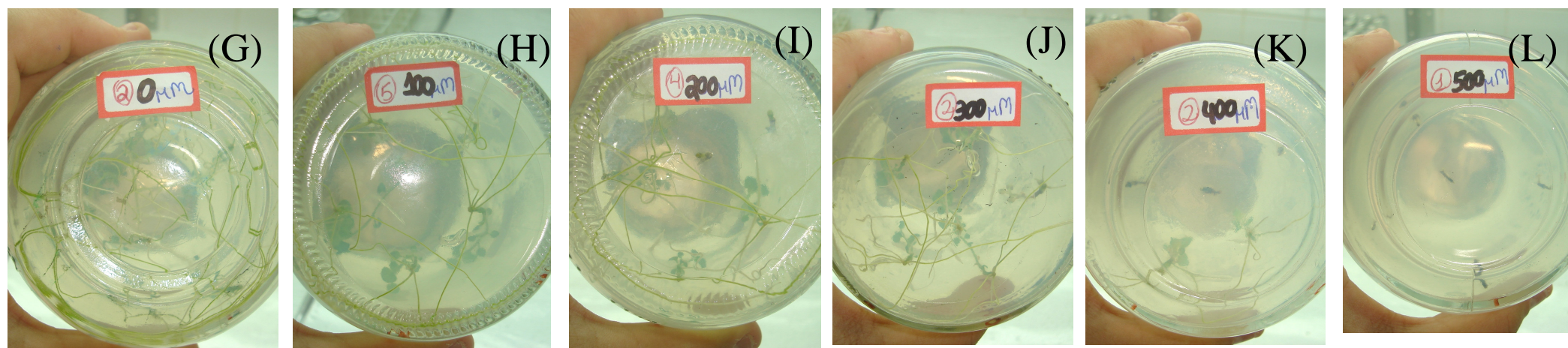
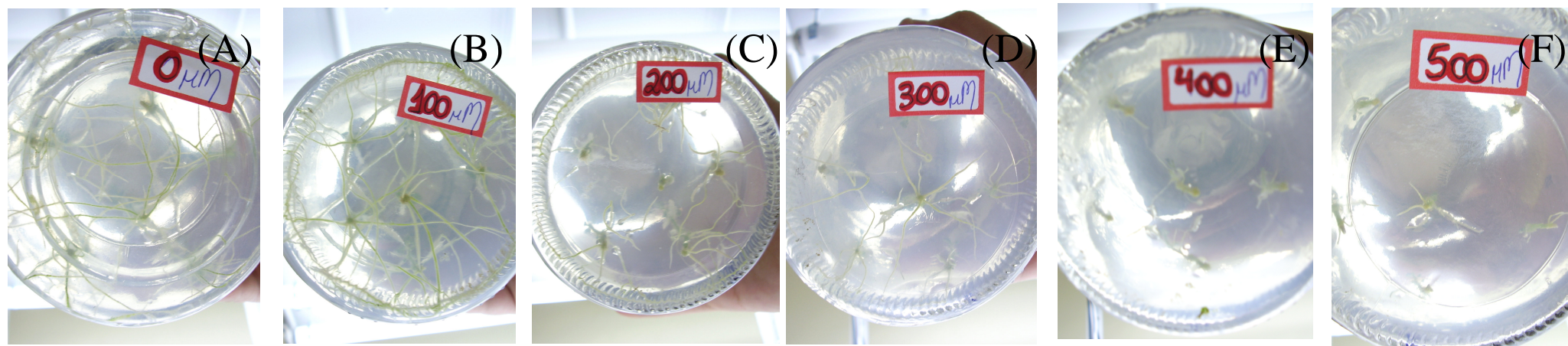
WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. **Biologia Plantarum**, v.49, n.2, p.237-245, 2005.

ZHANG, F. et al. Response of antioxidative enzymes in cucumber chloroplasts to cadmium toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, v.26, p. 1779-1788, 2002.

ZORZELLA, C. A. et al. Caracterização física, química e sensorial de genótipos de batata processados na forma de chips. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p. 15-24, 2003.



**APÊNDICE 1.** Efeito de diferentes concentrações de cádmio (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$ ) sobre a morfologia da parte aérea das cultivares de batata, Asterix (A-F, respectivamente) e Macaca (G-L, respectivamente) após 22 dias de exposição ao metal em cultivo *in vitro*.



**APÊNDICE 2.** Efeito de diferentes concentrações de cádmio (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$ ) sobre a morfologia do sistema radicular das cultivares de batata, Asterix (A-F, respectivamente) e Macaca (G-L, respectivamente) após 22 dias de exposição ao metal em cultivo *in vitro*.

(A)



(B)



**APÊNDICE 3.** Efeito das concentrações 150  $\mu\text{M}$  (A) e 200  $\mu\text{M}$  (B) de cádmio sobre a morfologia da parte aérea de plântulas de batata após 7 dias de exposição ao metal em sistema hidropônico.