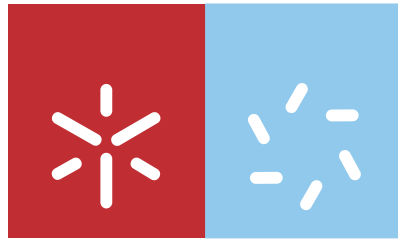




**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Pedro Ferraz Ramos Lopes

**Efeito da exposição de *Solanum nigrum* L.  
a concentrações elevadas de níquel e  
crómio e participação das metalotioninas  
na homeostasia destes metais**



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Pedro Ferraz Ramos Lopes

**Efeito da exposição de *Solanum nigrum* L.  
a concentrações elevadas de níquel e  
crómio e participação das metalotioninas  
na homeostasia destes metais**

Mestrado em Fisiologia Molecular de Plantas

Trabalho efectuado sob a orientação de:

**Orientador: Professor Doutor Jorge Teixeira**

**Co-orientadora: Professora Doutora Fernanda Fidalgo**

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO,  
MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador, Professor Doutor Jorge Teixeira, por toda a paciência e disponibilidade demonstradas ao longo de todo o trabalho laboratorial e durante a escrita da tese, por todo o apoio, orientação e conselhos prestados durante a execução das várias técnicas laboratoriais, e sobretudo pela confiança demonstrada nas minhas capacidades e pela simpatia e boa disposição contagiante que o caracterizam, e que sempre demonstrou em todas as alturas, mesmo quando algo não correu conforme o planeado. Queria agradecer especialmente todas as conversas e todos os “brainstormings” que fizemos ao longo do tempo, que estimularam cada vez mais o meu interesse pelo tema e que muito me enriqueceram a nível pessoal e científico.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Fernanda Fidalgo, por todo o auxílio prestado nas mais variadas técnicas laboratoriais, pela boa disposição demonstrada ao longo do tempo em que estive no laboratório e pelo apoio e tempo dispensados na interpretação de alguns resultados obtidos, que contribuíram para um maior rigor científico presente neste trabalho.

Ao Professor Doutor Agostinho Almeida, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e à toda a sua equipa, pela realização das quantificações dos metais presentes nos diversos tecidos das plantas em estudo.

Ao Ricardo, por ter sido o grande companheiro ao longo deste ano de trabalho, apesar de não ter estado comigo no mesmo laboratório, por todas as conversas à hora de almoço que muitas vezes se iam prolongando pela tarde dentro, pela ajuda prestada na realização de algumas tarefas relacionadas com o trabalho laboratorial, mas sobretudo pela boa disposição que o caracterizam e pela amizade que se vai mantendo ao longo de todos estes anos.

À Alexandra e a todos os restantes colegas que foram passando pelo laboratório ao longo deste ano, por todo o apoio prestado e sobretudo pela boa disposição que tornavam excelente o ambiente no laboratório.

A todos os colegas de outros laboratórios, que de algum modo contribuíram para a execução de qualquer das tarefas realizadas ao longo do trabalho laboratorial.

A todos aqueles aqui não mencionados e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Um agradecimento muito especial aos meus Pais e aos meus irmãos, por sempre terem demonstrado fé nas minhas capacidades, por sempre me terem apoiado ao longo de toda a minha vida, por me terem deixado seguir o meu caminho mesmo quando as coisas não corriam bem e pela paciência em me ouvir quando lhes tentava explicar os resultados que obtive.

A todos os meus amigos, os que estão mais perto e os que agora estão mais longe, por estarem sempre lá quando preciso deles, e por sempre me apoiarem em tudo, e em especial por terem paciência para me aturar quando o meu tema de conversa era o trabalho.

À Joana, por todo o carinho, paciência e compreensão...

## RESUMO

---

Plantas de *Solanum nigrum* L. foram expostas a diferentes concentrações de Ni e de Cr, durante diferentes períodos de tempo, para verificar se esta espécie vegetal poderá ser utilizada como ferramenta de remediação de locais contaminados por estes metais e, também, para averiguar (e discriminar) a participação das metalotioninas na homeostasia e tolerância destas plantas a estes metais. A exposição de *S. nigrum* a níveis elevados de Ni induziu o aparecimento de clorose foliar e a redução do crescimento da parte aérea e da raiz, apesar de apenas ter desencadeado stress oxidativo nas raízes das plantas expostas a 100  $\mu\text{M}$ , não se tendo verificado qualquer dano na parte aérea. Um dos mecanismos de defesa utilizado pelas plantas contra este stress foi o aumento dos níveis de prolina livre nas raízes. Já a exposição de uma semana ao Cr (III) não conduziu ao aparecimento de sintomas visíveis de toxicidade nem à redução do crescimento das plantas. Ambas as concentrações utilizadas desencadearam stress oxidativo apenas nas raízes, mas somente a exposição a 1000  $\mu\text{M}$  de Cr (III) conduziu a um aumento no teor de prolina livre, sugerindo a participação de outros mecanismos de defesa antioxidante numa situação de exposição prolongada a este metal. Apesar desta aparente tolerância de *S. nigrum* a elevadas concentrações destes metais, os baixos níveis de Ni e Cr (III) quantificados nos tecidos destas plantas não permitem considerá-las hiperacumuladoras de nenhum deles, embora possam ser utilizadas para fitoestabilizarem estes poluentes nos solos. O estudo da acumulação de transcritos de metalotioninas nos tecidos das plantas expostas a estes metais permitiu verificar que a acumulação dos mRNAs das MT2a e MT2d foi induzida pelo Ni e pelo Cr (III), havendo também acumulação nos tecidos das plantas controlo, indicando o envolvimento destas MTs na homeostasia destes dois metais num processo de defesa primário não específico de um determinado metal. Observou-se também que o Ni induziu especificamente o aumento da acumulação dos transcritos das MT2c e das MT3 na parte aérea das plantas, enquanto que o Cr (III) não induziu especificamente nenhum tipo de MTs estudado, admitindo-se como possível o envolvimento das MT1 e/ou de outros agentes quelantes nesta tolerância. Este trabalho permite, assim, apoiar a hipótese da existência de especificidade no papel de determinadas metalotioninas, as MT2c e MT3, na homeostasia do Ni, contribuindo deste modo para o esclarecimento dos papéis dos vários tipos de MTs na homeostasia dos metais nas plantas. Foi iniciado um processo de obtenção de *S. nigrum* transgênicas com a expressão das MT2c silenciada, de modo a ser possível, no futuro, confirmar a contribuição específica desta proteína na homeostasia do Ni.



## ABSTRACT

---

*Solanum nigrum* L. plants were exposed to different concentrations of Ni and Cr, during different periods of time, to verify if this plant species could be used as a tool for the remediation of sites contaminated by these metals and also to investigate (and discriminate) the participation of metallothioneins in the homeostasis and tolerance of these plants to those metals. Exposure of *S. nigrum* to high levels of Ni induced the appearance of leaf chlorosis and the reduction of shoot and root growth, despite only causing oxidative stress in the roots of plants exposed to 100  $\mu\text{M}$  of this metal, without damaging the shoots. One of the defense mechanisms used by plants against this stress was the increase of free proline levels in roots. In the case of Cr (III), the exposure of plants to this metal did not lead to the appearance of visible signs of toxicity nor the reduction of plant growth. Both concentrations used triggered oxidative stress solely in the roots, but only the one-week exposure to 1000  $\mu\text{M}$  of Cr (III) led to an increase of free proline content, suggesting the involvement of other antioxidant defense mechanisms when considering a long-term exposure. Despite this apparent tolerance of *S. nigrum* to high concentrations of these metals, the low levels of Ni and Cr (III) quantified in these plants' tissues do not allow to be consider this plant species a hyperaccumulator for either of these metals, but it can be used to phytostabilize these pollutants in soils. The study of the accumulation of metallothioneins' transcripts in the tissues of plants exposed to these metals showed that the mRNA accumulation of both MT2a and MT2d was induced by Ni and Cr (III), and it was also noted the accumulation of these transcripts in the control-derived plants tissues, suggesting an involvement of these proteins in Ni and Cr (III) homeostasis, in a non metal-specific primary defense process. It was also revealed that Ni specifically induced the increase of MT2c and MT3 mRNA accumulation in shoots, whereas Cr (III) did not specifically induce any type of the MTs studied, suggesting the possible involvement of MT1 and/or other chelators in this tolerance response. In fact, this work supports the hypothesis of the existence of a metallothioneins-specific role of MT2c and MT3 in Ni homeostasis, thereby contributing to the clarification of the roles the various types of MTs play in metal homeostasis in plants. A process of elaboration of transgenic *S. nigrum* plants with silenced MT2c expression was also started, in order to confirm the specific contribution of these proteins in Ni homeostasis in the future.





# ÍNDICE

---

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A poluição por metais pesados .....	1
1.2. O Níquel (Ni) e o Crómio (Cr) .....	2
1.3. Respostas das plantas ao stress .....	6
1.4. A fitorremediação .....	6
1.4.1. Poluentes que podem ser fitorremediados.....	7
1.4.2. Vantagens e limitações.....	8
1.4.3. Mecanismos e processos fisiológicos inerentes .....	10
1.5. Plantas hiperacumuladoras – <i>Solanum nigrum</i> L.....	12
1.6. As metalotioninas.....	14
1.6.1. Funções das MTs.....	15
1.6.2. Classificação das MTs.....	16
1.6.3. Acumulação e distribuição dos transcritos das MTs.....	18
1.6.4. Distribuição das MTs nas plantas.....	19
1.7. Objectivos do trabalho .....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.1. Determinação dos níveis dos metais pesados a utilizar nos estudos com <i>S. nigrum</i> .....	23
2.1.1. Germinação de sementes de <i>S. nigrum</i> .....	23
2.1.2. Biometria das plantas expostas a concentrações crescentes de metais pesados.....	23
2.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de plantas de <i>S. nigrum</i> a níveis elevados de metais pesados.....	24
2.2.1. Condições de crescimento.....	24
2.2.2. Biometria das plantas expostas a concentrações elevadas de metais pesados .....	25
2.2.3. Quantificação da concentração dos metais nos tecidos vegetais.....	25

2.2.4. Determinação do nível de peroxidação lipídica .....	26
2.2.5. Quantificação da acumulação de prolina .....	26
2.2.6. Quantificação dos pigmentos fotossintéticos .....	27
2.3. Avaliação da acumulação de mRNAs de MTs de <i>S. nigrum</i> .....	28
2.3.1. Desenho de oligonucleótidos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	28
2.3.2. Extracção, quantificação e avaliação do estado de pureza do RNA total .....	28
2.3.3. Reacções de RT (Transcrição Reversa) .....	29
2.3.4. Reacções de PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) semi-quantitativas .....	30
2.3.5. Análise do estado do RNA e de produtos de PCR por electroforese em gel de agarose.....	31
2.4. Elaboração de construções génicas para posterior silenciamento de MTs específicas em <i>S. nigrum</i> .....	32
2.4.1. Reacções de PCR para amplificar a região 3'UTR das MT2c.....	32
2.4.2. Extracção e quantificação de DNA do gel de agarose .....	32
2.4.3. Reacções de ligação do DNA ao vector pTZ57R/T.....	33
2.4.4. Obtenção de células competentes de <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	33
2.4.5. Transformação de células competentes DH5 $\alpha$ .....	34
2.4.6. <i>Minipreps</i> de DNA .....	35
2.4.7. Reacções de restrição do DNA plasmídico .....	35
2.4.8. Reacções de ligação do DNA ao vector pG0229 .....	36
2.4.9. Sequenciação de DNA .....	36
2.4.10. Obtenção de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 .....	37
2.4.11. Transformação de células competentes EHA105.....	37
2.4.12. Perpetuação das células competentes EHA105 transformadas .....	38
2.5. Análise estatística.....	38

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
3.1. Níquel (Ni) .....	39
3.1.1. Determinação das concentrações de Ni a utilizar nos estudos com <i>S. nigrum</i> .....	39
3.1.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de <i>S. nigrum</i> a níveis elevados de Ni .....	42
3.1.3. Avaliação da acumulação de mRNAs de MTs de <i>S. nigrum</i> expostas a Ni.....	50
3.2. Crómio (III) [Cr (III)] .....	55
3.2.1. Determinação das concentrações de Cr (III) a utilizar nos estudos com <i>S. nigrum</i> ..	55
3.2.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de <i>S. nigrum</i> a níveis elevados de Cr (III) .....	59
3.2.3. Avaliação da acumulação de mRNAs de MTs de <i>S. nigrum</i> expostas a Cr (III) .....	67
3.3. Crómio (VI) [Cr (VI)].....	72
3.3.1. Determinação das concentrações de Cr (VI) a utilizar nos estudos com <i>S. nigrum</i> ..	72
3.3.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de <i>S. nigrum</i> a Cr (VI) .....	75
3.4. Elaboração de construções génicas para posterior silenciamento de MTs específicas em <i>S. nigrum</i> .....	77
4. CONCLUSÕES .....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87
ANEXOS.....	97
Anexo I – Composição de soluções utilizadas.....	97
Anexo II – Sequências dos <i>primers</i> utilizados.....	98
Anexo III – Mapa do plasmídeo pG0229 final para o silenciamento da expressão do gene que codifica a MT2c .....	99



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

---

Abs - absorvância

Asn - asparagina

Asp - ácido aspártico

bp - pares de bases

Car - carotenóides

cDNA - DNA complementar

Cl a - clorofila a

Cl b - clorofila b

cm - centímetro

Cys - cisteína

D.O. - densidade óptica

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNase - desoxirribonuclease

dNTP - 2',3'-didesoxinucleótido 5'-trifosfato

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

ERO - espécie reactiva de oxigénio

g - grama; força centrífuga relativa

g p.f. - grama de peso fresco

Gln - glutamina

Gly - glicina

k - quilo

kb - quilobases

L - litro

LB - meio de Luria-Bertani

Lys - lisina

m - mili

M - molar

mRNA - RNA mensageiro

n - nano

p/v - peso/volume

RNA - ácido ribonucleico

RNase - ribonuclease

rRNA - RNA ribossomal

STET - tampão Sacarose-Tris-EDTA-Triton

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

tRNA - RNA de transferência

U - unidades

UTR - (*untranslated region*) - região não-traduzida

V - volt

v/v - volume/volume

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

$\mu$  - micro

$\epsilon$  - coeficiente de extinção milimolar

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. A poluição por metais pesados

A Revolução Industrial, iniciada em Inglaterra em meados do século XVIII, transportou o Homem para um novo patamar de conhecimento e inovação científica e tecnológica, com um impacto colossal do ponto de vista sócio-económico. Mas a par de todos os avanços técnicos que envolveram esta mudança nos métodos agrícolas e industriais, surgiu um dos maiores inimigos dos ecossistemas e organismos vivos, a poluição. Por definição, a poluição é entendida como a introdução antropogénica, directa ou indirecta, de substâncias, elementos, radiações, vibrações ou ruídos no meio ambiente, provocando um efeito negativo no equilíbrio dos ecossistemas locais, que por sua vez podem ter efeitos funestos nos seres vivos e na saúde humana [24]. Com efeito, a rápida industrialização associada ao aumento das actividades antropogénicas e de práticas agrícolas modernas conduziu ao aumento dos níveis dos agentes poluentes no ambiente, tendo como consequência o despoletar de efeitos tóxicos em praticamente todos os organismos vivos.

Dos agentes tóxicos mais conhecidos pelo Homem e com efeitos mais perigosos destacam-se os metais, nomeadamente os denominados metais pesados. Este tipo de elementos é quimicamente definido como um grupo de elementos com densidade superior a  $4,0 \text{ g/cm}^3$  [8], embora muitos autores discordem na sua classificação. Uma das características principais que distinguem os metais pesados de outros agentes tóxicos é a incapacidade da sua degradação pelo Homem e outros seres vivos, o que constitui um dos principais perigos destes metais para os organismos vivos.

A origem destes poluentes advém principalmente do lançamento de resíduos industriais não tratados no meio ambiente, provenientes do despejo para os efluentes de esgotos das indústrias metalúrgicas, de tintas e pigmentos, de curtumes e de galvanoplastias. A inconsciência ecológica dos grandes empresários que gerem este tipo de fábricas aliada à falta de legislação em muitos países, levou a que durante muitos anos estes metais se acumulassem nos solos e nas águas, tornando este um dos principais problemas ecológicos com que o Homem se depara actualmente.



Os metais peados em questão são de diversos tipos e uma grande parte dos mesmos são essenciais aos seres vivos, desde as bactérias ao ser humano, mas são requeridos em baixíssimas concentrações, na ordem dos microgramas [96], podendo conduzir a danos nos sistemas biológicos quando presentes em concentrações elevadas. Segundo esta perspectiva, os metais podem ser classificados em 3 grupos principais: os elementos essenciais, como por exemplo o sódio, o potássio, o magnésio e o cálcio; os micro-contaminantes ambientais, como o arsénio, o chumbo, o cádmio, o mercúrio, o alumínio e o estanho; e ainda pelos elementos essenciais a alguns seres vivos mas que são concomitantemente micro-contaminantes quando presentes em concentrações elevadas, como é o caso do níquel, zinco, ferro e manganês, elementos essenciais a todas as plantas, e pelo cobalto e crómio, descritos como micronutrientes animais e de alguns microrganismos [83].

É neste último grupo que se inserem os dois metais pesados utilizados neste trabalho, o níquel e o crómio, e por essa razão serão descritas de seguida algumas das suas propriedades químicas, bem como os mecanismos de transporte e de toxicidade destes metais pesados nas plantas.

## **1.2. O Níquel (Ni) e o Crómio (Cr)**

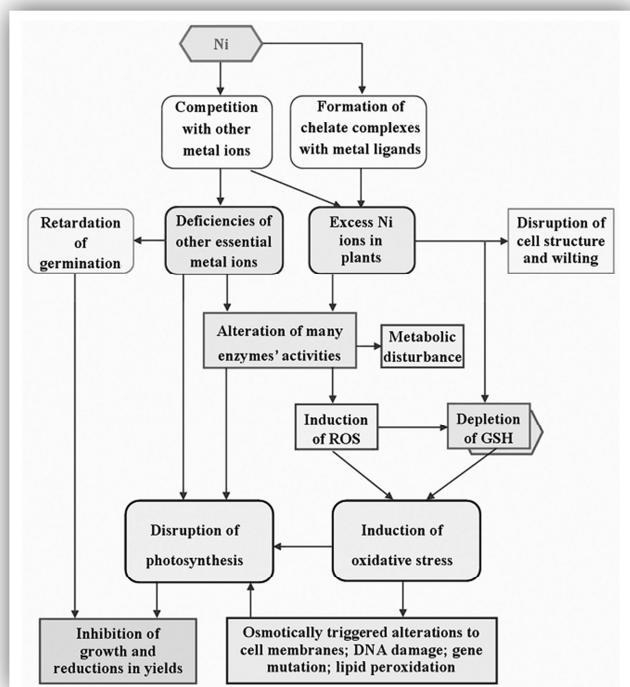
O níquel, um metal de transição, de cor branco-prateada, condutor de electricidade e calor é o 22º elemento mais abundante na crosta terrestre, encontrando-se em rochas ígneas como metal livre ou formando ligas metálicas com o ferro, havendo fortes indícios da sua presença no núcleo da Terra [95]. Para além da sua ocorrência natural, este metal é também lançado no ambiente através de actividades antropogénicas, como exploração mineira, fundições, queima de combustíveis fósseis, emissões de veículos automóveis, resíduos domésticos e industriais, bem como da aplicação de fertilizantes [84]. O Ni pode ser utilizado como matéria-prima em metalúrgicas e galvanoplastias, como catalisador nas indústrias químicas e alimentares e ainda como componente em baterias eléctricas [15]. A poluição derivada deste metal pesado é proveniente das indústrias referidas, e nos últimos anos a contaminação de solos e águas com Ni tornou-se um grande problema a nível global [15]. Este metal é essencial às plantas, mas em

concentrações muito pequenas para a maioria das espécies vegetais, na ordem dos 0,05-10 mg/kg de peso fresco [66].

A nível celular e molecular, o Ni foi identificado como componente de algumas enzimas, como glicosilases, ureases, superóxido dismutases e hidrogenases [26]. Devido à sua importância nutricional, a incorporação e transporte do Ni nas plantas está envolvida em alguns processos fisiológicos importantes. A incorporação deste metal pode ser realizada pelos sistemas radiculares através de difusão passiva ou por transporte activo [15, 91]. Com efeito, os compostos solúveis de Ni podem ser absorvidos através de um sistema de transporte catiónico, mas também pelos transportadores de magnésio, devido ao tamanho e carga semelhantes destes dois iões metálicos. Também é possível o transporte activo secundário de iões de Ni quelatados a permeases de alta afinidade para este metal ou a metalo-chaperonas. A incorporação do Ni depende ainda da sua concentração iónica, do metabolismo da planta, de acidez do solo e da presença de outros metais [15].

No interior das plantas, o transporte de Ni das raízes para a parte aérea e folhas é realizada através do fluxo em massa, via xilema, e fornecida à zona meristemática através de translocação das folhas mais antigas para as mais jovens, via floema [64]. Este transporte é maioritariamente regulado por ligandos metálicos que se ligam especificamente ao Ni, como a nicotianamina, histidina e ácidos orgânicos [15].

Apesar do papel essencial deste nutriente, o Ni presente em elevadas concentrações provoca efeitos tóxicos nas plantas, levando ao aparecimento de respostas comuns de destoxificação deste metal, como indução de ligandos metálicos e da actividade de várias enzimas, e surgem na planta sintomas de toxicidade, como atrasos na germinação, inibição do crescimento da raiz, indução de necrose e clorose foliares e interrupção da fotossíntese [15, 31, 52, 72]. Algumas evidências obtidas em estudos com diversas espécies vegetais apontam para a toxicidade do Ni estar ligada à interferência deste metal com outros iões metálicos essenciais, como por exemplo o ferro, cobre e zinco, e pela indução de stress oxidativo, o que por sua vez conduzirá a danos no DNA e a aumento da peroxidação lipídica [15, 45] (figura 1).



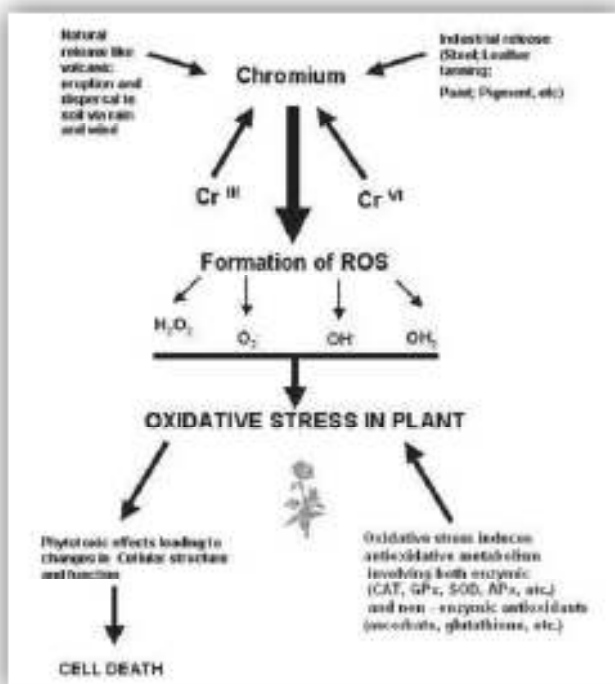
**Figura 1** – Resumo esquemático dos mecanismos envolvidos no efeito tóxico do Ni nas plantas. (retirado de [15])

O crómio, um metal de transição de cor acinzentada, é o 7º elemento mais abundante no nosso planeta, existindo na natureza em dois estados estáveis de oxidação: a forma trivalente, crómio (III), e a forma hexavalente, crómio (VI), que diferem entre si em termos de mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade. Com efeito, o Cr (III) é menos solúvel e menos tóxico que a forma hexavalente, mas pode ser nefasto para as plantas quando presente em altas concentrações [44, 68]. Para além do crómio proveniente dos minérios, este metal pesado é também lançado no meio ambiente através de resíduos de indústrias de produção de ligas de aço inoxidável, de indústrias químicas de curtimento de couro e de produção tintas, e de galvanoplastias [14, 59]. Actualmente, a produção excessiva deste metal pesado nas indústrias referidas tornou o Cr num perigoso poluente ambiental, que afecta o ar, o solo e a água [14].

A incorporação deste metal pelas plantas é diferente para a forma trivalente e para a hexavalente. O Cr (III) é incorporado na planta através de transporte passivo, recorrendo a canais iónicos, enquanto que o Cr (VI) entra na planta por transporte activo, tendo sido já descrito para diversas espécies vegetais o envolvimento dos transportadores de sulfatos na entrada de Cr (VI) para o interior das plantas [89]. Com efeito, em plantas privadas de enxofre, verificou-se um aumento do influxo de Cr (VI), o que indica que este metal pesado competirá com os compostos de sulfato pelos transportadores [46, 89].

No interior das plantas, o Cr (III) poderá ser transportado da raiz para os tecidos aéreos através de ligandos de íons metálicos, via xilema. Já o Cr (VI) é retido nas raízes, onde é convertido em Cr (III), podendo alguma parte ser transportada para a parte aérea quando o nível do metal pesado é extremamente elevado e as raízes deixam de ter disponibilidade para o reduzir a Cr (III) [89].

Apesar de haver indícios do papel do crómio no metabolismo de algumas plantas [92], para a maior parte das espécies vegetais este metal é tóxico e quando presente em elevadas concentrações provoca efeitos nocivos nestas. Com efeito, altas concentrações de crómio limitam o crescimento da planta, provocam cloroses nas folhas jovens e necroses em vários tecidos, e devido à retenção do metal nas raízes ocorrem diversos danos radiculares, que levam também a uma inibição do crescimento. Como já foi referido, a forma Cr (VI) é mais tóxica para a planta que a forma trivalente, em grande parte por afectar a incorporação de nutrientes essenciais ao crescimento da planta, nomeadamente o enxofre, através da competição pelos transportadores de sulfatos [68, 89]. Outro dos efeitos tóxicos extremamente nocivos do Cr (VI) é a libertação de espécies reactivas de oxigénio (EROs), que provocam stress oxidativo, aquando da sua redução a Cr (III) nas raízes. Esse stress oxidativo gerado na redução do Cr (VI) conduz ao desencadear de danos oxidativos na informação genética e em diversas estruturas e funções celulares, podendo mesmo levar à morte das plantas [68, 74, 89] (figura 2).



**Figura 2** – Resumo esquemático dos mecanismos envolvidos no efeito tóxico das formas de Cr nas plantas. (retirado de [68])

### **1.3. Respostas das plantas ao stress**

Devido aos efeitos nefastos que os metais pesados provocam nas plantas, é possível observar nestas algumas respostas que funcionam como bioindicadores de stress, permitindo determinar se um determinado factor provoca ou não alterações na fisiologia da planta. Assim, numa situação de stress por metais pesados, as plantas podem sofrer uma redução no seu crescimento, que se pode manifestar por redução na sua biomassa e inibição do crescimento das raízes e da parte aérea [96]. Outra das consequências do stress para as plantas é o despoletar de stress oxidativo, como referido anteriormente. Para evitar o dano causado pelas EROs, as plantas desenvolveram vários mecanismos antioxidantes, enzimáticos e não-enzimáticos. Um dos mecanismos de defesa não-enzimático que as plantas desenvolveram é o aumento da acumulação de prolina livre. Assim, um aumento do nível de prolina nos tecidos vegetais será um indicador do stress oxidativo que as plantas sofreram com a exposição a um determinado metal pesado [31, 52, 94]. Outro dos efeitos que este tipo de stress provoca nas plantas é a inibição da biossíntese de clorofilas, sendo que a planta tem também como mecanismo de defesa o aumento do nível de carotenóides para fazer face à formação de EROs [27, 70]. Assim, a quantificação destes parâmetros biométricos e bioquímicos nos diversos tecidos de plantas expostas a metais pesados poderá ser um indicador dos efeitos nefastos que os metais possam provocar nestas, e permitirá saber até que ponto as plantas sofreram com este tipo de stress.

### **1.4. A fitorremediação**

O reconhecimento por parte das autoridades internacionais do problema da poluição por metais pesados e a constatação das graves implicações para os seres humanos e para as plantas deste tipo de poluentes, levou à implementação de leis mais rigorosas no controlo das descargas destes metais no meio ambiente e ao reunir de esforços na tentativa de encontrar tecnologias com vista a sanar este grave problema ambiental. Entre os vários métodos de intervenção que se desenvolveram durante vários anos, muitos deles baseados em técnicas de engenharia, encontra-se a fitorremediação,

uma tecnologia recente com um impacto cada vez maior na tentativa de solucionar este problema.

A fitorremediação é entendida como o uso de plantas e dos seus microorganismos associados para limpeza ambiental. Trata-se, pois, de aproveitar a característica natural que as plantas possuem de incorporar e acumular poluentes, e de os remover, reduzir, degradar ou imobilizar, quando presentes no solo ou na água [49, 71, 86, 87].

#### 1.4.1. Poluentes que podem ser fitorremediados

Uma das principais características da fitorremediação é a capacidade de poder ser utilizada numa ampla gama de poluentes, de natureza orgânica ou inorgânica. Os poluentes orgânicos presentes no meio ambiente são maioritariamente antropogénicos e são xenobióticos a todos os organismos vivos. Com efeito, estes compostos poluentes são normalmente lançados no meio ambiente através de derrames de combustíveis e de solventes químicos, sendo também provenientes de actividades militares envolvendo explosivos e armas químicas, de actividades agrícolas, em consequência do uso de herbicidas e pesticidas, e de indústrias petroquímicas e de tratamento de madeiras [71]. Na literatura há registo de vários poluentes orgânicos que foram fitorremediados, como por exemplo solventes orgânicos como o tricloroetileno [65], herbicidas como a atrazina [11], explosivos como o trinitrotolueno (TNT) [24], derivados petrolíferos, como a gasolina, o gasóleo, o benzeno, o tolueno e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) [2, 90] e ainda os policlorobifenilos (PCB) [37]. Já os poluentes inorgânicos, dos quais fazem parte os metais pesados, são provenientes da crosta terrestre e de actividades industriais, agrícolas, mineiras e militares, como já referido anteriormente. Ao contrário dos poluentes orgânicos, os poluentes inorgânicos não podem ser degradados pelos seres vivos, daí a extrema importância da fitorremediação na acumulação e estabilização destes compostos tóxicos [71]. À imagem dos tóxicos orgânicos, há também registo de poluentes inorgânicos que já foram fitorremediados, como por exemplo macronutrientes como os nitratos e os fosfatos [39], micronutrientes como o crómio, níquel, cobre, ferro, zinco, manganês [56, 71] e ainda microcontaminantes como o cádmio, cobalto, flúor, mercúrio, chumbo, selénio e tungsténio [9, 39, 71], sendo também possível a remediação de isótopos radioactivos como o  $^{238}\text{U}$  (urânio), o  $^{137}\text{Cs}$  (césio) e o  $^{90}\text{Sr}$  (estrôncio) [22, 63].

Outra característica deste tipo de tecnologia é que a fitorremediação pode ser utilizada para substratos líquidos, sólidos e gasosos, o que é vantajoso comparativamente a técnicas de escavação dos poluentes, que só podem ser utilizadas em compostos sólidos presentes no solo [71]. Com efeito, há registo da utilização das técnicas de fitorremediação em solos e sedimentos de terrenos militares, campos agrícolas, fábricas, minas e indústrias de tratamento de madeiras [4, 29, 101], de águas poluídas provenientes de esgotos e águas residuais, escoações de minas e aterros sanitários, bem como nos próprios lençóis de água [28, 39, 54, 81]. Adicionalmente, também pode ser utilizada para filtração do ar em locais fechados, constituindo-se como uma alternativa a outras tecnologias de filtração e purificação do ar [43, 61].

#### 1.4.2. Vantagens e limitações

Devido a estas características, a fitorremediação têm vindo a ganhar um impacto e popularidade crescentes ao longo dos últimos anos, quer junto das agências governamentais e dos empresários industriais, quer pela população em geral. O facto da fitorremediação ser “amiga do ambiente” e uma alternativa ecológica aos produtos químicos e escavadoras faz com que a população adira à ideia, e esta maior aceitação leva a que as agências governamentais incluam este tipo de tecnologia nos seus programas de limpeza ambiental e a que as empresas energéticas, prolíferas e químicas invistam cada vez mais fundos no desenvolvimento de técnicas que envolvam esta estratégia ecológica [71]. Esta maior aceitação da fitorremediação está intimamente relacionada com as vantagens que esta oferece do ponto de vista económico. Com efeito, como esta é uma tecnologia que se baseia em processos fisiológicos vegetais em que o gasto energético é a luz solar, para os processos fotossintéticos, a fitorremediação consegue ter custos 10 vezes menores que as demais estratégias de engenharia, que englobam custos com a produção e abastecimento da maquinaria envolvida nas escavações e incinerações do solo. Outra das vantagens é a utilização *in situ* da fitorremediação, o que reduz os seus custos de produção e diminui o grau de exposição dos poluentes ao meio ambiente e aos seres humanos [71]. Assim, a falta de recursos normalmente disponíveis para limpeza ambiental e o relativo baixo custo da fitorremediação fazem desta alternativa uma estratégia de importância crescente. Mas apesar de todos estes pontos favoráveis, quando se analisam os custos inerentes à

descontaminação ambiental constata-se que os custos financeiros que envolvem as tecnologias de engenharia são muito maiores. No caso norte-americano, os custos envolvidos no uso da fitorremediação estão na ordem dos 100-150 milhões de dólares, o que constitui apenas cerca de 0,5% do valor gasto anualmente em remediação ambiental [34]. Na Europa, não existe ainda um uso comercial da fitorremediação, embora alguns autores considerem que esta situação irá mudar nos próximos anos, devido à importância científica que este tema começa a ganhar, havendo já muitos grupos de investigação a desenvolverem esforços na busca de conhecimentos sobre o funcionamento dos processos fisiológicos que envolvem esta tecnologia. Esta alternativa afigura-se como a ideal no caso dos países da Europa de Leste, onde existem locais que necessitam de uma urgente destoxificação ambiental, devido aos seus baixos custos e à facilidade da sua implementação, componente sócio-económica esta que poderá potenciar o crescimento e a implementação da fitorremediação [71].

Mas apesar das vantagens supracitadas relativamente às demais estratégias de descontaminação, a fitorremediação apresenta também diversas limitações. Uma das desvantagens reside no facto da planta que realiza a fitorremediação ter de estar no local onde o poluente se encontra, o que torna necessário que as propriedades do solo, o clima e o grau de toxicidade no solo permitam o crescimento da planta, o que por vezes é extremamente difícil devido ao elevado grau do tóxico no solo. Outro factor que limita a aplicabilidade desta técnica é o comprimento das raízes, já que estas têm de ser suficientemente longas para atingir o local onde o poluente se encontra [62]. Uma outra limitação da fitorremediação comparativamente aos métodos de escavação ou incineração é que este processo é mais lento, devido à necessidade da planta crescer e se desenvolver nesse solo e porque a própria acumulação do poluente pode demorar anos. Também a biodisponibilidade do poluente pode constituir um revés em termos de aplicação da fitorremediação, uma vez que alguns métodos inerentes a esta técnica necessitam de todo o poluente disponível, o que contrasta com grande parte das situações, em que apenas uma fracção do tóxico está livre para poder ser absorvido pela planta [71].

Este tipo de limitações no uso da fitorremediação tem conduzido a um reunir de esforços por parte da comunidade científica em contornar estas dificuldades, de modo a poder tornar a fitorremediação uma estratégia preponderante e não apenas uma alternativa aos restantes métodos. Outro ponto importante e que na maioria dos casos não é referido é que estes métodos de fitorremediação e os baseados em engenharia não

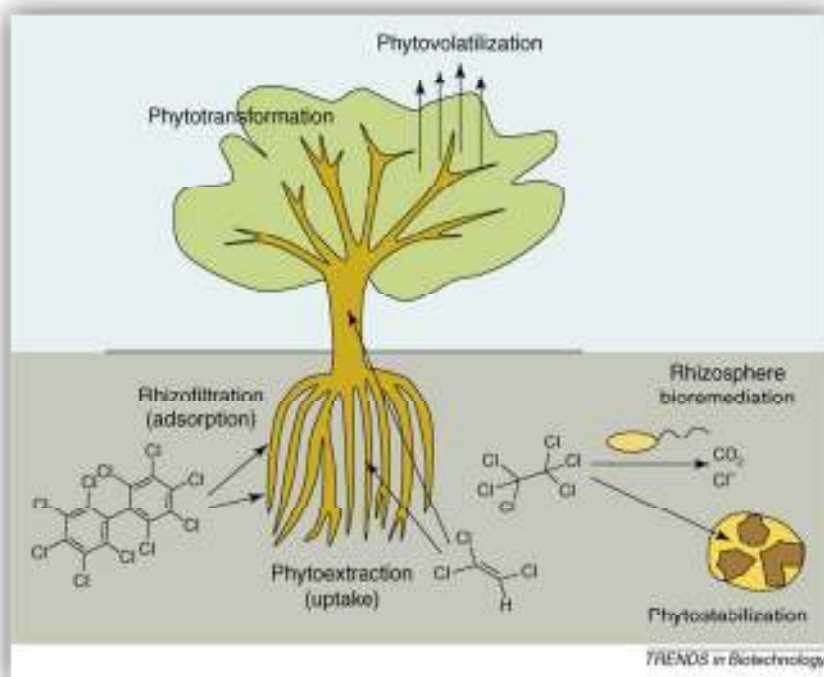


são completamente independentes, podendo ser mais eficaz e mais vantajosa economicamente uma conjugação de diferentes tecnologias, como por exemplo no caso da escavação da maioria de um poluente no solo e posterior utilização de plantas para fitorremediar o poluente restante, permitindo desta forma contornar as maiores limitações inerentes a estas duas tecnologias [71].

### 1.4.3. Mecanismos e processos fisiológicos inerentes

Do ponto de vista fisiológico, a fitorremediação possui vários subgrupos de tecnologias que podem envolver diversos mecanismos fisiológicos, nomeadamente a rizofiltração, a fitoestimulação, a fitodegradação, a fitovolatilização, a fitoestabilização e ainda a fitoextração [71, 75], como se encontra esquematizado na figura 3.

Assim, a rizofiltração é, como o próprio nome indica, o uso das raízes das plantas para filtrar e concentrar os contaminantes da água ou de resíduos aquosos correntes, mas devido aos seus elevados custos de implementação e por necessitarem de plantas com sistema radicular fibroso, é apenas aplicada no caso de pequenos volumes de águas residuais contaminadas com poluentes perigosos, como radioisótopos ou metais pesados como o chumbo ou cádmio [23, 24, 63].



**Figura 3** – Esquema exemplificativo dos mecanismos e das tecnologias de fitorremediação. (retirado de [99])

A fitoestimulação diz respeito à capacidade das plantas libertarem para o solo determinados compostos que podem estimular a actividade microbiana dos microrganismos da rizosfera, podendo levar à degradação ou transformação do tóxico num composto inofensivo. Esta técnica pode ser aplicada numa vasta gama de poluentes orgânicos hidrofóbicos que não podem ser captados pelas plantas mas que são facilmente degradados pela população microbiana existente no solo, como por exemplo os PCB, os PAH e vários hidrocarbonetos derivados do petróleo [42, 58, 67, 71].

Já a fitodegradação ou fitotransformação é o processo pelo qual as próprias enzimas da planta são utilizadas para degradar os tóxicos, num processo semelhante ao realizado pelos microrganismos da rizosfera, podendo ser aplicada no caso dos herbicidas, do tricloroetileno e do TNT [10, 58, 71].

A fitovolatilização é um processo que se baseia na capacidade das plantas absorverem compostos orgânicos voláteis, como o TCE, ou inorgânicos como o selénio e o mercúrio, e os libertarem pelas folhas após terem sido transformados enzimaticamente [36, 71, 82].

Um outro tipo de mecanismo é a fitoestabilização dos compostos tóxicos, que consiste na capacidade que certas plantas têm de imobilizar contaminantes no solo, em sedimentos ou na água através de processos de adsorção radicular ou de precipitação na rizosfera. Neste tipo de processos estão envolvidos exsudados radiculares que permitem a conversão do poluente numa forma biologicamente não tóxica, sendo que esta técnica pode ser utilizada para estabilizar locais contaminados, prevenindo a erosão e lixiviação dos solos contaminados por acção de chuvas ou do vento [24, 71].

Uma outra tecnologia associada à fitorremediação é a fitoextração, uma das técnicas mais usadas e mais importantes de descontaminação realizada pelas plantas, uma vez que consiste na remoção dos poluentes pelas raízes e na translocação e acumulação destes nos tecidos aéreos das plantas, que podem posteriormente ser colhidos e utilizados em refinarias e na produção de energia em centrais termoeléctricas. A fitoextração é maioritariamente utilizada na remoção de metais pesados e outros tóxicos inorgânicos, como o selénio, o arsénio e os radioisótopos [5, 9, 71]. Como no caso dos metais pesados o mecanismo mais utilizado e estudado para remoção dos poluentes é a fitoextração, será este o processo maioritariamente abordado neste trabalho, nomeadamente a sua possível utilização na acumulação e remoção de níquel e crómio.

## 1.5. Plantas hiperacumuladoras – *Solanum nigrum* L.

Concomitantemente ao aparecimento das técnicas de fitoextração surgiu o conceito de plantas hiperacumuladoras, ou seja, aquelas que são capazes de acumular metais em concentrações muito elevadas na sua parte aérea, em condições de habitat natural, normalmente cerca de 100 vezes mais que as plantas não-acumuladoras [77]. Este tipo de capacidade de concentrar metais em tão elevada concentração é entendida como uma resposta fisiológica extrema das plantas, de tolerância a metais pesados [13].

Actualmente estão descritas cerca de 400 plantas que hiperacumulam metais, sendo que este número poderá aumentar num futuro próximo, graças ao enorme estudo a que este tipo de plantas está sujeita actualmente [78]. Estão já documentadas plantas com capacidade de acumular metais como o arsénio, chumbo, cobalto, cobre, manganês, selénio, zinco e também o níquel [3, 57, 71].

Os níveis normalmente aceites para considerar uma planta como hiperacumuladora variam consoante o metal em questão e consoante o tipo de papel fisiológico desses metais, i.e., se são ou não micronutrientes essenciais para a planta, sendo considerada uma concentração de 1% do peso fresco da planta para o zinco, de 0,1% para o níquel, cobalto, cobre e chumbo e de 0,01% para o cádmio [3].

Apesar desta aparente vantagem em acumular metais pesados em concentrações elevadas, as plantas hiperacumuladoras não são normalmente as preferidas para realizar fitorremediação, uma vez que apresentam um crescimento muito lento e uma biomassa baixa, não preenchendo alguns dos requisitos fundamentais para poderem ser utilizadas para remediação ambiental. Outro factor que faz com que estas plantas não possuam ainda uma grande preponderância no tratamento de tóxicos no ambiente é o pouco conhecimento que há actualmente sobre os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos neste tipo de resposta de tolerância ao stress por metais pesados. Assim, a espécie ideal para fins de fitorremediação deverá ser aquela que possua elevada biomassa e uma alta taxa de acumulação de um dado metal nos seus tecidos aéreos [24].

Dentro deste grupo de plantas poderá ser incluída a espécie *Solanum nigrum* L., vulgarmente conhecida como erva-moura, uma espécie recentemente classificada como hiperacumuladora de cádmio e zinco [94]. Esta planta é herbácea, de origem sul-americana, mas com distribuição cosmopolita e as suas características morfológicas

principais são as suas folhas com margens dentadas e inserção alterna de uma folha por nó, flores brancas e frutos pendentes de cor negra quando maduros [25], como se pode observar na figura 4.



**Figura 4** – Fotografia de um exemplar da espécie *Solanum nigrum* L.  
(retirado de [www.agroatlas.ru](http://www.agroatlas.ru))

Esta planta tem um crescimento rápido e uma elevada biomassa na parte aérea, o que a torna mais vantajosa para realizar fitorremediação que as demais hiperacumuladoras de cádmio e zinco, aliado ao facto de poder crescer em ambientes extremos [94]. Por ser uma planta que consegue acumular cádmio e zinco em concentrações elevadas poderá ser a indicada para fitorremediar solos contaminados com metais pesados, apesar da pouca informação existente actualmente sobre os mecanismos fisiológicos que a planta terá desenvolvido para tolerar estes metais de modo tão eficiente.

Devido às vantagens na utilização desta espécie vegetal na acumulação de cádmio e zinco, foi esta a planta seleccionada no presente trabalho para realizar os estudos de exposição a níquel e crómio, onde se pretende verificar a hipótese desta espécie poder ser também uma hiperacumuladora de níquel e/ou crómio, ou se esta característica está confinada aos metais cádmio e zinco.

Este tipo de resposta de tolerância das plantas ao stress por metais pesados envolve vários tipos de transportadores de metais, de ligandos e agentes quelantes que possibilitam a extracção e acumulação dos poluentes metálicos nos tecidos vegetais. Com efeito, estão já descritas várias famílias de proteínas com um papel importante no transporte de metais dentro das plantas, dados estes maioritariamente provenientes de mutantes de um dado transportador, possibilitando um reunir de informações sobre o tipo de transporte e o tipo de metais que cada família de proteínas consegue transportar [19]. Mas para além destas proteínas de transporte, estão presentes nas plantas vários tipos de ligandos de baixa massa molecular e algumas proteínas que se ligam aos iões metálicos, estando por isso envolvidos no processo de acumulação dos metais pesados. Entre esses compostos encontram-se a histidina, os fitosideróforos [13], os ácidos carboxílicos [98], as fitoquelatinas e as metalotioninas [18]. Estes dois últimos ligandos são aqueles cujo papel é mais importante em termos de fitorremediação e para os quais há maior número de estudos a decorrer. No caso das metalotioninas, devido à relevância destas na fitoextracção de metais pesados e por serem o objecto de estudo do presente trabalho, serão descritas mais pormenorizadamente de seguida.

## **1.6. As metalotioninas**

Como já foi referido anteriormente, as plantas desenvolveram várias estratégias para lidar com os poluentes metálicos, sendo uma delas a captação e acumulação dos metais, recorrendo para isso a vários tipos de ligandos. Os dois tipos de ligandos mais estudados são as fitoquelatinas (PC) e as metalotioninas (MT), polipéptidos ricos em cisteína, distinguindo-se pelo modo como se processa a sua síntese. Assim, as MT são codificadas por uma família de genes, enquanto que as PC são sintetizadas enzimaticamente [18].

Apesar das diferenças entre estes dois tipos de ligandos, ao longo de muitos anos a sua distinção foi muito confusa. Com efeito, as MTs foram primeiramente caracterizadas em animais, e seguiu-se a tentativa de encontrar nas plantas proteínas similares às MTs animais. Mas sempre que se procedia a este tipo de estudo, em vários tipos de plantas, os resultados que se obtinham eram a identificação de fitoquelatinas. Como estas partilhavam com as MTs animais características como serem induzidas

pelos metais pesados e se ligarem a estes, serem polipéptidos ricos em cisteína e não haver na altura evidências da existência de MTs nas plantas, foi sugerido que as fitoquelatinas fossem funcionalmente análogas às MTs animais. Durante muitos anos persistiu a noção de que as fitoquelatinas eram os ligandos específicos das plantas e as metalotioninas os ligandos característicos dos animais [18].

Muitos estudos se seguiram envolvendo esta problemática, onde foi possível encontrar os genes MT em plantas, apesar de sempre referidos como *MT-like genes*, e observar a expressão dos dois tipos de ligandos em microrganismos. Apesar de todas estas evidências, a derradeira prova que permitiu ultrapassar a distinção destes dois tipos de ligandos foi o isolamento dos genes que codificam a enzima PC sintetase em plantas e a descoberta dos seus homólogos em espécies animais [18, 24].

Estas novas conclusões permitiram obter uma visão mais clara sobre a existência de ambos os tipos de ligandos nos animais e nas plantas, mas levantaram um problema de nomenclatura. As fitoquelatinas, por não serem específicas das plantas e terem sido primeiramente descobertas em leveduras, foram tendo ao longo do tempo várias designações alternativas, entre elas o de MT de classe III, mas aquela que perdurou, talvez por incluir a história curiosa desta investigação foi mesmo a de fitoquelatinas, que permite distinguir facilmente os dois tipos de ligandos metálicos [18].

### 1.6.1. Funções das MTs

A análise das funções das MTs nas plantas não se afigura uma tarefa fácil, muito devido ao pouco conhecimento que se possui actualmente acerca destas proteínas, e devido à existência de um enorme número de famílias de MTs. Outro factor que dificulta o estudo deste tipo de ligandos é a elevada semelhança proteica entre as diversas MTs e o tamanho reduzido destas proteínas.

Uma das poucas funções que se conhecem das MTs vegetais é o seu envolvimento na tolerância e homeostasia do cobre, havendo também indícios do seu envolvimento na homeostasia de outros metais [18]. Os dados que apoiam esta função das metalotioninas é o facto destas serem proteínas de ligação ao cobre em *Arabidopsis*, da expressão dos seus genes ser induzida por este metal e devido à expressão dos seus genes nas folhas senescentes desta espécie ser coordenada com a expressão de outros genes envolvidos na homeostasia do cobre. Outra evidência adicional é que as fitoquelatinas não

conferem qualquer tipo de tolerância a este metal, sugerindo que deverão ser as MTs as proteínas envolvidas neste processo, embora outros factores possam estar também envolvidos [18].

Nas restantes espécies vegetais há apenas indícios do seu papel na quelatação e transporte de vários metais, nomeadamente o cádmio e zinco [35], devido à sua composição rica em cisteína, embora esta informação seja ainda muito dispersa e seja muitas vezes contraditória.

### 1.6.2. Classificação das MTs

A classificação das MTs é um dos assuntos mais controversos que envolvem o estudo destas proteínas. Como em termos estruturais todas as MTs são compostas por dois domínios de ligação a metais, ricos em cisteína, que lhes conferem uma conformação semelhante a um haltere, as várias classificações propostas ao longo dos anos baseiam-se no arranjo dos resíduos de cisteína [16, 18, 30].

Uma das primeiras classificações que surgiram dividiam as MTs em 3 classes. Assim, as MT de classe I são as que possuem 20 resíduos de cisteína muito conservados, baseados nas MTs animais, principalmente as dos vertebrados. A classe II contem as MTs que não possuem o arranjo característico da classe anterior, fazendo parte desta classe MTs de plantas, fungos e animais não-vertebrados. Mais tarde foi adicionada a classe III, a designação dada neste modelo de classificação às fitoquelatinas [18, 30].

Após a identificação das MTs no trigo, vários genes que codificam MTs foram isolados em plantas, o que levou a que diversas classificações alternativas fossem propostas, uma vez que a maioria das proteínas deduzidas não se podiam incluir em nenhuma das classes anteriormente descritas [7, 55, 76, 80].

Apesar de inúmeras classificações terem sido propostas e actualmente haver ainda muita entropia no que a este tema diz respeito, a classificação actualmente mais aceite e seguida pelos investigadores desta área é a proposta por C. Cobbert e P. Goldsbrough [18], baseada na classificação proposta por Robinson *et al.* [80]. Esta classificação engloba todas as MTs conhecidas em plantas, dispondo-as em 4 tipos principais, baseando-se na sua sequência aminoacídica, nomeadamente no arranjo dos seus resíduos de cisteína.

As MTs do tipo 1 possuem 6 motivos Cys-Xxx-Cys (em que Cys representa o aminoácido cisteína e Xxx outro qualquer aminoácido), distribuídos igualmente por 2 domínios. Na maioria destas MTs, estes dois domínios estão separados por cerca de 40 aminoácidos, incluindo aminoácidos aromáticos, característica esta própria das MTs de plantas.

As MTs do tipo 2 contêm também 2 domínios ricos em cisteína, separados por 40 aminoácidos, sendo que a característica que as distingue das MT1 é que o primeiro par de cisteínas apresenta-se sob a forma de um motivo Cys-Cys, nas posições aminoacídicas 3 e 4. Outra característica das MT2 é a presença do motivo Cys-Gly-Gly-Cys no final da porção N-terminal do domínio rico em cisteína, enquanto que a porção C-terminal deste domínio possui 3 motivos Cys-Xxx-Cys.

Já as MTs do tipo 3 contêm apenas 4 resíduos de cisteína na porção N-terminal do domínio rico em cisteína. A sequência consenso dos 3 primeiros resíduos é Cys-Gly-Asn-Cys-Asp-Cys, ao passo que a quarta cisteína faz parte de um motivo altamente conservado Gln-Cys-Xxx-Lys-Lys-Gly. Na porção C-terminal, estão presentes 6 resíduos de cisteína dispostos em motivos Cys-Xxx-Cys. Como na maioria das MTs do tipo 1 e 2, também nestas proteínas os 2 domínios estão separados por cerca de 40 resíduos aminoacídicos.

As MTs do tipo 4 diferem dos restantes tipos por possuírem 3 domínios ricos em cisteína, cada um deles composto por 5 ou 6 resíduos de cisteína conservados em motivos Cys-Xxx-Cys, separados por 10-15 aminoácidos [18, 30, 103].

A maioria dos genes MT das plantas foi identificada em Angiospérmicas, sendo que algumas espécies, como *Arabidopsis* e o arroz, possuem genes que codificam todos os 4 tipos de MTs, o que indica que a evolução destas proteínas precedeu a separação entre monocotiledóneas e dicotiledóneas, sendo expectável que as plantas com flor possuam os 4 tipos de proteínas MT. Esta situação parece indicar uma função importante das metalotioninas no que diz respeito à homeostasia de metais pesados [18].

Esta classificação proposta foi apoiada pelos dados provenientes da determinação das sequências de um pequeno número de genes MT. Em termos estruturais, quase todos os genes MT contêm um intrão localizado na posição N-terminal, embora a posição destes intrões varie consoante o gene em questão, sendo que a posição do intrão é diferente consoante o tipo de MTs que codificam. Estes dados provieram de estudos maioritariamente realizados em *Arabidopsis thaliana*, e mais recentemente de estudos com tomate e arroz, devido aos projectos de sequenciação do genoma destas duas



espécies, onde foi possível observar que os genes MT estão distribuídos em vários cromossomas, embora existam evidências da presença de agregados de genes (*gene clustering*) no algodão, onde foram identificados 3 genes MT num fragmento de DNA genómico com 10 kb [33, 41].

### 1.6.3. Acumulação e distribuição dos transcritos das MTs

No que diz respeito à expressão e distribuição dos transcritos dos genes MT em plantas, vários estudos permitiram tirar algumas ilações sobre o modo de distribuição destes transcritos, quer a nível tecidular, quer a nível da fase de desenvolvimento da planta. Este tipo de estudos foi realizado recorrendo à expressão de genes repórter e a hibridações *in situ* [18].

A acumulação dos transcritos das MT1 é normalmente mais elevada nas raízes, comparativamente com o nível observado na parte aérea das plantas, ocorrendo uma situação inversa no caso dos transcritos das MT2. Os transcritos das MT do tipo 3 são acumulados em elevado nível nos frutos enquanto amadurecem [17, 50, 79]. Já a distribuição dos transcritos das MT4 é confinada às sementes em desenvolvimento. Os genes que codificam estas MTs contêm sequências do promotor com homologia aos elementos de resposta ao ácido abscísico (ABA), sendo que a sua expressão é regulada pelo ABA [100]. Este facto sugere uma possível rede de relação entre as MTs e as hormonas vegetais na regulação da homeostasia dos metais pesados. Além deste tipo de transcritos, foram também observados transcritos dos outros tipos de MTs nas sementes em desenvolvimento.

Além desta distribuição dos transcritos das MTs segundo o seu tipo, também foi verificada uma distribuição dos transcritos de várias MTs em tecidos num estado de desenvolvimento específico. Com efeito, no caso das plântulas jovens os transcritos de MTs constituem cerca de 3% do total de transcritos [18]. Também foi observado um elevado nível de acumulação de transcritos de MTs nos tricomas de *Arabidopsis*, o que poderá ser explicado pelo facto de metais pesados, como o cádmio, se acumularem nessas estruturas. Outra explicação reside na presença de diversas enzimas de ligação a metais nos tricomas, podendo a acumulação de transcritos de MTs estar relacionada com a remobilização dos metais para estas células [85].

Foi também observado um grande aumento dos níveis de transcritos de MTs em folhas em senescência, o que poderá estar relacionado com a possível função das metalotioninas no sequestro do cobre e de outros metais libertados pelas proteínas metálicas que são degradadas nas folhas senescentes, sendo que sem a presença destes ligandos os metais ficariam livres e poderiam despoletar cascatas de reacções que poderiam conduzir a dano oxidativo e comprometer o processo de morte celular programada [32, 40]. Outra evidência da participação destas proteínas nos processos de morte celular programada é a sua aparente participação em processos como a abscisão foliar e a resposta hipersensível a agentes patogénicos [12, 20].

Foram também já observados e descritos efeitos de vários factores ambientais na acumulação de transcritos de MTs vegetais. De facto, há evidências do efeito de metais como o cobre e o zinco na indução da acumulação de transcritos de MTs em várias espécies vegetais, tendo sido também observada uma indução da acumulação de transcritos de MTs na presença de cádmio e alumínio e por outro tipo de stresses, como privação de nutrientes e choque térmico, o que parece indicar que os transcritos de MTs possam também ser acumulados numa resposta geral ao stress, não se conhecendo ainda quais as MTs que estão envolvidas neste tipo de respostas [18, 40, 93]. No que diz respeito a este tema, a informação existente é ainda muito dispersa e por vezes mesmo contraditória.

#### 1.6.4. Distribuição das MTs nas plantas

A primeira evidência da existência de MTs em plantas foi a purificação da proteína Ec do trigo, uma MT4, proveniente de embriões, tendo sido descrita como uma proteína de ligação ao zinco [48]. A partir desta descoberta, o grande fluxo de informação que foi sendo gerado acerca dos genes MT não foi acompanhado pelo aumento de conhecimento sobre a acumulação, distribuição e caracterização destas proteínas nos tecidos vegetais.

As primeiras evidências surgiram com a purificação de fragmentos derivados das MT1a, MT2a, MT2b e MT3 de *Arabidopsis*, embora esta purificação tenha sido realizada em condições anaeróbicas, uma vez que uma das maiores dificuldades na identificação e caracterização das MTs em plantas advém da sua instabilidade na presença de oxigénio.

Outro tipo de observações foi feito quando se expressaram os vários tipos de MTs em sistemas microbianos, de modo a estudar as características da ligação destas moléculas aos metais e aferir se estas proteínas estão envolvidas na resposta de tolerância a estes. Esses dados permitiram verificar que as MTs vegetais podem conferir funções biológicas de tolerância a metais, embora existam ainda pouco estudos realizados nos próprios sistemas vegetais [18].

Estes estudos vieram confirmar aquilo que já era esperado sobre a importância das MTs na tolerância a metais pesados, embora haja actualmente muito pouca informação sobre a distribuição destas proteínas nas plantas e muito esteja ainda por realizar neste campo.

## **1.7. Objectivos do trabalho**

Apesar da importância crescente que a fitorremediação tem vindo a adquirir nos últimos anos, há ainda uma enorme lacuna no conhecimento dos processos fisiológicos e das interações das plantas com o meio ambiente envolvente, no que concerne à tolerância destas aos metais pesados e à sua capacidade de os acumular e de descontaminar solos e água. Assim, o continuar das investigações nesta área poderá beneficiar de uma abordagem multidisciplinar, com equipas formadas por especialistas de várias áreas, como biólogos moleculares, fisiologistas vegetais, bioquímicos e microbiólogos.

Este trabalho teve como principal finalidade o estudo do papel das metalotioninas no processo de tolerância de *S. nigrum* expostas a concentrações elevadas de níquel e crómio. Esta tarefa desdobrou-se em 4 objectivos principais.

Num primeiro plano foi estudada a hipótese das plantas *S. nigrum* acumularem níquel e/ou crómio nos seus tecidos e até que ponto é que essa acumulação permitiria considerar esta espécie como uma hiperacumuladora destes dois metais pesados, à imagem do que acontece para o cádmio e zinco, e aferir a possibilidade da sua utilização em processos de fitorremediação de Ni e Cr.

Outro dos objectivos traçados para este trabalho foi a discriminação do papel das metalotioninas na homeostasia do Ni e Cr, verificando até que ponto altas concentrações

destes metais pesados induziam a acumulação (específica) de transcritos destas proteínas e analisando o efeito destas concentrações elevadas de metais pesados nos processos fisiológicos vegetais.

Devido à enorme dispersão de conhecimento que há actualmente acerca do papel deste tipo de ligandos nas plantas, este trabalho também pretendeu tentar obter algumas respostas para uma das grandes questões que se colocam na investigação das metalotioninas: se existe ou não uma especificidade no papel de uma determinada metalotionina na tolerância e homeostasia de um dado metal ou grupo de metais, ou se por outro lado estas proteínas são de resposta geral ao stress e não são especificamente induzidas por qualquer metal pesado. Há diversas opiniões divergentes sobre esta especificidade das MTs no seio comunidade científica e este trabalho poderá contribuir para clarificar este papel atribuído às metalotioninas.

Com base nos resultados obtidos, nomeadamente após a constatação da indução específica da acumulação de transcritos da MT2c pelo Ni, foram elaboradas construções génicas que permitissem a produção de *S. nigrum* transgénicas com a expressão desta MT silenciada especificamente, para assim se poder verificar o efeito da falta desta MT nas plantas expostas a níquel, i.e., a possível falta de função que esta mutação confere, podendo estes dados complementar a teoria da especificidade do papel da MT2c na homeostasia e tolerância do Ni.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 2.1. Determinação dos níveis dos metais pesados a utilizar nos estudos com *S. nigrum*

#### 2.1.1. Germinação de sementes de *S. nigrum*

As sementes de *S. nigrum* utilizadas nestes ensaios foram esterilizadas superficialmente numa solução de etanol a 70%, com agitação constante, durante 3 minutos. Posteriormente, estas sementes foram colocadas em placas de Petri esterilizadas, contendo 2 discos de papel de filtro esterilizado. Por placa, foram dispostas várias dezenas de sementes e adicionados 5 mL de uma solução nutritiva esterilizada por filtração, a Solução de Hoagland [96], suplementada com concentrações crescentes dos metais em estudo: 0  $\mu\text{M}$  (controlo); 0,5  $\mu\text{M}$ ; 7,5  $\mu\text{M}$ ; 30  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de níquel; 0  $\mu\text{M}$  (controlo); 125  $\mu\text{M}$ ; 250  $\mu\text{M}$ ; 375  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  de crómio (III) ou crómio (VI).

As placas foram inicialmente incubadas a 4°C, na obscuridade, durante 3 dias para promover a sincronização da germinação (período de estratificação), sendo posteriormente incubadas a 23°C, numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16h de luz/8h de obscuridade, durante 30 dias.

#### 2.1.2. Biometria das plantas expostas a concentrações crescentes de metais pesados

Após os 30 dias de incubação, calculou-se a percentagem de germinação por contagem do número total de sementes colocadas num placa e o número de sementes que germinaram. Foram seleccionadas 5 plântulas, representativas da população de um determinado tratamento, e determinou-se a massa total, o comprimento da raiz e a altura (comprimento da parte aérea) das mesmas.

## **2.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de plantas de *S. nigrum* a níveis elevados de metais pesados**

### 2.2.1. Condições de crescimento

Plântulas de *S. nigrum* com cerca de 30 dias após germinação, foram colocadas a crescer em cultura hidropónica durante 4 semanas e sujeitas a diferentes tratamentos. Para tal, foram colocadas em vasos de plástico (2 plântulas por vaso), utilizando-se como substrato uma mistura de vermiculite e perlite (2:1), tendo sido dispostos 6 vasos num tabuleiro (originando 12 plantas por cada tabuleiro). Tendo em conta os tratamentos previstos, prepararam-se na totalidade 3 tabuleiros para cada metal a ser testado. Foi utilizada a solução de Hoagland [96] como solução nutritiva, e as plântulas cresceram em 3 situações distintas: situação controlo (sem exposição ao metal pesado); tratamento prolongado por exposição a 7,5 µM de níquel; e uma outra situação de tratamento que consistiu num curto tratamento de choque (durante a última semana dos tratamentos) a plantas com cerca de 3 semanas, por exposição a uma concentração de 100 µM de níquel. Esta metodologia foi repetida para o crómio (III) e crómio (VI), ou seja, situação controlo; tratamento prolongado por exposição a 375 µM de crómio (III) e (VI) e tratamento prolongado por exposição a 1000 µM de crómio (III) e (VI). O níquel foi adicionado à solução nutritiva sob a forma de sulfato de níquel hexahidratado ( $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), o crómio (III) sob a forma de sulfato de crómio e potássio dodeca-hidratado [ $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ] e o crómio (VI) sob a forma de dicromato de dipotássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). As soluções nutritivas foram renovadas 2 vezes por semana, nas 3 primeiras semanas, e 3 vezes durante a última semana de tratamentos.

As plantas foram mantidas nestas condições a 23°C, numa câmara de crescimento com um fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de obscuridade.

### 2.2.2. Biometria das plantas expostas a concentrações elevadas de metais pesados

Após 4 semanas de tratamento, as plantas foram removidas dos vasos e seleccionaram-se pelo menos 3 plantas representativas de cada grupo (tratamento), tendo sido determinadas as médias para a biomassa total e biomassa seca da raiz e da parte aérea, o conteúdo hídrico (% H<sub>2</sub>O), o comprimento da raiz e a altura da parte aérea da planta.

O material biológico foi congelado em azoto líquido e posteriormente homogeneizado e reduzido a pó, utilizando também azoto líquido, tendo sido guardado a -80°C, em tubos cónicos de 50 mL, para futuras análises.

### 2.2.3. Quantificação da concentração dos metais nos tecidos vegetais

De modo a determinar os níveis de Ni ou de Cr (III) presentes na raiz e na parte aérea das plantas de *S. nigrum* tratadas com estes metais pesados, o material vegetal foi lavado com água corrente, seguida de uma lavagem com HCl 0,1 M e uma última lavagem com água bidestilada e desionizada. O material vegetal foi posteriormente seco e reduzido a pó e guardado à temperatura ambiente. Realizou-se uma digestão ácida com auxílio de microondas, de modo a libertar os metais quelatados a proteínas e outras estruturas biológicas, tendo-se obtido extractos ácidos destes metais. Nos ensaios de quantificação foram utilizados até 500 mg da massa digerida anteriormente e foram utilizadas diferentes técnicas espectrométricas, dependendo do nível de metal acumulado nos tecidos vegetais. Assim, foram realizadas três técnicas distintas, com graus de sensibilidade diferentes: espectroscopia de absorção atómica com atomização por chama (para concentrações do metal > 3 mg/L); espectroscopia de absorção atómica com atomização electrotérmica (em câmara de grafite) (para concentrações do metal > 0,004 mg/L no extracto ácido) ou espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (para concentrações do metal > 0,0002 mg/L no extracto ácido). Os resultados foram expressos em µg/g tecido.



#### 2.2.4. Determinação do nível de peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica foi determinado recorrendo à quantificação do malondialdeído (MDA) presente nos diferentes tecidos em análise, de acordo com o descrito por Heath *et al.* [38], com algumas variações. Num almofariz contendo areia de quartzo, homogeneizaram-se cerca de 400-500 mg de tecido vegetal numa solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v), tendo-se seguido a proporção de 1 mL de TCA 0,1% (p/v) por cada 200 mg de material vegetal. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000xg durante 5 minutos. Após a centrifugação, 250 µL de cada sobrenadante foram transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de uma solução ácido tricloroacético (TCA) 20% (p/v) e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (p/v) (TBA/TCA). Foram preparados 3 tubos (repetições) para cada amostra e um tubo branco, contendo 250 µL de TCA 0,1% (p/v) e 1 mL da solução TCA/TBA, tendo este sofrido, a partir deste ponto, o mesmo tratamento que as restantes amostras. Procedeu-se, de seguida, à incubação dos tubos a 95°C durante 30 minutos, tendo sido posteriormente arrefecidos em gelo durante 10 minutos, e os tubos foram centrifugados a 10000xg, durante 15 minutos. Realizou-se, de seguida, a leitura das absorvâncias a 532 nm e 600 nm. O valor de absorvância a 600 nm foi subtraído ao valor a 532 nm para eliminar os efeitos da turbidez não específica. A concentração de MDA foi calculada considerando  $\epsilon = 155 \text{ nM.cm}^{-1}$ , e expressa em nmol/g peso fresco (p.f.).

#### 2.2.5. Quantificação da acumulação de prolina

A determinação do teor de prolina livre existente nos diferentes tecidos vegetais das plantas sujeitas aos tratamentos anteriormente referidos foi realizada segundo o método descrito por Bates *et al.* [6], com algumas modificações. Num almofariz contendo areia de quartzo, homogeneizaram-se cerca de 150-200 mg de tecido vegetal em 3 mL de ácido 5-sulfosalicílico 3% (p/v). Os homogeneizados foram recolhidos para tubos de centrífuga e centrifugados a 720xg durante 10 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se 1 mL de cada sobrenadante para tubos de vidro rolhados e fez-se reagir o sobrenadante com 1 mL de ácido acético glacial e com 1 mL de ninidrina ácida<sup>1</sup>,

---

<sup>1</sup> Para preparar a solução de ninidrina ácida dissolveram-se 1,25 g de ninidrina em 30 mL de ácido acético glacial aquecido, e adicionaram-se 20 mL de ácido fosfórico 6 M.

durante 1 hora a 100°C. Os tubos foram posteriormente arrefecidos em gelo e adicionaram-se 2 mL de tolueno, tendo-se agitado vigorosamente para permitir uma emulsão fina. Após a separação completa das fases à temperatura ambiente, recolheu-se com uma pipeta de Pasteur de vidro a fase superior (orgânica, de cor avermelhada). Procedeu-se à leitura da absorvância a 520 nm, usando o tolueno como branco. O teor de prolina foi expresso em µg/g p.f., tendo sido calculado recorrendo a uma recta padrão obtida com soluções de prolina de concentração conhecida.

#### 2.2.6. Quantificação dos pigmentos fotossintéticos

O teor clorofilino e em carotenóides foi determinado segundo o descrito por Lichtenthaler [51], com ligeiras alterações. Num almofariz contendo areia de quartzo, homogeneizaram-se cerca de 120-150 mg de tecido vegetal em 7 mL de acetona 80% (v/v). Os homogeneizados foram transferidos para tubos de centrífuga e centrifugados a 2150xg durante 10 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos cónicos de 15 mL e completou-se o volume com acetona 80% (v/v), perfazendo um volume final de 10 mL. Realizou-se, de seguida, a leitura das absorvâncias a 470 nm, 647 nm e 663 nm, usando acetona como branco. Os teores clorofilinos e de carotenóides foram calculados a partir das seguintes fórmulas, descritas por Lichtenthaler [51]:

- $Cl\ a\ (mg/dm^3) = 12,25 \times Abs_{663} - 2,79 \times Abs_{647}$
- $Cl\ b\ (mg/dm^3) = 21,50 \times Abs_{647} - 5,10 \times Abs_{663}$
- $Car\ (mg/dm^3) = (1000 \times Abs_{470} - 1,82 \times Cl\ a - 85,02 \times Cl\ b) / 198$

Os resultados foram expressos em mg/g p.f..

## 2.3. Avaliação da acumulação de mRNAs de MTs de *S. nigrum*

### 2.3.1. Desenho de oligonucleótidos iniciadores (*primers*)

Com base no alinhamento obtido (Blastn) a partir das sequências nucleotídicas de metalotioninas de *S. nigrum* já disponíveis para a comunidade científica (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2009), foram desenhados dois grupos de oligonucleótidos iniciadores (*primers*), recorrendo a duas ferramentas de informática: o software desenvolvido pelo grupo de investigação PrimerIdent (<http://primerident.up.pt>, 2009) e, posteriormente, analisados recorrendo ao software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>, 2009).

Um primeiro grupo seria composto por pares de *primers* (*forward* e *reverse*) que permitiriam discriminar um determinado tipo de metalotioninas. Assim, foram desenhados oligonucleótidos iniciadores específicos para as sequências das metalotioninas MT2b, MT2c e MT3c. Foi desenhado ainda um segundo grupo de *primers* que possibilitassem discriminar o grupo das metalotioninas MT2a+b, do grupo das MT2c+d e do grupo das MT3. As sequências dos *primers* obtidos estão disponíveis em anexo. Estes oligonucleótidos iniciadores foram encomendados aos laboratórios STAB VIDA (Portugal).

### 2.3.2. Extracção, quantificação e avaliação do estado de pureza do RNA total

A extracção do RNA total dos tecidos vegetais em estudo foi efectuada recorrendo ao reagente TRIzol<sup>®</sup> LS (*Invitrogen*, E.U.A.), segundo as instruções do fabricante. A homogeneização foi feita com amostras de 50-100 mg de tecido vegetal em 750 µL do reagente TRIzol<sup>®</sup> LS em tubos de 1,5 mL, tendo-se agitado a mistura durante alguns segundos. Seguiu-se uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, tendo sido posteriormente adicionados 0,2 mL de clorofórmio e tendo-se agitado vigorosamente os tubos, durante 15 segundos, para aumentar a eficiência da remoção de proteínas e outros constituintes celulares. Procedeu-se a nova incubação à temperatura ambiente, durante 15 minutos, à qual se seguiu uma centrifugação refrigerada (6°C) a 12000xg, durante 15

minutos. A fase aquosa, contendo o RNA total, foi transferida para um novo tubo estéril de 1,5 mL e adicionou-se 0,5 mL de isopropanol para precipitar o RNA. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 10 minutos, tendo-se seguido uma centrifugação refrigerada (6°C) a 12000xg, durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o RNA sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol a 75% (v/v) e efectuou-se uma centrifugação refrigerada (6°C) a 7500xg, durante 5 minutos. Eliminou-se o sobrenadante e, depois da evaporação total do etanol, a ressuspensão dos sedimentos de RNA foi feita em 25 µL de água bidestilada estéril e livre de RNases, por incubação dos tubos a 60°C durante 10 minutos. O RNA extraído foi armazenado a -80°C para utilizações futuras.

A quantificação do RNA e a avaliação do seu grau de pureza foi efectuada recorrendo a leituras da absorvância a 260 nm e 280 nm, das várias amostras em estudo, usando água bidestilada estéril como branco. A quantidade de RNA foi calculada com base na relação 1 unidade  $DO_{260\text{ nm}} = 40\text{ }\mu\text{g}$  de RNA/mL. O grau de pureza do RNA foi determinado pela razão  $Abs_{260\text{ nm}}/Abs_{280\text{ nm}}$ , sendo que esta relação deverá ser superior a 1,8 para que o RNA seja considerado puro [88]. O estado do RNA foi ainda avaliado por electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v).

### 2.3.3. Reacções de RT (Transcrição Reversa)

As reacções de transcrição reversa foram realizadas recorrendo aos reagentes *Reverase*<sup>TM</sup> (M-MuLV RT) da *Bioron* (Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Usando tubos estéreis de 200 µL, adicionaram-se 5 µg de RNA total, 1 µg do oligonucleótido iniciador R9 (sequência em anexo) e fez-se o volume com água bidestilada estéril e livre de RNases, para um volume final de 8 µL. Os tubos foram colocados num termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*, E.U.A.), e incubados a 70°C, durante 10 minutos e depois colocados em gelo durante 15 minutos, para eliminar possíveis estruturas secundárias dos mRNAs e manter os mRNAs desnaturados, respectivamente. Posteriormente foram adicionados os restantes componentes da reacção: 4 µL do tampão completo 5xRT, 1 µL de uma mistura de dNTPs a 10 mM, 200 U da enzima transcriptase reversa e completou-se o volume com água bidestilada estéril e livre de RNases, para um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada durante 2 horas a 42°C para que ocorresse a síntese das cadeias de cDNA.

Após esta incubação, a mistura foi aquecida a 70°C para inactivar a transcriptase reversa. No final da reacção os tubos com os cDNA foram guardados a -20°C para futuro processamento.

#### 2.3.4. Reacções de PCR (Reacção em Cadeia da Polimerase) semi-quantitativas

As reacções de PCR efectuadas a partir dos cDNA obtidos nas reacções de transcrição reversa foram realizadas recorrendo ao termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, E.U.A.). Foram realizadas reacções de PCR usando os oligonucleótidos iniciadores desenhados anteriormente, de modo a discriminar os tipos de metalotioninas existentes em cada um dos tecidos em análise, assim como a sua abundância relativa. As sequências dos *primers* bem como as suas temperaturas específicas de emparelhamento, usadas nestes ensaios, encontram-se em anexo. A enzima utilizada nestas reacções foi a *DFS-Taq DNA Polymerase* (Bioron, Alemanha) e foram também utilizados o tampão completo de reacção e uma mistura de dNTPs a 10 mM da *Bioron*. A água usada na reacção estava bidestilada, desionizada e estéril. As reacções de PCR foram feitas em tubos de 200 µL, para um volume final de 25 µL, de acordo com a seguinte tabela:

**Tabela 1-** Composição típica das reacções de PCR para a análise da acumulação dos transcritos das metalotioninas

Reagente	Volume (µL)	Concentração final
H <sub>2</sub> O	20,75	--
Tampão 10x	2,5	1x
dNTPs 10 mM	0,5	0,2 mM
<i>Primer forward</i> 10 µM	0,25	0,1 µM
<i>Primer reverse</i> 10 µM	0,25	0,1 µM
cDNA	1	--
<i>Taq</i> DNA polimerase 5U/ µL	0,25	1,25 U

O programa utilizado no termociclador foi o seguinte: 1 minuto a 94°C (passo desnaturação inicial), seguido de 35 ciclos compostos por 30 segundos a 94°C, 30 segundos à temperatura específica de emparelhamento de cada par de iniciadores e 30 segundos a 72°C, terminando-se a reacção com um passo final de extensão, durante 3 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram guardados a 4°C e analisados posteriormente por electroforese em gel de agarose. Optou-se pelo total de 35 ciclos por PCR pois um número inferior não permitia a visualização fidedigna de amplificadas, enquanto que um número superior não permitia distinguir diferenças nas intensidades das bandas produzidas, quando analisados em gel de agarose.

### 2.3.5. Análise do estado do RNA e de produtos de PCR por electroforese em gel de agarose

As amostras de RNA total extraídas foram avaliadas por electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e os produtos de PCR por electroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparados com tampão TAE 1x (composição em anexo) contendo brometo de etídio a 1 µg/mL. As amostras foram complexadas com tampão de amostra antes da sua aplicação no gel, de modo a este ficar a 1x na sua concentração final. Os tampões utilizados continham o corante xilenocianol, no caso das amostras de RNA, e o corante xilenocianol ou o 6x *Orange DNA Loading Dye* (*Fermentas*, Lituânia), no caso dos produtos de PCR. A escolha do tampão de amostra dependeu do tamanho dos fragmentos dos ácidos nucleicos a serem visualizados. No caso dos géis dos produtos de PCR foi aplicado num dos poços um padrão de fragmentos de DNA com massas e tamanhos moleculares conhecidos, para posterior comparação. Para tal foram utilizadas a 100 bp *BLUE eXtended DNA Ladder* 0,1 mg/mL, da *Bioron* (Alemanha) ou a *GeneRuler DNA Ladder Mix* 0,1 mg/mL, da *Fermentas* (Lituânia).

A electroforese foi realizada a 200 V e amperagem não limitante, durante 20 minutos, utilizando TAE 0,25x como tampão de corrida. A visualização do gel no final da electroforese foi realizada contra radiação ultravioleta e a imagem foi capturada e analisada recorrendo ao *Kodak EDAS 290 imaging system* e *Kodak 1D software v.3.5.4* (*Kodak*, E.U.A.).

## **2.4. Elaboração de construções génicas para posterior silenciamento de MTs específicas em *S. nigrum***

### 2.4.1. Reacções de PCR para amplificar a região 3'UTR das MT2c

Com vista à amplificação da região 3'UTR das metalotioninas, foram realizadas reacções de PCR de acordo com as condições descritas em 2.3.4. (componentes da reacção e programa utilizado no termociclador), utilizando *primers* específicos, desenhados para amplificar as regiões 3'UTR da MT2c (sequências em anexo). Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e os amplificadores de interesse seccionados do gel para posterior purificação.

### 2.4.2. Extracção e quantificação de DNA do gel de agarose

A purificação das bandas de interesse dos géis de agarose foi realizada recorrendo ao GenElute™ Gel Extraction Kit (*Sigma*, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A banda de interesse foi excisada do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina estéril, tendo o cuidado de remover a agarose em excesso para minimizar a sua quantidade. Determinou-se a massa da porção de agarose contendo a banda a purificar numa balança semi-analítica. Adicionaram-se, num tubo de 1,5 mL, 300 µL da Solução Solubilizante por cada 100 mg de agarose e incubou-se a mistura a 60°C até a agarose estar completamente dissolvida, agitando-se suavemente a cada 3 minutos para uma melhor dissolução. Durante o tempo de incubação, preparou-se uma coluna de ligação do DNA, por adição das colunas necessárias a um tubo colector de 2 mL, ambos fornecidos no kit. Adicionaram-se 500 µL da Solução de Preparação da Coluna e centrifugou-se a 16000xg, durante 1 minuto, tendo-se descartado o sobrenadante. Ao tubo contendo o gel dissolvido, adicionaram-se 100 µL de isopropanol 100% (v/v) e misturou-se até a solução ficar homogénea. Transferiu-se a mistura para a coluna preparada anteriormente e centrifugou-se a 16000xg, durante 1 minuto. Removeu-se o sobrenadante e adicionaram-se 700 µL da Solução de Lavagem e centrifugou-se a 16000xg, durante 1 minuto. Removeu-se a coluna do tubo colector e descartou-se o

sobrenadante. Voltou a colocar-se a coluna no tubo colector e fez-se nova centrifugação para remover o excesso de etanol. Transferiu-se a coluna para um tubo estéril de 1,5 mL, adicionaram-se 50 µL da Solução de Eluição e incubou-se a mistura durante 1 minuto. Centrifugou-se a 16000xg durante 1 minuto e guardou-se o DNA extraído a -20°C para futuros processamentos. O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 0,8% (p/v) por comparação a um padrão de fragmentos de DNA com massas e tamanhos moleculares conhecidos – *GeneRuler DNA Ladder Mix* 0,1mg/mL (*Fermentas*, Lituânia).

#### 2.4.3. Reacções de ligação do DNA ao vector pTZ57R/T

Para realizar a clonagem das porções 3'UTR obtidas por PCR no vector pTZ57R/T utilizou-se uma determinada massa de DNA de modo a que a razão molar do vector usado e do fragmento de inserção fosse 1:10, segundo a seguinte equação:

$$\frac{\text{quantidade vector } (\mu\text{g})}{\text{tamanho vector (kb)}} = \frac{10 \times \text{quantidade de DNA } (\mu\text{g})}{\text{tamanho do DNA (kb)}}$$

A reacção foi feita adicionando-se, num tubo de 1 mL, água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 20 µL, uma determinada quantidade do DNA a ser ligado, 25 ng do vector pTZ57R/T, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (*Fermentas*, Lituânia) e 2 µL do tampão de ligação a 10x. Incubou-se o tubo a 22°C, durante 1 hora. No final da incubação, a reacção foi parada colocando-se os tubos em gelo. Os tubos contendo o cDNA de interesse inserido no vector pTZ57R/T foram guardados a -20°C até se proceder à transformação de *Escherichia coli*.

#### 2.4.4. Obtenção de células competentes de *Escherichia coli* DH5α

A preparação de células competentes de DH5α foi iniciada com um riscado de *E. coli* em placa de Petri estéril contendo L-agar sem antibióticos e fez-se uma incubação a 37°C durante a noite. Inoculou-se uma colónia isolada em 10 mL de meio LB sem antibióticos e incubou-se a 37°C durante a noite, com agitação orbital. No dia



seguinte inocularam-se 400 mL de LB e incubou-se a 37°C até  $DO_{600\text{ nm}}$  atingir o valor 0,6, i.e., até a cultura se encontrar na fase exponencial do crescimento. Colocou-se a cultura em gelo e centrifugou-se a 1100xg, durante 5 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e os sedimentos foram ressuspensos em 200 mL de uma solução de  $CaCl_2$  50 mM estéril e incubou-se 30 minutos em gelo. Foi feita nova centrifugação a 1100xg, durante 5 minutos a 4°C e ressuspendeu-se o sedimento em 40 mL da solução de  $CaCl_2$  50 mM estéril e arrefecida. Foram feitas alíquotas de 100 e 500  $\mu\text{L}$  em tubos de 1 mL, contendo glicerol estéril numa concentração final de 15% (v/v), as quais foram guardadas a -80°C para uso futuro.

#### 2.4.5. Transformação de células competentes DH5 $\alpha$

Para realizar a transformação de células competentes DH5 $\alpha$  adicionou-se 1,7  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol, para uma concentração final 25 mM, por cada 100  $\mu\text{L}$  de células competentes e incubou-se dois minutos em gelo. Adicionou-se de seguida o DNA de interesse na quantidade apropriada (0,1-100 ng) às células bacterianas, com agitação suave, e incubou-se 30 minutos em gelo, para permitir que o cálcio da solução neutralizasse também as cargas negativas dos ácidos nucleicos adicionados. Provocou-se de seguida um choque térmico a 42°C durante 45 segundos, para permitir a entrada dos plasmídios nas bactérias, transferindo-se rapidamente para gelo, onde se incubou durante 2 minutos. Adicionaram-se 900  $\mu\text{L}$  de LB sem antibióticos e incubou-se durante 1 hora a 37°C, com agitação orbital de modo a que as bactérias que receberam o plasmídio produzissem as proteínas envolvidas na resistência ao agente selectivo adequado aos plasmídios utilizados. Centrifugaram-se as células durante 2 minutos a 1055xg e ressuspendeu-se em 300  $\mu\text{L}$  de LB sem antibióticos. De seguida, plaquearam-se 100  $\mu\text{L}$  desta cultura em placas de Petri com meio L-agar suplementado com ampicilina (no caso do plasmídio pTZ57R/T) ou canamicina (no caso do plasmídio derivado do pG0229, ver adiante), ambas numa concentração de 50 $\mu\text{g}$  /ml e incubaram-se as placas a 37°C durante a noite, em posição invertida.

#### 2.4.6. Minipreps de DNA

A extracção do DNA plasmídico das colónias de *E. coli* obtidas após a transformação das células competentes foi realizada segundo o descrito por del Sal *et al.* [21], com algumas modificações. Inoculou-se uma colónia isolada em 5 mL de meio LB suplementado com os respectivos antibióticos (ampicilina ou canamicina, dependendo do plasmídeo utilizado ter sido derivado do pTZ57R/T ou do pG0229, respectivamente) e incubou-se a 37°C durante a noite. Transferiram-se 1,5 mL da cultura crescida durante a noite para um tubo de 1,5 mL estéril e centrifugou-se a 16000xg durante 20 segundos. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 200 µL de tampão STET (composição em anexo). Adicionaram-se 4 µL de lisozima a 50 mg/mL e incubou-se à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Posteriormente, inactivaram-se as enzimas (ex: lisozima, DNases), por fervura, durante 45 segundos e centrifugou-se a 16000xg durante 10 minutos. Removeu-se o sedimento com auxílio de um palito estéril e adicionaram-se 200 µL de isopropanol ao sobrenadante, misturando por agitação, para precipitar os ácidos nucleicos extraídos. Centrifugou-se a 16000xg durante 10 minutos, eliminou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento de ácidos nucleicos com 200 µL de etanol a 70% (v/v). Centrifugou-se a 16000xg durante 5 minutos, eliminou-se o sobrenadante e deixou-se secar à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento em 20 µL de água estéril com RNase a 100 µg/mL, misturou-se com auxílio do vortex e guardou-se a -20°C.

À cultura líquida restante adicionou-se glicerol a 87% (v/v) estéril para uma concentração final de 10-15%, aliquotou-se e conservou-se a -80°C.

#### 2.4.7. Reacções de restrição do DNA plasmídico

As reacções de restrição dupla foram realizadas recorrendo a enzimas de restrição (*Fermentas*, Lituânia), seguindo as instruções do serviço informático *Double-Digest* (*Fermentas*, Lituânia). As reacções continham água bidestilada estéril (perfazendo o volume para os 20 µL finais), o tampão R para uma concentração final de 1x, 0,5-0,8 U da enzima *Bam*HI, 0,2-0,5 U da enzima *Eco*RI e 3,5 µL do *miniprep* de DNA obtido anteriormente. Incubou-se a mistura durante a noite a 37°C e analisou-se o resultado da

restrição por electroforese em gel de agarose 1% (p/v). As bandas de interesse foram excisadas e purificadas como descrito anteriormente.

#### 2.4.8. Reacções de ligação do DNA ao vector pG0229

Para realizar a clonagem do DNA extraído anteriormente no vector pG0229 utilizou-se uma reacção de ligação de acordo com o descrito em 2.4.3., tendo-se usado a mesma proporção de vector:DNA. No final das reacções, os tubos contendo o cDNA de interesse inserido no vector pG0229 foram guardados a -20°C até futura transformação de *E. coli* competentes.

#### 2.4.9. Sequenciação de DNA

Para realizar as sequenciações dos clones de *E. coli* portadores das construções génicas elaboradas, o DNA plasmídico correspondente foi extraído recorrendo ao *GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit* (Sigma, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. Inoculou-se uma colónia isolada em 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (no caso dos plasmídios derivados do pTZ57R/T) ou canamicina (no caso dos plasmídios derivados do pG0229) e incubou-se a 37°C durante a noite. No dia seguinte, transferiram-se 1,5 mL da cultura para tubos estéreis fornecidos com o *kit* e centrifugou-se a 12000xg durante 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 200 µL da Solução de Ressuspensão, com auxílio do vortex. Adicionaram-se 200 µL da Solução de Lise, inverteu-se suavemente para misturar a solução e incubou-se durante 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 350 µL da Solução de Neutralização, inverteram-se os tubos e centrifugou-se a 16000xg, durante 10 minutos. Simultaneamente, preparou-se uma coluna de ligação do DNA por adição de 500 µL da Solução de Preparação da Coluna a um tubo próprio fornecido no *kit* e centrifugou-se a 12000xg, durante 1 minuto. Posteriormente, transferiu-se o lisado para a coluna preparada e centrifugou-se a 12000xg durante 1 minuto. Eliminou-se o sobrenadante e adicionaram-se 750 µL da Solução de Lavagem à coluna, e centrifugou-se a 12000xg, durante 1 minuto. Eliminou-se o sobrenadante e fez-se novamente a mesma centrifugação para remover o excesso da

Solução de Lavagem. Transferiu-se a coluna para um tubo estéril de 1,5 mL e adicionaram-se 50 µL de água bidestilada estéril à coluna e centrifugou-se a 12000xg, durante 1 minuto, e guardou-se o DNA a -20°C, para futuro processamento.

A quantificação do DNA purificado foi feita por electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) por comparação de intensidades de bandas como descrito anteriormente.

Adicionou-se, num tubo estéril de 1,5 mL, o volume correspondente a 1 µg de DNA e deixou-se a secar à temperatura ambiente. Os tubos contendo o DNA de interesse foram enviados para os laboratórios *MWG* (Alemanha) onde se procedeu à sua sequenciação, utilizando o *primer* M13 rev (-29) (sequência em anexo).

#### 2.4.10. Obtenção de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

A obtenção de células competentes de EHA105 iniciou-se com um riscado em placa de Petri estéril contendo L-agar com rifampicina a 10 µg/mL e posta a incubar a 28°C durante a noite. No dia seguinte inoculou-se uma colónia isolada em 2 mL de LB suplementado com rifampicina na concentração de 10 µg/mL e incubou-se a 28°C durante a noite, com agitação. Posteriormente, inoculou-se 1 mL desta cultura em 50 mL de LB com rifampicina e incubou-se a 28°C até a  $DO_{600\text{ nm}}$  atingir um valor compreendido entre 0,5 e 1,0. Arrefeceu-se a cultura em gelo e centrifugou-se durante 10 minutos a 10000xg, a 6°C. Ressuspenderam-se as células em 5 mL de  $CaCl_2$  20 mM estéril e arrefecido e centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 10000xg, a 6°C. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 1 mL de  $CaCl_2$  20 mM estéril e arrefecido. A suspensão final foi dividida em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL, e estas foram congeladas em azoto líquido e guardadas a -80°C até poderem ser transformadas com os plasmídios derivados do pG0229 contendo as construções génicas de interesse.

#### 2.4.11. Transformação de células competentes EHA105

Para transformar as células competentes EHA105 adicionaram-se 1-10 µg do plasmídio pG0229 contendo a construção génica de interesse e 1-10 µg do plasmídio auxiliar p-Soup, que contém a informação necessária para a replicação do pG0229 na

bactéria, a 100 µL de bactérias e congelou-se a mistura em azoto líquido, durante 5 minutos. Posteriormente, a mistura foi aquecida à temperatura ambiente durante 10 minutos e adicionou-se 1 mL do meio LB sem antibióticos e incubou-se durante 4 horas a 28°C para permitir a recuperação das bactérias e a produção de maquinaria enzimática envolvida na resistência à canamicina. Depois da incubação, ressuspenderam-se as células em 100 µL de LB suplementado com rifampicina (10 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL). Plaquearam-se as células em meio sólido L-agar suplementado com rifampicina e canamicina nas mesmas concentrações e incubou-se em posição invertida a 28°C, durante 2-3 dias (até serem visíveis colónias das bactérias transformadas).

#### 2.4.12. Perpetuação das células competentes EHA105 transformadas

Inocularam-se 2 a 2,5 mL de LB líquido suplementado com rifampicina (10 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) com colónias individualizadas de *Agrobacterium* EHA105 portadoras das construções génicas de interesse e permitiu-se o crescimento durante a noite, a 28°C e com agitação constante. No dia seguinte adicionou-se glicerol 87% estéril à cultura líquida para uma concentração final de 15%. Depois de misturado por inversão, fizeram-se aliquotas de 500 µL, as quais foram conservadas a -80°C.

## **2.5. Análise estatística**

A análise dos parâmetros biométricos, da quantificação do nível de metais pesados presentes nos tecidos vegetais, da acumulação de prolina, do nível de peroxidação lipídica e do teor clorofilino e de carotenóides foram realizadas recorrendo a dois testes estatísticos do software Microsoft® Office Excel 2007. A diferença entre as variâncias de duas amostras foi determinada recorrendo ao teste de Fisher (teste F) e a significância das diferenças entre essas duas amostras foi determinada pelo teste *t*-student (teste *t*), assumindo uma distribuição bi-caudal. Foram assumidas diferenças significativas entre as amostras para  $p \leq 0,05$ .

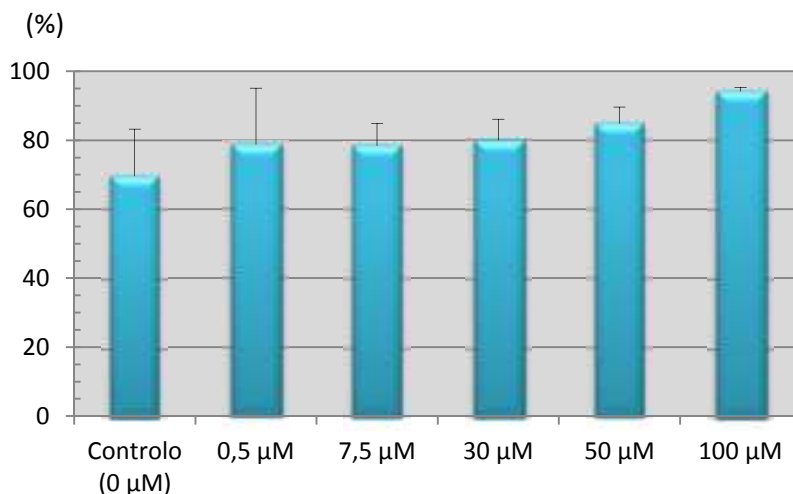
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Níquel (Ni)

##### 3.1.1. Determinação das concentrações de Ni a utilizar nos estudos com *S. nigrum*

Para definir quais as concentrações de Ni a usar nos futuros estudos de exposição das plantas de *S. nigrum* a este metal, sementes desta espécie foram colocadas a germinar em meio nutritivo suplementado com concentrações crescentes de Ni: 0  $\mu\text{M}$  (controlo), 0,5  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , durante 30 dias.

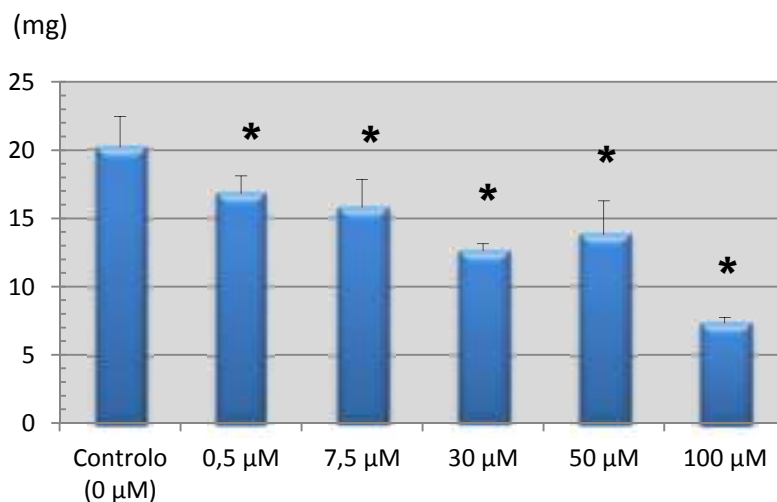
No final deste tempo de incubação, a percentagem de germinação foi calculada para cada uma das concentrações de Ni utilizadas, dados esses que se podem observar no gráfico 1. Analisando estes dados é possível constatar que não se registaram diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na percentagem de germinação entre os diferentes tratamentos. Uma vez que a resposta das plantas ao stress é dependente das próprias características do stress e de factores relacionados com as características da planta, nomeadamente o órgão ou tecido em questão, a fase de desenvolvimento ou o seu genótipo, a resposta observada indica que estes órgãos poderão ser tolerantes aos níveis de Ni utilizados.



**Gráfico 1** – Percentagem de germinação de sementes de *S. nigrum* sujeitas aos diferentes tratamentos de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão.

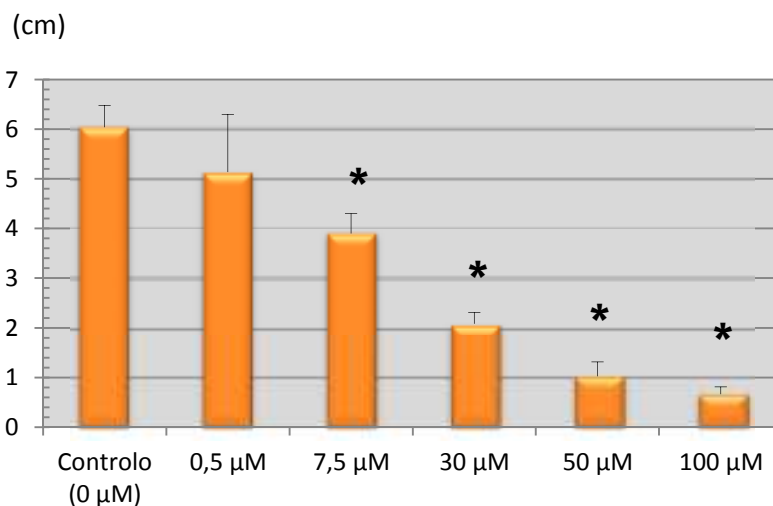
Um dos parâmetros biométricos determinado foi a biomassa total das plântulas sujeitas aos diferentes tratamentos. Como se pode observar no gráfico 2, foi possível

verificar um decréscimo estatisticamente significativo da biomassa total das plântulas já no tratamento com 0,5  $\mu\text{M}$  de Ni, observando-se uma diminuição de cerca de 16,8%, e cerca de 21,8% no tratamento com 7,5  $\mu\text{M}$  de Ni, relativamente à situação controlo. Este resultado indica que as concentrações utilizadas deste metal, apesar de não impedirem a germinação das sementes de *S. nigrum*, têm um efeito prejudicial no crescimento das plântulas, uma vez que conduziram a uma diminuição da biomassa das mesmas.



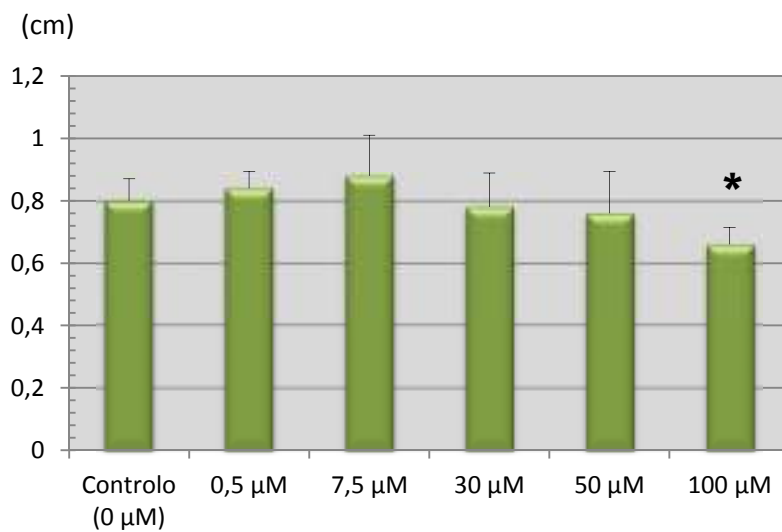
**Gráfico 2** - Biomassa total das plântulas de *S. nigrum* sujeitas aos diferentes tratamentos de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Outro parâmetro biométrico avaliado foi o comprimento da raiz das plântulas, cujos valores podem ser observados no gráfico 3. É possível verificar que o comprimento das raízes decresceu significativamente a partir do tratamento com 7,5  $\mu\text{M}$  de Ni, em cerca de 35,4%, comparativamente ao controlo. Este dado complementa a indicação referida anteriormente de que o Ni foi prejudicial ao crescimento normal da plântulas, uma vez que conduziu a uma diminuição do tamanho das raízes destas, situação que se reflecte no decréscimo da sua biomassa total.



**Gráfico 3** - Comprimento da raiz das plântulas de *S. nigrum* sujeitas aos diferentes tratamentos de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Já a determinação da altura da parte aérea (gráfico 4) permitiu verificar uma variação estatisticamente significativa apenas no tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de Ni, com uma diminuição de 17,5% face ao controlo. Esta situação prende-se com o facto da altura das plântulas ser muito reduzida ao fim de 30 dias de crescimento, sendo que estas alterações, provavelmente, só deverão ser relevantes após um tempo maior de desenvolvimento. Verificou-se ainda que a concentração de 100  $\mu\text{M}$  foi a única que provocou alterações significativas em todos os parâmetros biométricos determinados, indicando que este nível de Ni provocou efeitos muito nefastos no crescimento das plântulas.



**Gráfico 4** - Altura da parte aérea das plântulas de *S. nigrum* sujeitas aos diferentes tratamentos de níquel. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Na figura 5 é possível observar uma imagem obtida no dia em que os tratamentos terminaram e se realizaram as medições biométricas, onde se pode verificar a diferença de crescimento entre as plântulas sujeitas a concentrações crescentes de Ni, indicando que este metal terá provocado alterações na fisiologia e morfologia das plântulas.



**Figura 5** – Fotografia comparativa do crescimento de plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas a concentrações crescentes de Ni, após 30 dias de tratamento com este metal pesado.



Após a análise destes resultados, considerou-se a concentração de 7,5  $\mu\text{M}$  de Ni como aquela a usar em futuros estudos de crescimento das plântulas, simulando esta situação um ambiente poluído com este metal pesado, tendo sido escolhido este nível de Ni por ser concentração mínima que provoca alterações significativas em relação à situação controlo. Foi ainda considerada a concentração de 100  $\mu\text{M}$  para futuros tratamentos de choque com Ni, simulando uma situação de descarga de poluentes contendo este metal pesado num solo não contaminado, e verificar o efeito desta elevada concentração no crescimento e desenvolvimento de *S. nigrum*. Optou-se por este nível de Ni por ser aquele que desencadeou efeitos mais severos no desenvolvimento das plântulas e que provocou alterações estatisticamente significativas em todos os parâmetros biométricos determinados.

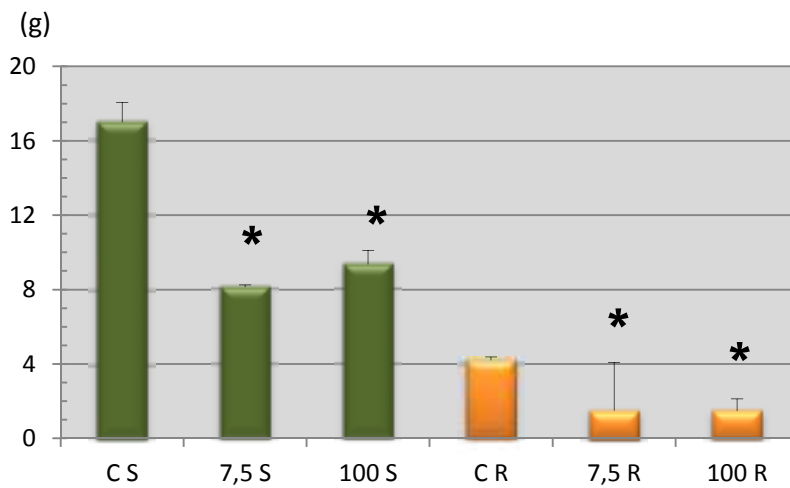
### 3.1.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de *S. nigrum* a níveis elevados de Ni

Os ensaios de exposição das plantas de *S. nigrum* a concentrações elevadas de Ni decorreu em cultura hidropónica. Foram consideradas 3 situações, a situação controlo sem adição de Ni ao meio nutritivo, um tratamento prolongado com 7,5  $\mu\text{M}$  de Ni, durante 4 semanas, e um tratamento de choque com 100  $\mu\text{M}$  de Ni, durante uma semana.

No final das 4 semanas de exposição, as plantas sujeitas a ambos os tratamentos apresentavam alguns dos sintomas visíveis de toxicidade de Ni descritos para outras espécies de plantas [31, 45], nomeadamente redução do crescimento e clorose foliar, não apresentando necrose. Estes efeitos do Ni poderão estar relacionados com alterações no metabolismo do ferro (Fe), uma vez que o Ni interfere na incorporação do Fe por parte da planta, conduzindo a uma carência em Fe e conseqüente aparecimento de clorose nas folhas [45]. O facto das plantas apresentarem nanismo poderá ser resultado da competição do Ni com iões metálicos essenciais para o crescimento da planta, já descrita para várias espécies de plantas de cultivo [15].

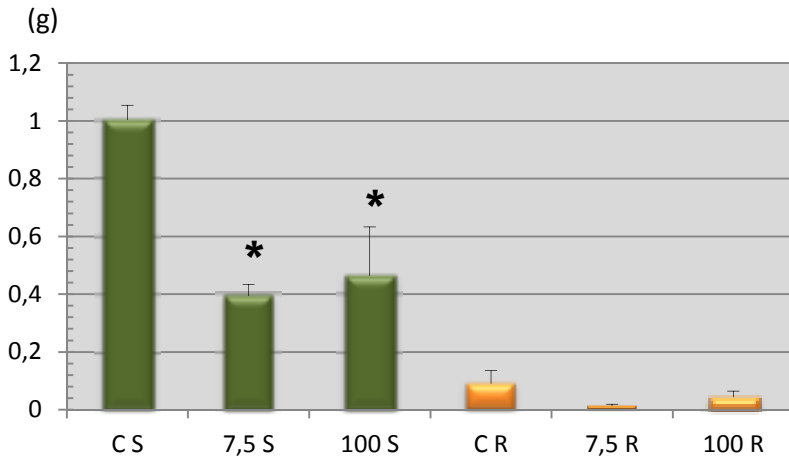
No final do tempo de exposição foram determinados vários parâmetros a fim de avaliar o grau de stress imposto às plantas expostas a Ni, que serão apresentados de seguida.

Os valores da biomassa total das plantas sujeitas aos diferentes tratamentos estão representados no gráfico 5. Foi possível observar um decréscimo estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) na parte aérea e na raiz, em ambos os tratamentos, em relação ao controlo. Na parte aérea verificou-se um decréscimo da biomassa total de cerca de 52% nas plantas provenientes do tratamento prolongado com  $7,5 \mu\text{M}$  de Ni e de cerca de 45% no caso do tratamento de choque com  $100 \mu\text{M}$ . No caso das raízes, observou-se uma diminuição de cerca de 65% em ambos os tratamentos. Este efeito das altas concentrações de Ni na biomassa das plantas pode ser explicado pela competição entre este metal pesado e alguns iões metálicos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, como referido anteriormente.



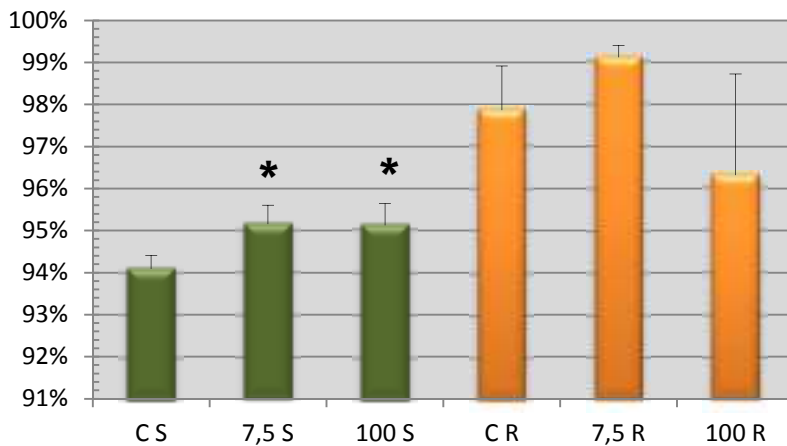
**Gráfico 5** - Biomassa total das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de  $7,5 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$  de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Outro dos parâmetros determinado foi a biomassa seca das plantas, que pode ser observada no gráfico 6. Foi possível constatar que a biomassa seca variou significativamente apenas na parte aérea das mesmas, quando comparadas com as plantas controlo. Ocorreu uma diminuição de cerca de 61% na situação de exposição prolongada e de 54% no caso do tratamento de choque. No caso das raízes, verificou-se uma tendência para um decréscimo não significativo do seu valor, comparativamente ao observado no controlo. Este pode ser explicado pelo facto das raízes apresentarem um valor muito baixo de biomassa seca, o qual não é suficiente para se poderem tirar ilações acerca do efeito do Ni neste parâmetro.



**Gráfico 6** - Biomassa seca das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

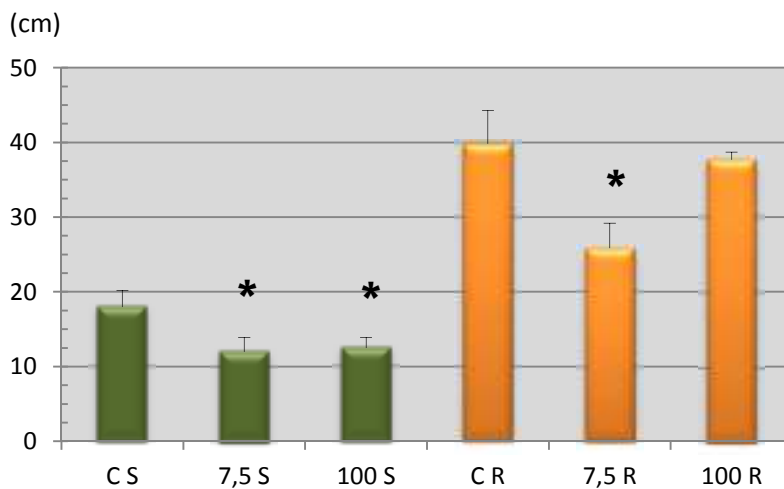
Os dois parâmetros biométricos anteriores reflectem-se na variação do conteúdo hídrico das plantas, que pode ser observado no gráfico 7. Essa variação foi estatisticamente significativa apenas na parte aérea das plantas, em ambos os tratamentos, relativamente ao controlo.



**Gráfico 7** - Variação do conteúdo hídrico das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

A diminuição do crescimento das plantas, avaliada pelos resultados obtidos, será resultado da diminuição da altura e de uma inibição no crescimento das raízes das plantas expostas a Ni. Com efeito, como se pode observar no gráfico 8, verificaram-se

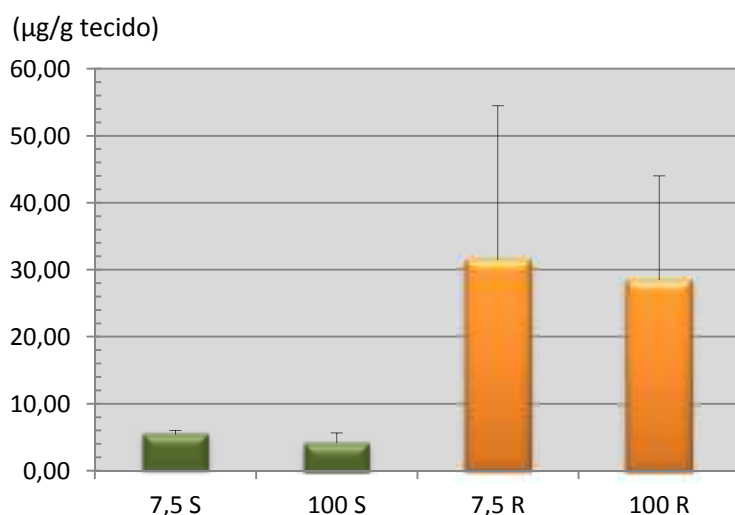
reduções estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na altura da parte aérea das plantas, em ambos os tratamentos, face ao observado no controlo. A diminuição observada foi de cerca de 33% no caso da exposição prolongada, e de 30% na situação de tratamento de choque. Já no que diz respeito ao comprimento radicular, foi possível constatar a existência de uma variação significativa apenas na situação de stress prolongado, relativamente ao controlo, com uma diminuição de cerca de 30%. Estes resultados sugerem que o Ni fornecido em elevadas concentrações inibiu o crescimento da raiz, à imagem do descrito para o arroz [52]. No caso do tratamento de choque essa situação não se verificou, possivelmente porque neste caso as raízes cresceram durante 3 semanas numa situação idêntica ao controlo, o que fez com que no momento do início do tratamento de choque já estivessem mais desenvolvidas que as raízes que cresceram continuamente num meio suplementado com Ni. Também a inibição observada na parte aérea das plantas corresponde ao descrito para o trigo [31], onde se verificou que elevadas concentrações deste metal pesado provocaram nanismo e clorose foliar, tal como se observou neste trabalho.



**Gráfico 8** – Altura da parte aérea e comprimento da raiz das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Analisando o gráfico 9, é possível verificar que a acumulação de Ni foi muito maior ao nível radicular do que na parte aérea das plantas, e que não se verificaram quaisquer variações estatisticamente significativas entre a acumulação de Ni na situação de tratamento prolongado e a de tratamento de choque. O facto de se ter observado um

desvio padrão muito elevado no caso das raízes está inerente à técnica de quantificação utilizada, uma vez que os tecidos radiculares possuem porções muito espessas e de difícil digestão química, o que conduz a diferenças substanciais entre as amostras analisadas. Mesmo tendo em conta esta limitação é possível garantir que os níveis de Ni observados nas raízes das plantas são mais elevados que os encontrados na parte aérea. Para além disso, os níveis de Ni detectados na parte aérea da planta são inferiores a 1 mg/g de tecido seco, mostrando que esta planta não pode ser considerada uma hiperacumuladora para este metal [47], podendo ser utilizada, no entanto, no sentido de fitoestabilizar o Ni, evitando a sua lixiviação dos solos.

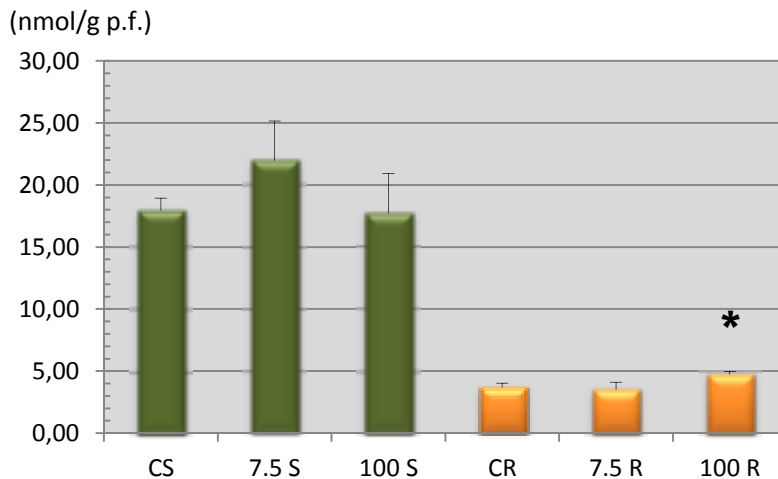


**Gráfico 9** – Teor de Ni presente nos tecidos de plantas de *S. nigrum* sujeitas aos tratamentos de 7,5 µM e 100 µM de Ni. As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R).

Com o intuito de verificar se as plantas sujeitas aos tratamentos com Ni sofreram stress oxidativo, procedeu-se à determinação dos níveis de peroxidação lipídica das mesmas, através da quantificação do teor em malondialdeído (MDA) presente nos diferentes tecidos em análise, e que se pode observar no gráfico 10.

Foi possível verificar para todas as situações que a parte aérea possuiu níveis mais elevados de MDA do que as raízes, situação que pode ser explicada pelo facto das folhas serem tecidos fotossintéticos, que, quando expostos à luz, originam um excesso de energia, que por sua vez conduz à formação de espécies reactivas de oxigénio (EROs), responsáveis pela peroxidação lipídica e por outros danos membranares [96]. É também possível observar que não se verificaram alterações estatisticamente significativas no teor de MDA quantificado na parte aérea das plantas sujeitas aos tratamentos com Ni, comparativamente ao controlo, dados estes que sugerem que o Ni

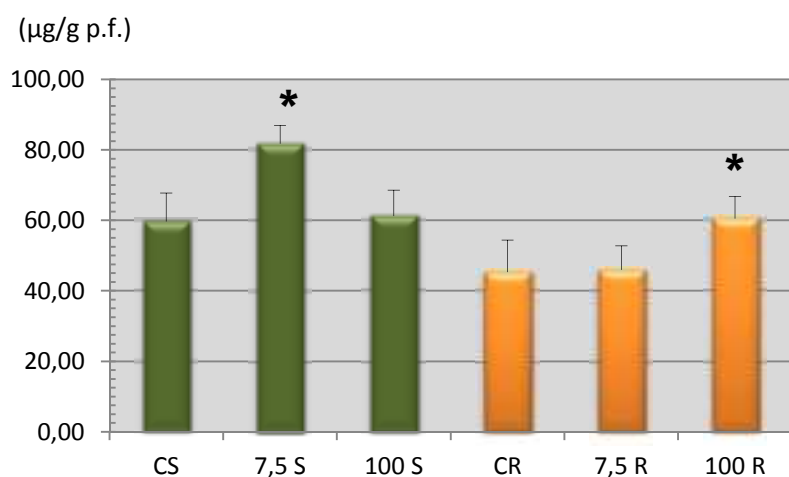
acumulado nestes tecidos não induziu stress oxidativo e que apontam para uma tolerância deste metal por parte de *S. nigrum*. No que diz respeito à parte radicular, observou-se uma variação estatisticamente significativa apenas no valor de MDA quantificado nas raízes das plantas sujeitas ao tratamento de choque com o metal pesado, quando comparado com o controlo, correspondente a um aumento de cerca de 1,29 vezes do nível de MDA quantificado na situação de controlo. Estes resultados sugerem que o excesso de Ni terá induzido a formação de EROs nas raízes das plantas sujeitas ao tratamento de choque, o que por sua vez terá induzido stress oxidativo e, consequentemente, aumentado a peroxidação lipídica nestes tecidos [15].



**Gráfico 10** - Teor de malondialdeído (MDA) presente nos tecidos de plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  de Ni. As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Um dos mecanismos que as plantas desenvolveram para evitar o dano oxidativo é a acumulação de prolina livre, que por sua vez forma complexos não tóxicos com os metais poluentes [53]. Os valores do teor de prolina livre existente nos tecidos das plantas sujeitas à exposição de elevadas concentrações de Ni podem ser observados no gráfico 11. Por análise do gráfico, foi possível observar uma variação estatisticamente significativa apenas no teor de prolina existente na parte aérea das plantas sujeitas a um tratamento prolongado, sendo esta variação traduzida por um aumento de 1,37 vezes relativamente ao teor quantificado nas plantas da situação controlo. No caso do tratamento de choque os níveis de prolina mantiveram-se aproximados. Estes resultados vão de encontro ao observado em estudos anteriores realizados com arroz [53], em que a incorporação do próprio metal por parte da planta desencadeia a indução de prolina,

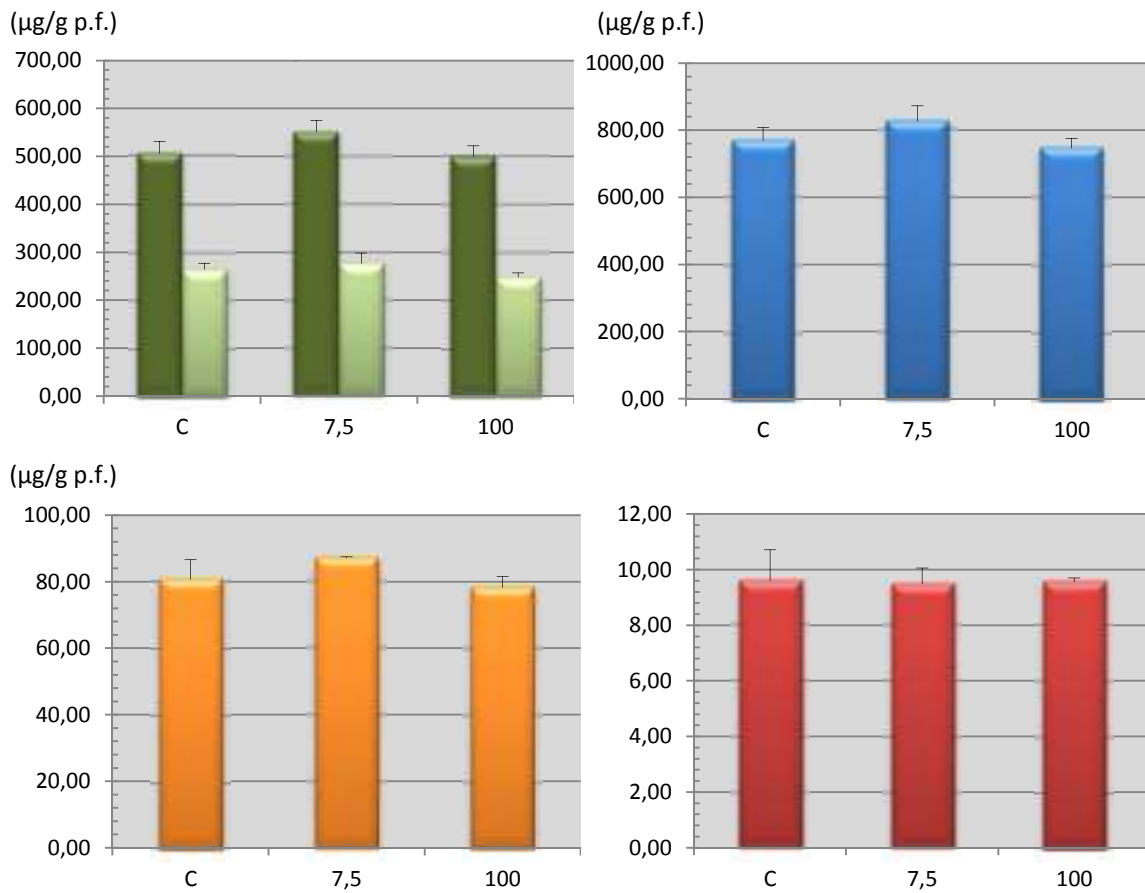
mesmo sem haver um elevado grau de dano oxidativo. Com efeito, no caso das plantas sujeitas ao tratamento prolongado, o nível de Ni presente na parte aérea parece explicar a indução significativa na acumulação de prolina livre neste órgão. No que diz respeito às raízes, verificaram-se variações estatisticamente significativas no teor de prolina quantificada no tratamento de choque, traduzindo-se esta variação num aumento de 1,34 vezes o teor das raízes da situação controlo. No caso do tratamento prolongado não se verificaram quaisquer alterações significativas. Estes resultados sugerem que a prolina produzida na situação de choque foi um dos mecanismos utilizados pelas plantas para se defenderem dos danos oxidativos desencadeados pela exposição das plantas a esta concentração elevada de Ni.



**Gráfico 11** – Teor de prolina livre existente nos tecidos de plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5 µM e 100 µM de Ni. As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Outro dos mecanismos que as plantas desenvolveram para se protegerem da formação de EROs quando expostas a um stress por metais pesados é o aumento do teor em carotenóides [27]. O aumento do nível destes pigmentos terá, pois, a finalidade de proteger os complexos fotossintéticos, principalmente os cloroplastos, dos danos oxidativos decorrentes do excesso de energia luminosa nas folhas (e também da presença de stress oxidativo despoletado por metais pesados) [27]. Os níveis de clorofilas e de carotenóides quantificados nas plantas sujeitas aos diferentes tratamentos com Ni estão presentes no gráfico 12. Foi possível observar que não se verificaram quaisquer variações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) em nenhum dos parâmetros analisados: níveis de clorofila a, clorofila b e teor total de clorofilas, nível de

carotenóides e razão entre clorofilas e carotenóides, em qualquer dos tratamentos, comparativamente com a situação controlo. Como o nível de Ni presente na parte aérea das plantas tratadas não é muito elevado, aparentemente não levou a danos oxidativos nos cloroplastos, nem à necessidade de aumento dos níveis de carotenóides, o que aponta para uma tolerância por parte da planta ao Ni.



**Gráfico 12** - Níveis de clorofilas e carotenóides quantificados nos tecidos de plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5 µM e 100 µM de Ni. As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes escuro representam o nível de clorofila a, as verde claro representam o nível de clorofila b e as barras azuis representam o valor total de clorofilas. As barras laranja representam o teor de carotenóides e as vermelhas representam a razão entre clorofilas e carotenóides presentes nos tecidos das plantas em estudo.



Este conjunto de dados permitiu verificar que as plantas acumularam Ni, maioritariamente na zona radicular, e que esse facto conduziu ao desencadear de reacções de stress oxidativo nestes órgãos, levando a que a planta aumente os seus níveis de prolina para se defender dos danos inerentes a este tipo de stress. O facto de não se verificarem efeitos drásticos nos níveis de clorofilas e nos parâmetros biométricos das plantas sujeitas à exposição a níveis elevados de Ni sugere que *S. nigrum* possuirá outros mecanismos de defesa que permitem tolerar a toxicidade a este metal pesado, possivelmente recorrendo a mecanismos enzimáticos e a agentes quelantes que formem complexos não tóxicos com o Ni, como é o caso das metalotioninas [18].

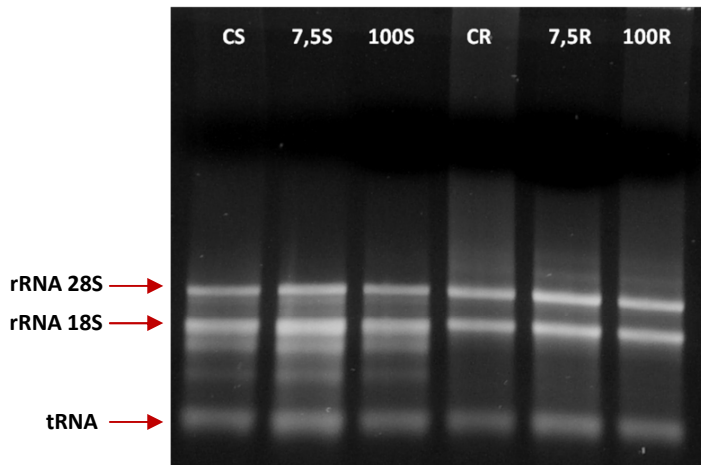
### 3.1.3. Avaliação da acumulação de mRNAs de MTs de *S. nigrum* expostas a Ni

Para realizar a avaliação da acumulação de mRNAs que codificam as MTs de *S. nigrum*, após exposição ao Ni, e de modo a averiguar se uma variação nessa acumulação será dependente especificamente deste, foram desenhados dois grupos de *primers* que permitissem fazer quer a discriminação de mRNAs de MTs específicas quer uma discriminação mais geral entre os vários tipos de MTs. Assim, foi desenhado um primeiro grupo composto por pares de *primers* específicos para as sequências das metalotioninas MT2b, MT2c e MT3c, com amplificadores resultantes de tamanho 433bp, 362bp e 340bp, respectivamente. Os cDNAs destas MTs foram obtidos pelo grupo de investigação em estudos anteriores, não tendo sido ainda publicados. Foi desenhado ainda um segundo grupo de *primers* que possibilitassem uma discriminação mais generalizada entre o grupo das metalotioninas MT2a+b, do grupo das MT2c+d e do grupo das MT3, com amplificadores esperados de 191bp, 146bp e 440bp, respectivamente.

Os RNAs extraídos das raízes e da parte aérea das plantas controlo e das sujeitas aos tratamentos com Ni foram quantificados e a sua concentração e qualidade avaliadas em gel de agarose (figura 6). Por análise do perfil electroforético dos RNAs ribossomais foi possível verificar que os RNAs totais extraídos se apresentavam íntegros, para além de estarem pouco (ou nada) contaminados por DNA genómico das plantas.

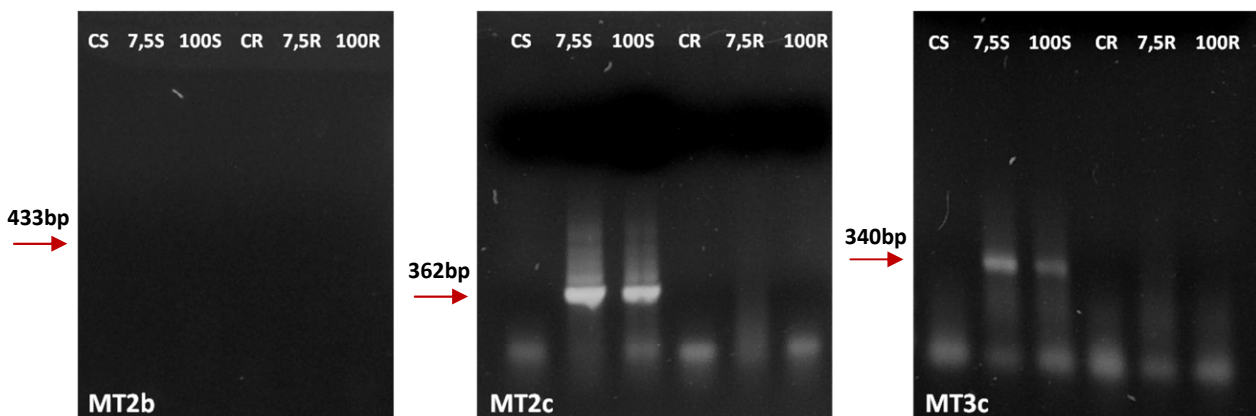
Com base nas intensidades dos perfis electroforéticos obtidos reajustaram-se os volumes de RNA a utilizar nas reacções de transcrição reversa (RT) para garantir que

todas as reacções se iniciassem com massa de RNA total (e, conseqüentemente, de mRNA) aproximada. Deste modo, garante-se que as diferenças nas intensidades das bandas a serem obtidas futuramente nas reacções de PCR serão reflexo da quantidade inicial de mRNA a ser amplificado, tornando possível a comparação dos níveis destes transcritos comparando os resultados dos vários PCRs.



**Figura 6** – Exemplo de uma separação electroforética típica em gel de agarose (0,8% (p/v)) de preparações de RNA total extraído da parte aérea (S) e de raízes (R) de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de Ni.

As imagens típicas dos produtos obtidos por PCR podem ser observadas nas figuras 7 e 8.



**Figura 7** – Exemplo de uma separação electroforética típica em gel de agarose (1% (p/v)) dos produtos das reacções de PCR realizadas para a detecção de transcritos que codificam a MT2b, MT2c e MT3c na parte aérea (S) e em raízes (R) de *S. nigrum* da situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 7,5  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de Ni. As setas indicam a localização e o tamanho dos amplificados de interesse. De salientar a ausência de amplificados relacionados com as MT2b.

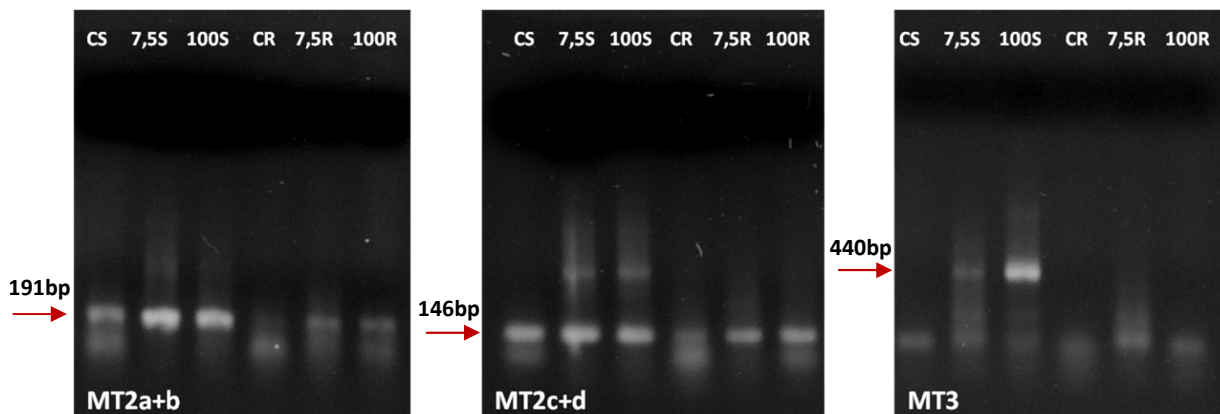
Analisando a imagem anterior é possível observar que não houve acumulação de transcritos das MT2b em qualquer das situações analisadas, quer no caso das plantas controlo quer das tratadas com Ni, em ambos os tipos de tecido em estudo, i.e., nas raízes e na parte aérea, sugerindo que o gene que codifica esta metalotionina não é expresso nas raízes e nas partes aéreas de uma planta adulta, quer na situação controlo, quer em resposta à exposição a níveis elevados de Ni.

No que diz respeito às MT2c, foi possível observar a acumulação *de novo* dos seus transcritos na parte aérea das plantas sujeitas aos tratamentos com Ni, o que não aconteceu na situação controlo, em que os mRNAs deste tipo de MTs não estão presentes. No caso das raízes, não se observou qualquer acumulação de transcritos, quer no controlo quer nas situações de tratamento, sugerindo que este gene será expresso apenas na parte aérea das plantas em resposta à presença de Ni. A expressão dos genes que codificam as MTs do tipo 2 maioritariamente em folhas já foi descrita por Cobbett e Goldsbrough [18], o que vem apoiar os dados obtidos neste trabalho.

No caso das MT3c, verificou-se apenas a acumulação de transcritos na parte aérea das plantas tratadas com Ni, uma vez que na situação controlo não houve acumulação destes mRNAs. Nas raízes não houve acumulação de transcritos em nenhuma das situações estudadas. Estes dados sugerem que os genes que codificam as MT3c foram induzidos pela exposição ao Ni, apenas na parte aérea das plantas. Curiosamente, este grupo de genes foi descrito como sendo específico de frutos carnudos maduros [17, 18, 50, 79], mas os dados obtidos neste trabalho demonstram que pelo menos um membro deste grupo de genes é expresso na parte aérea das plantas, não sendo, afinal, a sua expressão confinada aos frutos.

Foi possível observar que os transcritos do grupo MT2a+b acumularam-se na parte aérea das plantas na situação controlo e que houve um aumento da sua acumulação aquando dos tratamentos com Ni. Nas raízes, os mRNAs destas MTs foram detectados na situação controlo, enquanto que nas situações de tratamento houve um aumento da sua acumulação. Como não houve acumulação de transcritos das MT2b, serão os transcritos das MT2a os induzidos na presença de Ni, quer nas raízes quer na parte aérea das plantas. Além desta indução da acumulação de transcritos dependente do Ni, observaram-se também níveis constitutivos de transcritos das MT2a, em ambos os tecidos.

Estes dados demonstram que há genes que codificam MTs do tipo 2 a serem expressos também nas raízes, contrariamente ao que foi anteriormente descrito por Cobbett e Goldsbrough [18], em que a expressão nas raízes era apenas observada num número reduzido de espécies vegetais e a um nível muito reduzido.



**Figura 8** - Exemplo de uma separação electroforética típica em gel de agarose (1% (p/v)) dos produtos das reacções de PCR realizadas para a detecção de transcritos dos grupos MT2a+b, MT2c+d e MT3 na parte aérea (S) e em raízes (R) de *S. nigrum* na situação controlo (C) e tratadas com 7,5  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de Ni. As setas indicam a localização e o tamanho dos amplificados de interesse.

No grupo das MT2c+d pode observar-se uma acumulação de transcritos destas MTs em ambos os tipos de tecidos em estudo e em todas as situações, i.e. controlo e tratamentos com Ni. Foi possível observar ainda um aumento da acumulação de transcritos nas plantas tratadas, quer nas raízes quer na parte aérea, comparativamente ao sucedido na situação controlo. Também foi possível verificar que no grupo das MT2c+d ocorre algo diferente do grupo anterior, na medida em que na parte aérea das plantas houve uma indução da acumulação dos transcritos das MT2c pelo Ni e uma acumulação constitutiva de mRNAs das MT2d, enquanto que nas raízes houve apenas acumulação dos transcritos das MT2d, com um aumento da sua acumulação nas plantas tratadas, comparativamente ao sucedido na situação controlo.

Estes dados indicam que haverá uma expressão diferencial dos genes que codificam as MTs do tipo 2: as MT2a estarão a ser expressas de um modo constitutivo quer em raízes, quer na parte aérea das plantas; as MT2b não são expressas na planta adulta; as MT2c são expressas apenas na parte aérea da planta, e em resposta à

exposição ao Ni; as MT2d são expressas de modo constitutivo na parte aérea da planta, sendo a sua expressão induzida nas raízes em resposta à exposição ao Ni.

Já no grupo das MT3, verificou-se uma indução da acumulação destes transcritos na parte aérea das plantas tratadas com Ni, sendo essa acumulação muito mais acentuada no caso do tratamento de choque com 100  $\mu\text{M}$  de Ni, comparativamente ao que ocorre no tratamento prolongado. Na situação controlo, estes mRNAs não estão presentes. No caso das raízes, não foi detectada acumulação de transcritos em nenhuma das condições de crescimento utilizadas.

O grupo das metalotioninas MT3 parece responder especificamente na parte aérea das plantas, uma vez que não há acumulação dos transcritos destas MTs nas raízes de nenhuma das situações estudadas, sendo também possível verificar que estes transcritos são acumulados em resposta à exposição ao Ni, visto que não há acumulação nas plantas controlo. Outra ilação que se pode retirar destes resultados é que MT3c poderá ser uma metalotionina de resposta a elevadas concentrações de Ni, já que na parte aérea das plantas sujeitas ao tratamento de choque ocorre uma acumulação muito mais acentuada dos transcritos desta MT.

Este conjunto de resultados permite constatar que a presença de Ni induz a acumulação de transcritos de metalotioninas pertencentes a todos os grupos analisados.

Os resultados anteriores permitem complementar os dados obtidos nos ensaios de avaliação do grau de stress imposto pela exposição das plantas a Ni. Com efeito, os danos causados pelo Ni nas plantas tratadas com este metal pesado poderão ser minimizados não só pela acumulação de prolina como também pelo aumento da expressão de genes que codificam as metalotioninas referidas. O facto de não se terem verificado efeitos mais nefastos na parte aérea das plantas expostas a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  de Ni poderá estar relacionado com o aumento da acumulação de metalotioninas do tipo MT3c, uma vez que se verificou um grande aumento na acumulação dos transcritos destas MT na parte aérea das plantas do tratamento de choque. No caso das raízes, o órgão onde ocorreu uma maior acumulação de Ni nas plantas sujeitas a ambos os tratamentos, a circunstância de não se ter observado uma acumulação muito elevada de transcritos de MTs poderá ser explicada pelo facto destas proteínas poderem ser translocadas, e desse modo as MTs presentes nos tecidos aéreos poderão ser mobilizadas para as raízes e aí complexarem os iões de Ni, tornando-os

menos tóxicos, fornecendo, assim, um efeito protector contra os danos oxidativos observados quando as plantas são expostas a este metal pesado.

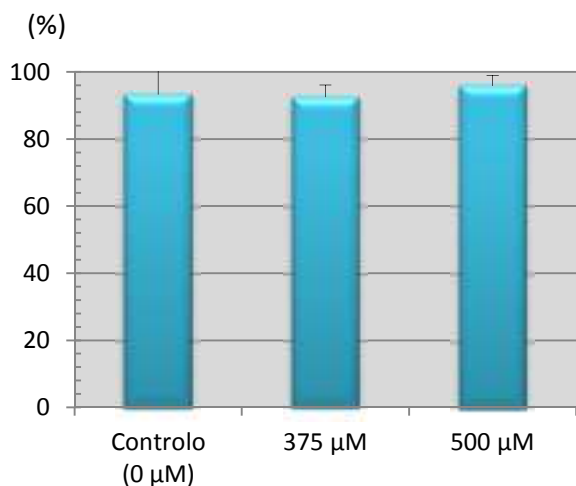
As metalotioninas parecem, pois, ter um papel relevante na homeostasia do Ni nas plantas sujeitas a um stress com este metal pesado, contribuindo para que os efeitos deletérios observados no crescimento e desenvolvimento de *S. nigrum* sejam minimizados, permitindo, assim, a sobrevivência destas plantas quando expostas a concentrações elevadas deste metal.

### **3.2. Crómio (III) [Cr (III)]**

#### 3.2.1. Determinação das concentrações de Cr (III) a utilizar nos estudos com *S. nigrum*

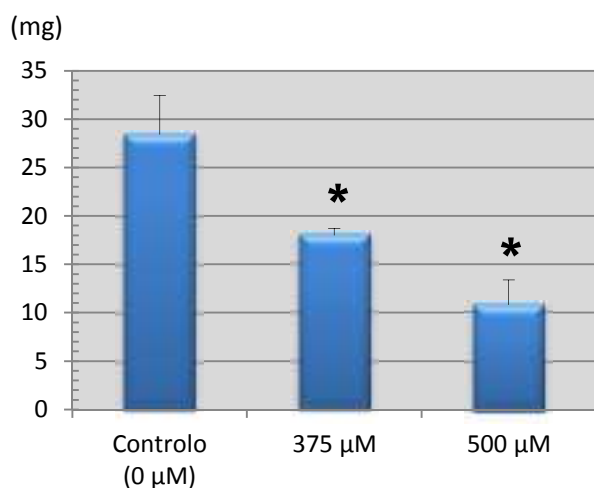
Sementes de *S. nigrum* foram colocadas a germinar em meio nutritivo suplementado com concentrações crescentes de Cr (III): 0  $\mu\text{M}$  (controlo), 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 375  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ , durante 30 dias. Este passo para a determinação das concentrações a usar foi realizado em dois ensaios. Foi efectuado um ensaio preliminar onde apenas se utilizaram as concentrações 0  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$  de Cr (III), e como não se verificaram quaisquer alterações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) relativamente à resposta de germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas na presença de Cr (III) face ao controlo, este ensaio foi repetido para concentrações mais elevadas deste metal, 375  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ . De seguida, serão apresentados apenas os resultados deste segundo ensaio.

Como se pode observar no gráfico 13, tal como se observou para as concentrações mais baixas de Cr (III) previamente testadas, não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na percentagem de germinação das sementes expostas ao Cr (III), comparativamente à situação controlo. Este resultado sugere, tal como o observado para o Ni, que estes órgãos poderão ser tolerantes aos níveis de Cr (III) utilizados neste ensaio.



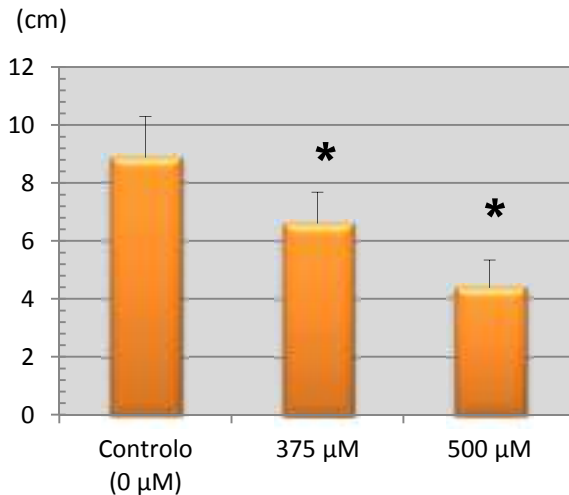
**Gráfico 13** – Percentagem de germinação de sementes de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Relativamente aos parâmetros biométricos determinados, foi possível observar um decréscimo estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) da biomassa total em ambos os tratamentos com Cr (III) (gráfico 14), tendo este valor decrescido 36,6% no tratamento com 375 µM de Cr (III) e cerca de 62% no tratamento com 500 µM de Cr (III), face à situação controlo. Estes resultados permitiram verificar que as concentrações do metal pesado utilizadas, tiveram um efeito negativo no crescimento destas plântulas, já que provocaram um decréscimo da sua biomassa total.



**Gráfico 14** - Biomassa total das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

No gráfico 15 estão presentes os valores do comprimento da raiz das plântulas no final dos tratamentos com Cr (III). Foi possível verificar uma diminuição significativa deste parâmetro nos dois tratamentos realizados, comparativamente ao controlo, sendo este decréscimo de 25,7% no caso do tratamento com 375  $\mu\text{M}$  de Cr (III) e de cerca de 50,7% no tratamento com 500  $\mu\text{M}$  deste metal.

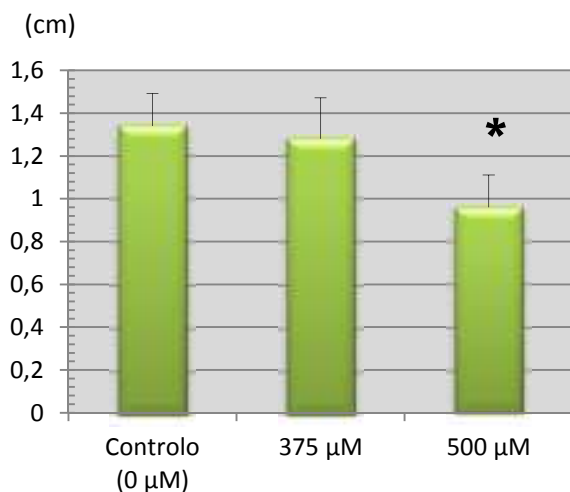


**Gráfico 15** - Comprimento da raiz das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Este dado sugere que o decréscimo da biomassa total das plântulas referido anteriormente poderá ser em parte devido à diminuição do comprimento das raízes quando expostas a Cr (III), apontando também para o efeito prejudicial deste metal pesado no desenvolvimento destas plântulas.

Já a determinação da altura da parte aérea permitiu verificar um decréscimo significativo apenas no tratamento com 500  $\mu\text{M}$  de Cr (III), sendo essa diminuição de 28,4%, face ao controlo (gráfico 15). Estes resultados mostram que a concentração de 500  $\mu\text{M}$  de Cr (III) foi a única que provocou alterações significativas em todos os parâmetros biométricos analisados, à imagem da concentração mais elevada utilizada nos ensaios com Ni, indicando que este nível de Cr (III) utilizado provocou efeitos nefastos no crescimento das plântulas.





**Gráfico 16** - Altura da parte aérea das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Na figura 9 é possível observar uma imagem obtida no final do tratamento com estas concentrações de Cr (III), sendo possível verificar a diferença de crescimento entre as plântulas sujeitas a concentrações crescentes deste metal, indicando que o Cr (III) terá provocado alterações na fisiologia e morfologia das plântulas.



**Figura 9** - Fotografia comparativa do crescimento das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas a concentrações crescentes de Cr (III), após 30 dias de tratamento com este metal pesado.

Após a análise destes resultados considerou-se a concentração de 375  $\mu\text{M}$  de Cr (III) como aquela a utilizar em futuros estudos de crescimento das plântulas, uma vez que esta concentração é suficiente para provocar um efeito negativo nas primeiras fases de crescimento destas, de modo a simular um ambiente poluído com este metal pesado.

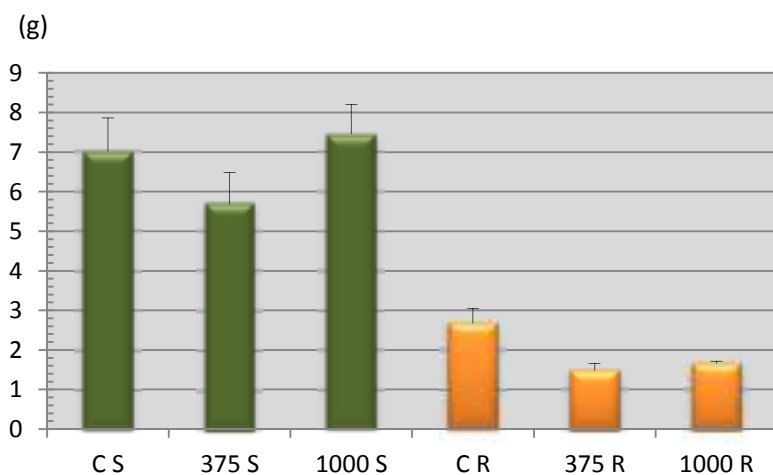
Definiu-se ainda a utilização da concentração de 1000  $\mu\text{M}$  para futuros tratamentos de choque com Cr (III), simulando uma descarga de poluentes contendo este metal pesado num solo não contaminado, com o intuito de verificar o efeito deste metal em *S. nigrum*. O facto de se ter optado por uma concentração superior à concentração máxima utilizada no estudo descrito anteriormente prende-se com o facto da concentração de 500  $\mu\text{M}$  de Cr (III), apesar de provocar alterações significativas em todos os parâmetros biométricos analisados, não ter sido tão nefasta para as plântulas como a concentração máxima utilizada nos tratamentos com Ni.

### 3.2.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de *S. nigrum* a níveis elevados de Cr (III)

Tal como o realizado nos ensaios com Ni, os ensaios de exposição das plantas de *S. nigrum* a concentrações elevadas de Cr (III) decorreu em cultura hidropónica. Foram consideradas 3 situações, um controlo sem adição de Cr (III) ao meio nutritivo, um tratamento prolongado com 375  $\mu\text{M}$  de Cr (III), durante 4 semanas, e um tratamento de choque com 1000  $\mu\text{M}$  de Cr (III), durante uma semana.

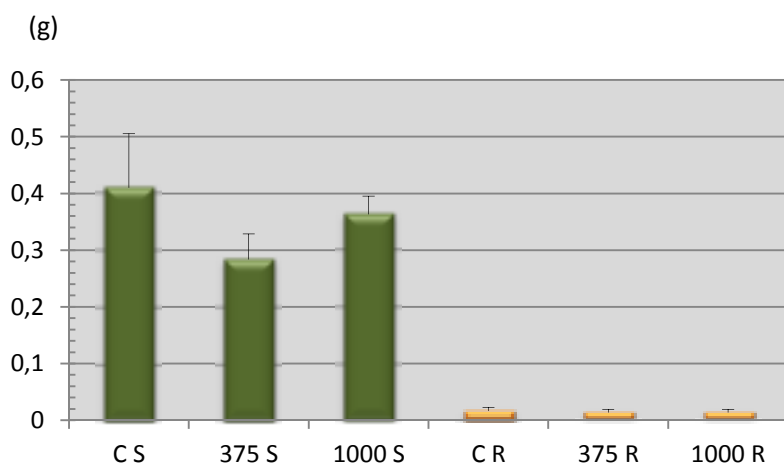
No final do período de exposição das plantas a este metal, as plantas sujeitas a ambos os tratamentos não demonstravam qualquer sinal macroscópico de toxicidade de Cr (III), i.e., não se verificavam diferenças exteriores visíveis entre as plantas expostas a Cr (III) e as plantas da situação controlo.

No gráfico 17 estão representados os valores da biomassa total das plantas sujeitas aos tratamentos com Cr (III). Foi possível verificar que não ocorreram variações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na parte aérea e na raiz em ambos os tratamentos, em relação ao controlo.



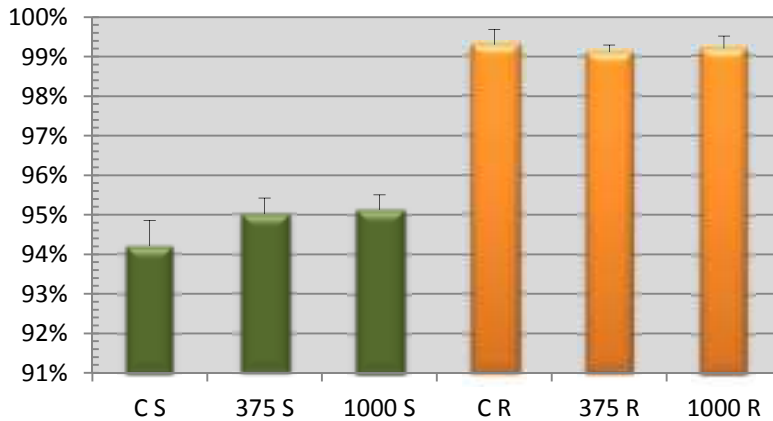
**Gráfico 17** - Biomassa total das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375 µM e 1000 µM de Cr (III). As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R).

Outro parâmetro determinado foi a biomassa seca das plantas em estudo, cujos valores podem ser observados no gráfico 18. Estes resultados mostram que não existiram variações estatisticamente significativas, na parte aérea e nas raízes das plantas provenientes de ambos os tratamentos com Cr (III), quando comparadas com o controlo.



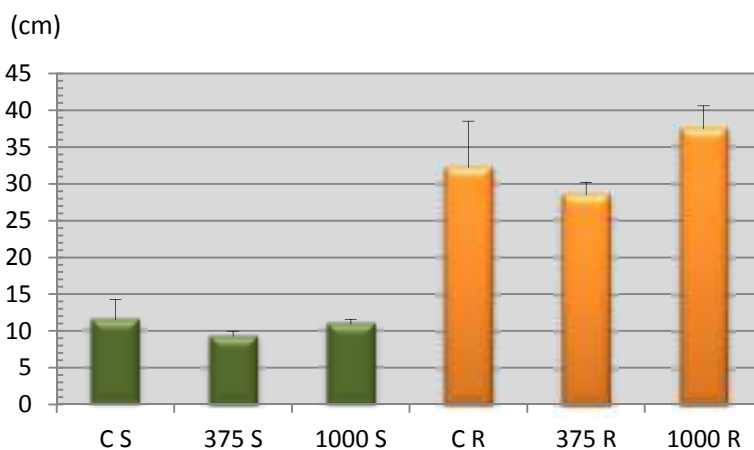
**Gráfico 18** - Biomassa seca das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375 µM e 1000 µM de Cr (III). As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R).

No gráfico 19 está representada a variação do conteúdo hídrico das plantas, parâmetro este que é o reflexo dos dois parâmetros descritos anteriormente. Não ocorreu variação estatisticamente significativa na parte aérea e nas raízes das plantas sujeitas a ambos os tratamentos, relativamente ao controlo.



**Gráfico 19** - Variação do conteúdo hídrico das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375 µM e 1000 µM de Cr (III). As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R).

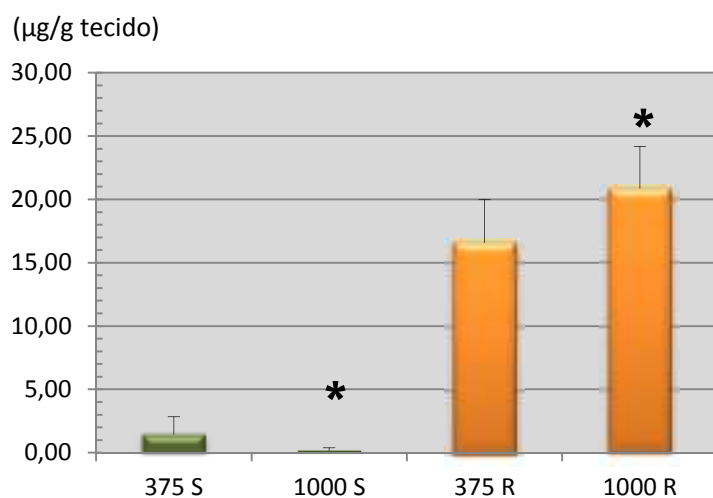
Os valores obtidos para a altura da parte aérea e o comprimento da raiz podem ser observados no gráfico 20. Foi possível verificar que também não se observaram quaisquer alterações estatisticamente significativas, face ao controlo, no que diz respeito a estes dois parâmetros biométricos.



**Gráfico 20** - Altura da parte aérea e comprimento da raiz das plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375 µM e 1000 µM de Cr (III). As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R).

Os resultados acabados de descrever sugerem que as elevadas concentrações de Cr (III) utilizadas não exercem efeitos prejudiciais no crescimento e desenvolvimento de *S. nigrum*, ao contrário do descrito para outras espécies, como o melão [1] e o repolho [69], em que elevadas concentrações de Cr (III) provocaram deficiências no crescimento, clorose foliar e danos no desenvolvimento das raízes. Os resultados obtidos apontam para uma tolerância por parte de *S. nigrum* a altas concentrações de Cr (III), que poderá estar relacionada com os mecanismos enzimáticos antioxidantes e/ou a intervenção de agentes quelantes, como as metalotioninas [18].

Observando o gráfico 21 é possível verificar uma acumulação muito superior de Cr (III) nas raízes das plantas sujeitas a ambos os tratamentos, relativamente ao nível quantificado na parte aérea das mesmas. É ainda possível verificar um aumento estatisticamente significativo ( $p \leq 0,05$ ) em 1,26 vezes no nível acumulado pelas raízes das plantas sujeitas ao tratamento prolongado comparativamente ao nível quantificado nas plantas sujeitas ao tratamento de choque, enquanto que na parte aérea o nível do metal pesado decresceu cerca de 89,9%.



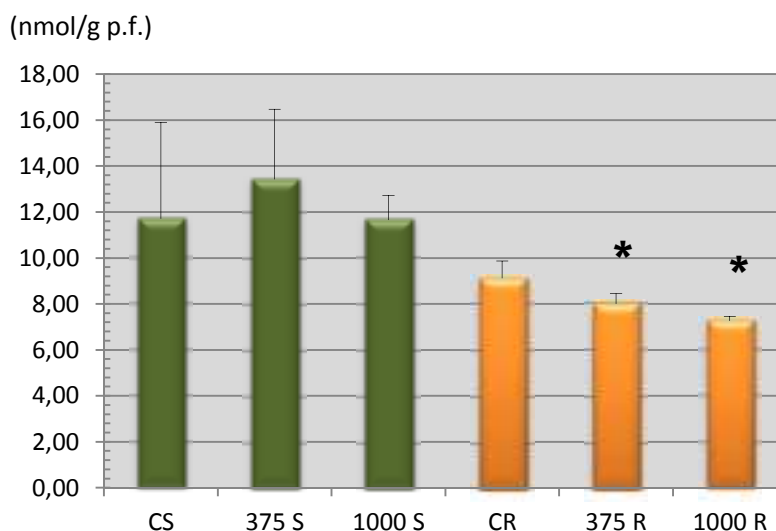
**Gráfico 21** – Teor de Cr (III) presente nos tecidos de plantas de *S. nigrum* sujeitas aos tratamentos de 375 µM e 1000 µM de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

Estes resultados vão de encontro ao observado para outras espécies vegetais, em que se registou uma maior acumulação de Cr (III) nas raízes comparativamente à parte aérea [1, 69, 73]. O facto do nível de Cr (III) acumulado nas raízes das plantas sujeitas a uma exposição mais elevada do metal pesado ter aumentado sugere uma tolerância de *S. nigrum* à toxicidade por Cr (III), uma vez que tal aumento não parece ter prejudicado o crescimento das mesmas. A diminuição do nível de Cr (III) acumulado na parte aérea das plantas sujeitas ao tratamento de choque pode ser explicado pelo facto da

translocação deste metal da zona radicular para os tecidos aéreos ser lenta [89], pelo que uma semana de exposição a este nível de Cr (III) não terá sido suficiente para aumentar o nível deste metal na parte aérea das plantas, sugerindo que a planta possui mecanismos de defesa que lhe permitem manter o Cr (III) fora do alcance da zona foliar, onde este poderá provocar dano oxidativo e inibição fotossintética [68].

Pelo facto de os níveis de Cr (III) acumulados na planta serem superiores nas raízes em relação à parte aérea, onde os níveis deste metal são inferiores a 1 mg/g peso seco [47], conclui-se que esta espécie vegetal não pode ser considerada uma planta hiperacumuladora deste metal. Contudo, a elevada quantidade de Cr (III) determinada ao nível radicular aponta para uma potencial utilização desta planta na remediação de ambientes contaminados por Cr (III) através do processo de fitoestabilização, impedindo, deste modo, que o metal presente nestes locais seja lixiviado e atinja outros cursos naturais de água, poluindo-os.

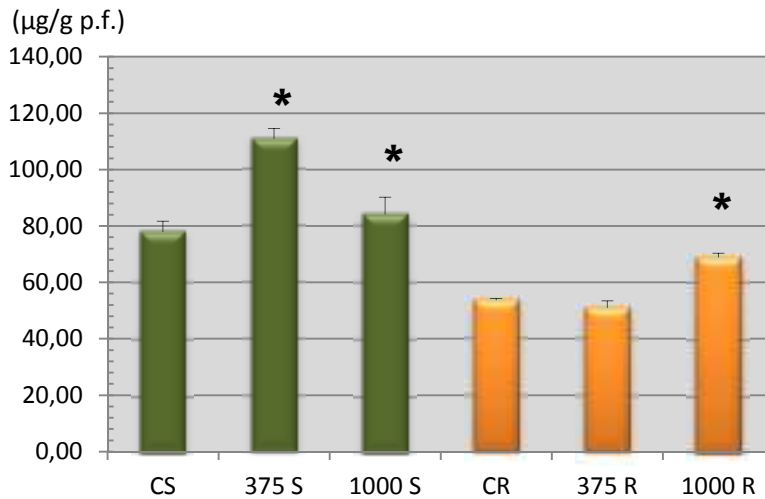
Para verificar se as plantas sujeitas aos tratamentos com Cr (III) sofreram algum stress oxidativo, procedeu-se à quantificação do nível de MDA presente nos tecidos vegetais em análise, cujos valores podem ser observados no gráfico 22. Foi possível observar uma variação estatisticamente significativa, nos valores de MDA existente nas raízes das plantas sujeitas a ambos os tratamentos, quando comparados com o controlo. As variações observadas nestes órgãos corresponderam a uma diminuição de 12,3% no caso da exposição prolongada e de 20,4% no tratamento de choque. No que diz respeito à parte aérea das plantas, não se verificaram quaisquer variações estatisticamente significativas.



**Gráfico 22** - Teor de malondialdeído (MDA) presente nos tecidos de plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

O facto de se terem registado níveis mais elevados de peroxidação lipídica na parte aérea comparativamente aos registados na raiz das plantas sujeitas a ambos os tratamentos é, como já referido no caso do Ni, devido ao facto dos tecidos fotossintéticos das plantas, quando expostos a um excesso de energia luminosa poderem conduzir à formação de EROs, responsáveis pelo despoletar de danos oxidativos, como a peroxidação lipídica [96]. A diminuição do nível de peroxidação lipídica nos tecidos radiculares das plantas provenientes dos dois tratamentos com Cr (III) é, possivelmente, devida à capacidade que as plantas têm em se protegerem dos efeitos inibitórios que as elevadas concentrações deste metal pesado provocam, nomeadamente a produção de EROs, o que por sua vez origina dano oxidativo [14, 15]. Devido à presença de moléculas que formam complexos não tóxicos com o metal pesado, como a prolina (gráfico 23) e, possivelmente, outros agentes quelantes, como as metalotioninas, fitoquelatinas e ácidos orgânicos [18], o nível de peroxidação lipídica registado nas raízes do tratamento de choque é significativamente mais baixo do que o das raízes situação controlo, o que aponta para uma grande actividade destes agentes protectores, sugerindo uma capacidade por parte de *S. nigrum* de tolerar este metal pesado e resistir aos danos intracelulares sofridos. Com efeito, no caso do tratamento de choque, verificou-se um aumento estatisticamente significativo de 1,26 vezes no teor de prolina livre quantificada, comparativamente ao controlo.

Foi possível também observar uma variação estatisticamente significativa no teor de prolina existente na parte aérea das plantas sujeitas a ambos os tratamentos com Cr (III), quando comparado com o controlo. A variação no caso do tratamento prolongado corresponde a um aumento de 1,42 vezes relativamente ao teor da situação controlo, enquanto que no tratamento de choque os níveis de prolina aumentaram 1,08 vezes. Estes resultados observados, no caso da parte aérea, podem ser explicados, tal como já descrito anteriormente para o Ni, pelo facto da presença do metal pesado *per se* despoletar um aumento do teor de prolina, que juntamente com os níveis de peroxidação lipídica observados nestes tecidos, explicam a variação significativa do teor deste agente protector na parte aérea das plantas. Este facto vai de encontro ao descrito para outras espécies vegetais, em que a exposição a elevadas concentrações de Cr (III) conduz ao aumento da acumulação de prolina existente nos tecidos aéreos [60, 69, 73].

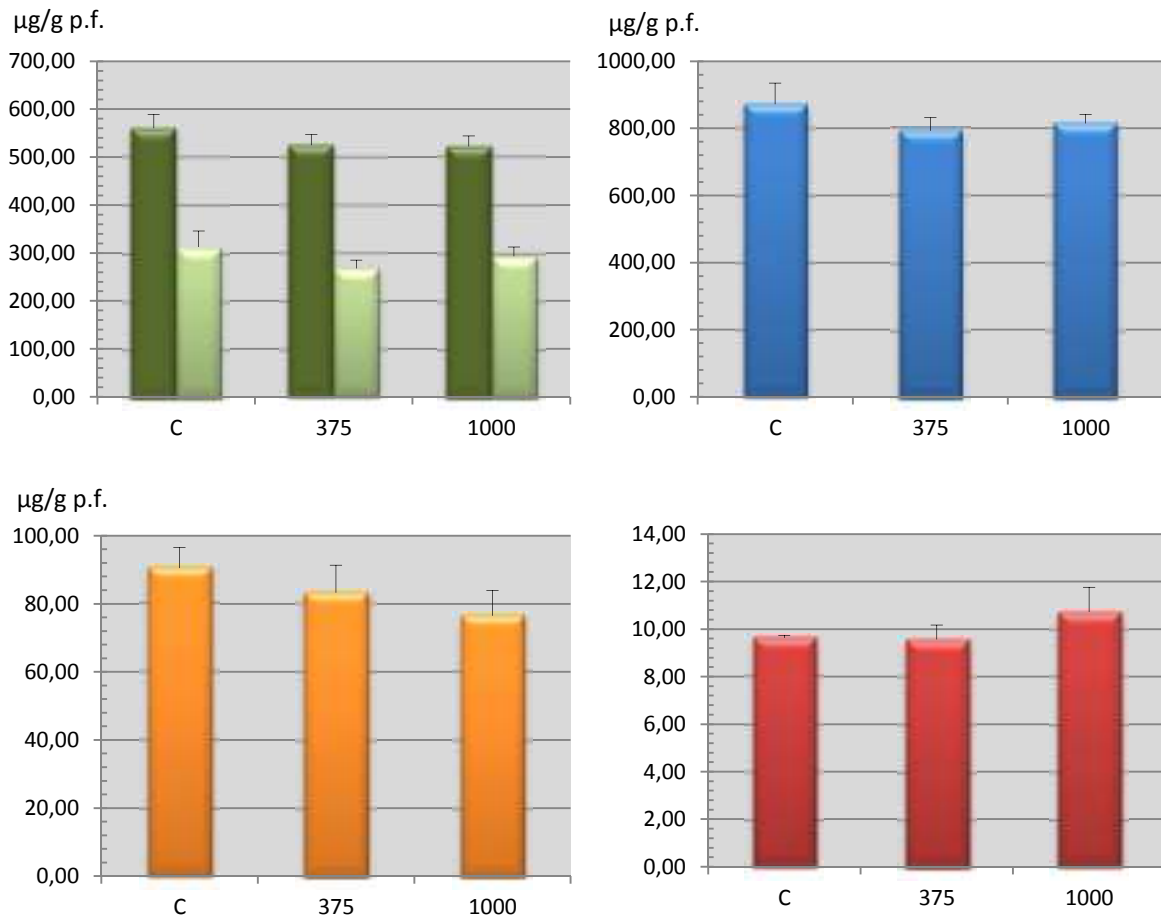


**Gráfico 23** - Teor de prolina livre existente nos tecidos de plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375 µM e 1000 µM de Cr (III). As colunas representam a média ± desvio padrão. As barras verdes representam a parte aérea (S) e as barras laranja a raiz (R). (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

No caso das raízes, os resultados observados sugerem que, nas plantas sujeitas ao tratamento de choque, o aumento dos níveis de prolina será um dos mecanismos de defesa da planta em resposta a um nível muito elevado de Cr (III), o que aponta para um papel da prolina na tolerância de *S. nigrum* a este metal. Já nas raízes do tratamento prolongado não se regista um aumento da acumulação de prolina, o que indica que serão outros mecanismos os envolvidos na defesa das plantas a este nível de Cr (III), possivelmente outros agentes quelantes de metais pesados, como por exemplo, as metalotioninas [18].

Outro dos parâmetros determinado foi o registo das variações no nível de clorofilas e carotenóides das plantas sujeitas aos diferentes tratamentos com Cr (III), cujos valores podem ser observados no gráfico 24. Não foram detectadas variações estatisticamente significativas, em nenhum dos parâmetros analisados: níveis de clorofila a, clorofila b e teor total de clorofilas, nível de carotenóides e razão entre clorofilas e carotenóides, quando comparado com o controlo. Estes resultados sugerem que os cloroplastos não terão sofrido danos oxidativos, possivelmente devido ao nível baixo de Cr (III) presente nos tecidos aéreos das plantas tratadas com este metal, aliado ao aumento do teor em prolina livre, o que fez com que as plantas não tivessem que recorrer ao aumento dos níveis de carotenóides para se defenderem dos danos oxidativos que poderiam afectar os complexos fotossintéticos, dado este que aponta também para uma tolerância por parte das plantas aos níveis elevados de Cr (III).





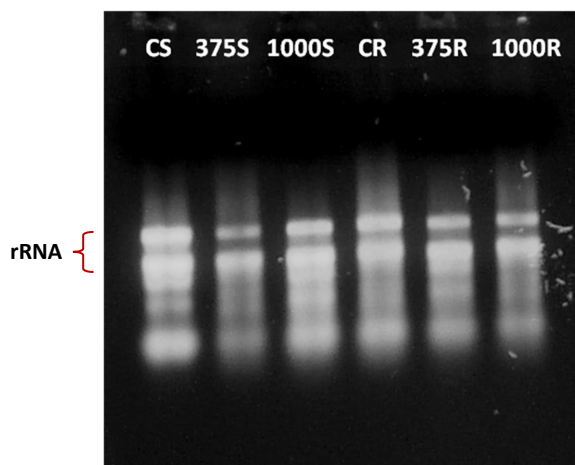
**Gráfico 24** - Níveis de clorofilas e carotenóides quantificados nos tecidos de plantas de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  de Cr (III). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. As barras verdes escuro representam o nível de clorofila a, as verde claro representam o nível de clorofila b e as barras azuis representam o valor total de clorofilas. As barras laranja representam o teor de carotenóides e as vermelhas representam a razão entre clorofilas e carotenóides presentes nos tecidos das plantas em estudo.

Os resultados anteriores permitem verificar que as plantas tratadas acumulam Cr (III) maioritariamente nas raízes, o que conduz ao desencadear de stress oxidativo neste órgão e, por sua vez, a uma necessidade da planta em aumentar alguns compostos que se ligam ao metal pesado, transformando-o em complexos não-tóxicos. De entre estes compostos, a prolina no caso do tratamento de choque com Cr (III), e outros agentes quelantes, como as metalotioninas ou as fitoquelatinas [18], no caso das plantas sujeitas ao tratamento prolongado, poderão ser as responsáveis pela defesa a nível radicular ao stress oxidativo provocado pelo Cr (III).

### 3.2.3. Avaliação da acumulação de mRNAs de MTs de *S. nigrum* expostas a Cr (III)

Com o intuito de avaliar possíveis alterações na acumulação dos mRNAs que codificam MTs de *S. nigrum*, em resposta à exposição a Cr (III), e de averiguar se uma variação dessa acumulação estaria dependente especificamente deste metal, foram realizadas reacções de PCR semi-quantitativas, utilizando os dois grupos de *primers* descritos anteriormente em 3.1.3.

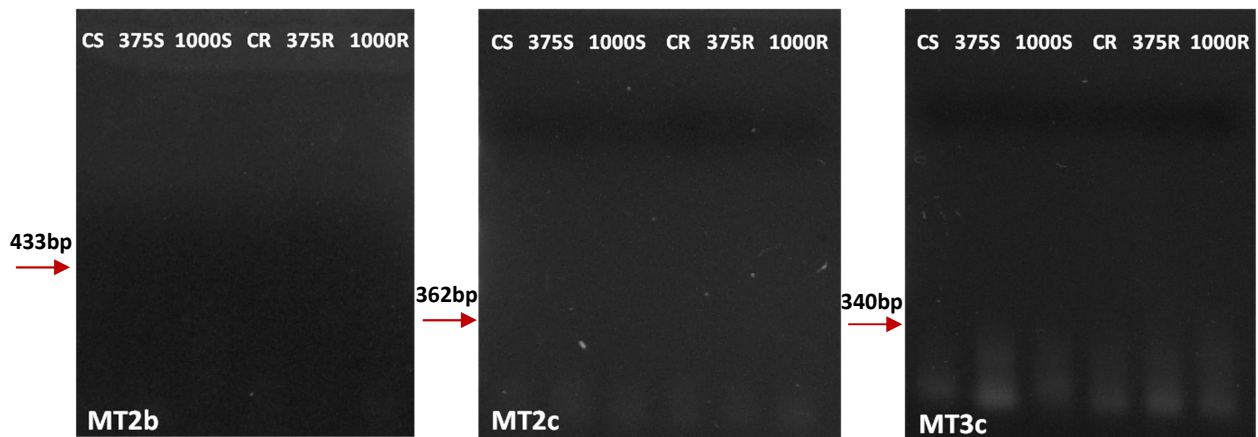
De um modo análogo ao realizado para o Ni, os RNAs extraídos das raízes e da parte aérea das plantas provenientes dos ensaios com Cr (III) foram quantificados e a sua concentração e qualidade avaliadas em gel de agarose (figura 10), tendo-se procedido a um reajuste nos volumes de RNA a utilizar nas reacções de RT, para que estas se iniciassem com massa de RNA aproximada, pelas razões já apontadas aquando da análise das plantas tratadas com Ni.



**Figura 10** – Exemplo de uma separação electroforética típica em gel de agarose (0,8% (p/v)) das preparações de RNA total extraído da parte aérea (S) e de raízes (R) de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M de Cr (III).

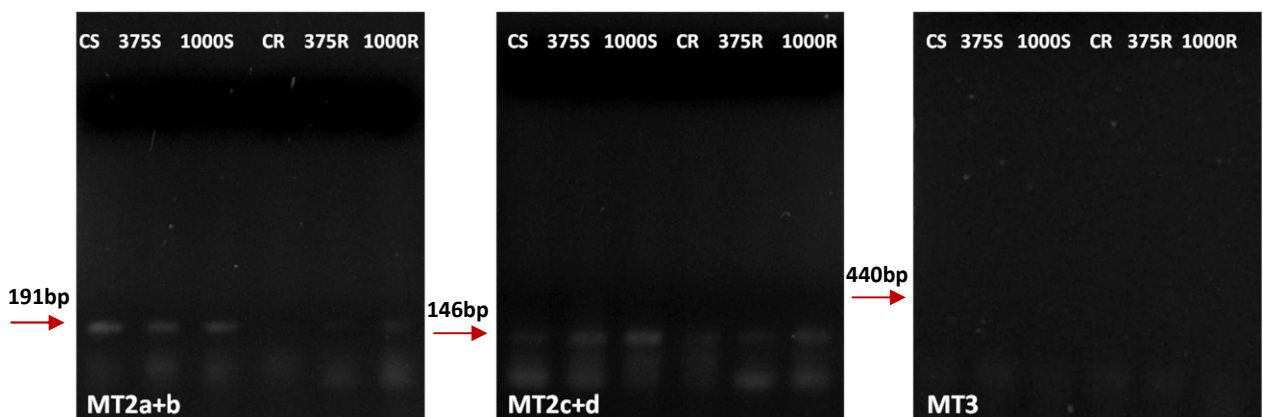
Os resultados típicos dos produtos de PCR originados podem ser observados nas figuras 11 e 12.

É possível observar que não houve acumulação de transcritos relacionados com as MT2b, MT2c e MT3c, quer nos tecidos da parte aérea quer nas raízes das plantas sujeitas aos diversos tratamentos com Cr (III). Este facto indica que estas MTs não estão directamente envolvidas na homeostasia deste metal pesado em *S. nigrum*.



**Figura 11** – Exemplo de uma separação electroforética típica em gel de agarose (1% (p/v)) dos produtos das reacções de PCR realizadas para a detecção de transcritos de MT2b, MT2c e MT3c na parte aérea (S) e em raízes (R) de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de 375  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M de Cr (III). As setas indicam a localização e o tamanho esperado dos amplificadores. De salientar a ausência de amplificadores das MTs avaliadas.

Na figura 12 estão representados exemplos das imagens tipicamente obtidas após separação dos produtos de PCR do grupo de *primers* mais generalistas.



**Figura 12** – Exemplo de uma separação electroforética típica em gel de agarose (1% (p/v)) dos produtos das reacções de PCR realizadas para a detecção de transcritos de MT2a+b, MT2c+d e MT3 na parte aérea (S) e em raízes (R) de *S. nigrum* na situação controlo (C) e sujeitas aos tratamentos de 375  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M de Cr (III). As setas indicam a localização e o tamanho dos amplificadores de interesse. De salientar a ausência de amplificadores relacionados com as MT3.

Observando a imagem do grupo MT2a+b é possível observar que os transcritos deste grupo de MTs acumularam-se com níveis aproximados na parte aérea das plantas em todas as situações analisadas e que, portanto, as exposições ao Cr (III) não levaram à alteração dos seus níveis. Nas raízes, os mRNAs destas MTs também foram detectados na situação controlo, havendo um aumento da acumulação destes transcritos nas situações de tratamento com Cr (III), maioritariamente na situação de tratamento de choque. Uma vez que não houve acumulação de transcritos das MT2b, serão os transcritos das MT2a os induzidos na presença de Cr (III) ao nível das raízes.

No grupo das MT2c+d foi possível constatar a existência de transcritos das MTs deste grupo na parte aérea das plantas controlo, cuja acumulação aumentou nas situações de tratamento com Cr (III). No caso das raízes, é possível verificar a acumulação destes mRNAs na situação controlo, registando-se um aumento da sua acumulação nas situações de tratamento, sendo que este aumento é maior na situação de tratamento de choque, resultado este semelhante ao observado para o grupo MT2a+b. Neste grupo de MTs (MT2c+d) serão os transcritos das MT2d os acumulados na presença de Cr (III), visto não ter havido acumulação dos transcritos das MT2c em nenhuma das situações estudadas, indicação de que há uma indução da acumulação destes transcritos (MT2d) na raiz e na parte aérea das plantas tratadas com Cr (III).

No grupo das MT3, verifica-se que não houve acumulação de transcritos de nenhuma das MTs, quer nos tecidos da parte aérea quer nas raízes das plantas controlo ou da sujeitas aos tratamentos com Cr (III).

Este conjunto de resultados permite verificar que a presença de Cr (III) induz apenas a acumulação de transcritos de MTs do grupo MT2, sendo que as MT3 não estarão envolvidas na homeostasia deste metal pesado em *S. nigrum*.

Os dados descritos anteriormente sugerem algumas explicações para o observado nos ensaios de avaliação do grau de stress imposto às plantas expostas a Cr (III). Os danos oxidativos sofridos pelas raízes das plantas tratadas com a concentração mais elevada deste metal pesado podem ter sido diminuídos pela acumulação de MTs do tipo 2, o que é apoiado pelo aumento da acumulação dos seus transcritos. Com efeito, para além do papel desempenhado pela prolina, também as MTs acumuladas nas raízes poderão ter um efeito protector que levará estas plantas a tolerarem o Cr (III). A acumulação de transcritos destas MTs na parte aérea das plantas, onde este metal não é acumulado num nível elevado, pode ser explicada devido à possibilidade destas

proteínas poderem ser translocadas, sendo que as MTs sintetizadas nos tecidos aéreos poderão ser conduzidas para a zona radicular, onde a acumulação deste metal pesado é maior. Apesar deste papel aparente das MTs na quelatação dos iões metálicos, o facto de não haver uma forte indução de nenhuma MT em específico por parte do Cr (III) sugere que não serão apenas estas proteínas as envolvidas no processo de tolerância ao metal pesado, podendo estar também envolvidas as fitoquelatinas e outros agentes quelantes [18], que sequestrem os iões metálicos, tornando-os não tóxicos para as plantas. Todos estes agentes em conjunto poderão explicar a grande tolerância de *S. nigrum* a elevadas concentrações de Cr (III), concentrações estas que não provocam problemas no crescimento e desenvolvimento destas plantas, como seria expectável.

A comparação dos resultados obtidos nos ensaios anteriores com o Ni e o Cr (III) permitem já ter uma visão global sobre a influência destes dois metais pesados na indução da acumulação de transcritos de MTs nos diferentes órgãos das plantas expostas a estes metais.

Assim, é possível observar que a acumulação de transcritos das MT2a é induzida pelo Ni, na parte aérea e na raiz, e pelo Cr (III) apenas na raiz. Também foi possível verificar uma acumulação dos transcritos deste grupo de MTs nas situações controlo, o que sugere que as MT2a poderão estar envolvidas no normal metabolismo dos metais, assim como num processo primário de defesa das plantas à exposição a metais pesados, uma vez que os seus transcritos aumentaram em resposta à exposição ao Cr (III) e Ni, apontando para um papel de defesa não específico para um metal, i.e., não dependente de um determinado metal.

No caso das MT2b, não se observou acumulação dos seus transcritos em nenhum dos tecidos das plantas controlo e das plantas tratadas com ambos os metais. Este facto pode estar relacionado com a proveniência do cDNA destas MTs, clonado em laboratório a partir de plântulas de *S. nigrum* expostas a cádmio, o que sugere uma especificidade deste tipo de MTs a este metal pesado ou ao estado de desenvolvimento vegetal (fase plântula), não tendo sido por isso detectada em nenhuma das situações analisadas nestes trabalho (fase planta).

Já a acumulação dos transcritos das MT2c apenas na parte aérea das plantas expostas ao Ni sugerem um papel específico de um grupo de MTs na sua homeostasia, uma vez que o Cr (III) não induziu tal resposta.

Relativamente às MT2d e MT2a verificou-se ocorrer um padrão de acumulação semelhante em resposta à exposição quer ao Ni, quer ao Cr (III). Com efeito, foi possível observar a acumulação dos transcritos destes tipos de MTs nas raízes e nas partes aéreas das plantas controlo, níveis estes igualmente induzidos quer pelo Ni, quer pelo Cr (III) nesses mesmos tecidos. Este dado sugere, um envolvimento destas MTs no metabolismo e homeostasia dos metais na planta, assim como uma participação primária na defesa à exposição a elevadas quantidades de metais pesados, de um modo independente do metal. Seria interessante verificar se este tipo de resposta também se verificará após a exposição de um metal considerado nutriente para a planta, como, por exemplo, o Fe, a fim de validar esta hipótese.

Um resultado peculiar prende-se com a observação da acumulação de transcritos das MT3 na parte aérea das plantas expostas a Ni, maioritariamente nas plantas provenientes do tratamento de choque. De facto, estes resultados destacam-se pelo facto destas MTs serem descritas como específicas dos frutos [17, 18, 50, 79], órgão este que não se tinha formado no final dos ensaios efectuados. Por esta indução ser maior na parte aérea das plantas expostas à concentração mais elevada de Ni, estes resultados sugerem que serão estas metalotioninas as envolvidas na tolerância a um nível tão alto de Ni, permitindo a diminuição do dano oxidativo que este metal pesado origina nestas plantas.

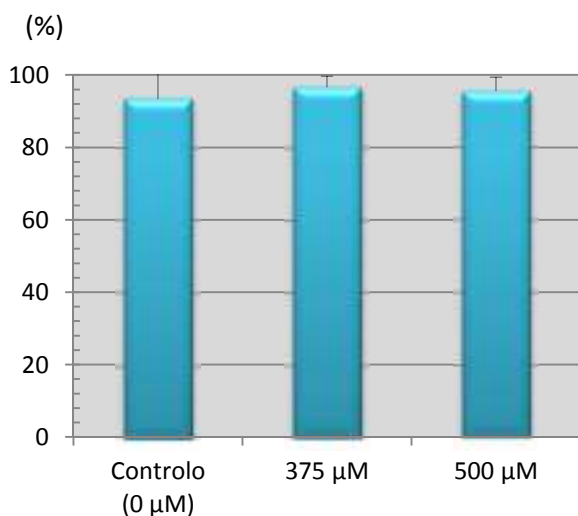
É, pois, possível postular que o Ni (e, possivelmente, outros metais quimicamente semelhantes) induzirá de forma específica a acumulação de transcritos da MT2c e das MT3, estando estas metalotioninas intimamente relacionadas com a tolerância de *S. nigrum* a este metal pesado. No caso do Cr (III) não se verifica uma indução específica de nenhuma das MTs estudadas, o que indica que a tolerância das plantas a elevadas concentrações deste metal pesado poderá ser devida a outro grupo de MTs, nomeadamente as MT1 que estão descritas como específicas da zona radicular [18], onde o Cr (III) é mais acumulado, podendo também estar ligada à existência de outros agentes quelantes, como as fitoquelatinas e ácidos orgânicos [18, 98], que permitam à planta tornar este metal tóxico não tão nefasto para o seu crescimento. O facto de não se ter quantificado um nível muito elevado de Cr (III) nos tecidos das plantas expostas a este metal poderá indicar que *S. nigrum* têm também a capacidade de fitoestabilizar este metal pesado na sua zona radicular, diminuindo assim o nível de Cr (III) que entra para as raízes, permitindo com isso diminuir o stress (oxidativo) que a presença deste metal provoca normalmente.

### 3.3. Crómio (VI) [Cr (VI)]

#### 3.3.1. Determinação das concentrações de Cr (VI) a utilizar nos estudos com *S. nigrum*

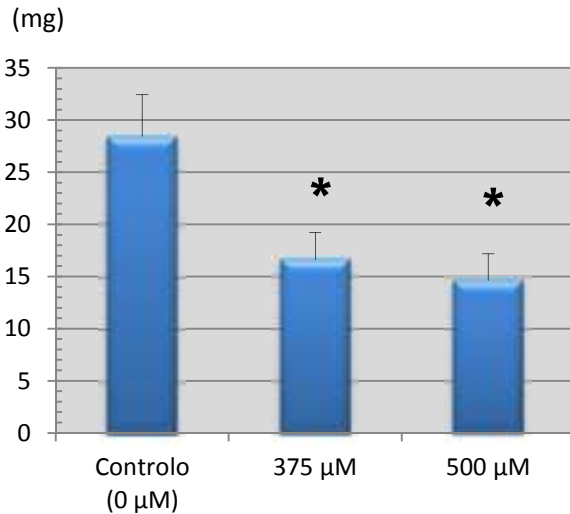
A determinação das concentrações de Cr (VI) a utilizar nos estudos de exposição de *S. nigrum* a este metal foi realizada do mesmo modo descrito anteriormente para o Ni e Cr (III). Sementes desta espécie vegetal foram colocadas a germinar em meio nutritivo suplementado com concentrações crescentes de Cr (VI): 0  $\mu\text{M}$  (controlo), 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 375  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ , durante 30 dias. À semelhança do realizado para o Cr (III), este passo de definição das concentrações a usar foi efectuado em dois ensaios. Foi realizado um ensaio preliminar onde apenas se utilizaram as concentrações 0  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$  e 250  $\mu\text{M}$  de Cr (VI), e como não se verificaram quaisquer alterações estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) relativamente à resposta de germinação das sementes e desenvolvimento das plântulas na presença de Cr (VI), face ao controlo, este ensaio foi repetido para concentrações mais elevadas deste metal, 375  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$ . Por estas razões, serão apenas apresentados os resultados do segundo ensaio.

Como se pode observar no gráfico 25, apesar de se terem aumentado consideravelmente as concentrações de Cr (VI), não se verificaram quaisquer diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) na percentagem de germinação das sementes expostas ao Cr (VI), comparativamente à situação controlo. Este resultado indica, tal como observado e descrito no caso do Ni e do CR (III), que estes órgãos poderão ser também ser tolerantes ao Cr (VI).



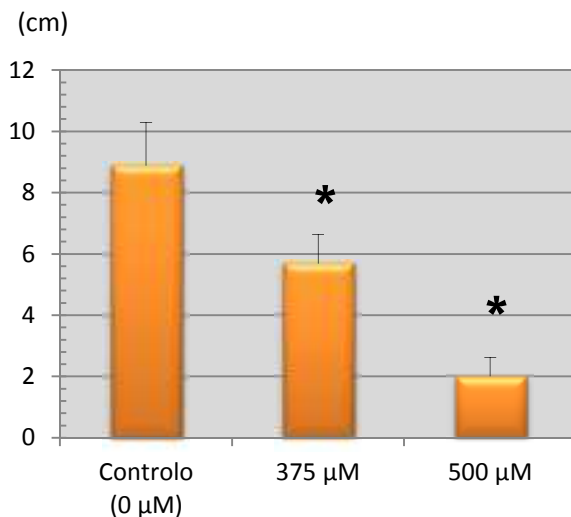
**Gráfico 25** – Percentagem de germinação de sementes de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (VI). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Relativamente aos parâmetros biométricos, verificou-se um decréscimo estatisticamente significativo da biomassa total em ambos os tratamentos com Cr (VI), tendo este valor decrescido cerca de 43% no tratamento com 375  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) e cerca de 62,4% no tratamento com 500  $\mu\text{M}$  de Cr (VI), face à situação controlo (gráfico 26). Estes resultados indicam que estas concentrações de Cr (VI) tiveram efeitos negativos no seu crescimento.



**Gráfico 26** - Biomassa total das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (VI). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .

No gráfico 27 podem ser observados os resultados obtidos para o comprimento da raiz. Em ambos os tratamentos com Cr (VI), observou-se uma diminuição significativa do comprimento da raiz, comparativamente ao controlo, que se traduziu num decréscimo de cerca de 36% no caso do tratamento com 375  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) e de 77,5% no tratamento com 500  $\mu\text{M}$ .



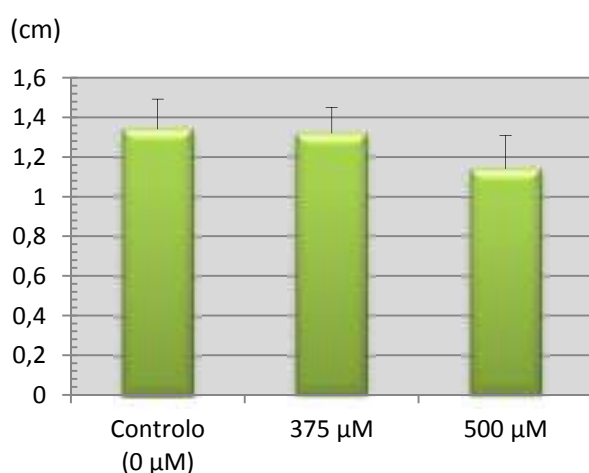
**Gráfico 27** - Comprimento da raiz das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (VI). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*) representam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$ .



Também foi possível verificar que as raízes das plântulas crescidas na situação de maior concentração de Cr (VI) sofreram uma ramificação exacerbada das raízes laterais, deixando de ser possível distinguir a raiz principal (figura 13).

Esta diminuição do comprimento da raiz contribuiu para o decréscimo da biomassa total das plântulas, como referido anteriormente, sendo outro indicador do efeito prejudicial do Cr (VI) no desenvolvimento das plântulas.

No caso da altura da parte aérea, como é possível observar no gráfico 28 e na figura 13, não se verificaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em nenhum dos tratamentos realizados, comparativamente ao sucedido no controlo.



**Gráfico 28** - Altura da parte aérea das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas aos tratamentos de Cr (VI). As colunas representam a média  $\pm$  desvio padrão.

Na figura 13 é possível observar uma fotografia obtida no final do tratamento com estas concentrações de Cr (VI), onde é possível verificar a diferença de crescimento entre as plântulas sujeitas a concentrações crescentes deste metal, indicando que o Cr (VI) terá provocado alterações na fisiologia e morfologia das plântulas.



**Figura 13** - Fotografia comparativa do crescimento das plântulas de *S. nigrum* na situação controlo e sujeitas a concentrações crescentes de Cr (VI), após 30 dias de tratamento com este metal pesado.

Como os resultados observados nos ensaios com este metal são semelhantes aos observados no caso do Cr (III), considerou-se também a concentração de 375  $\mu\text{M}$  de Cr (VI) como aquela a usar nos tratamentos prolongados e a concentração de 1000  $\mu\text{M}$  para os tratamentos de choque, de modo a verificar o efeito deste metal no crescimento e desenvolvimento de *S. nigrum*, e também para os resultados de ambos os tratamentos poderem ser comparados.

### 3.3.2. Avaliação do grau de stress imposto pela exposição de *S. nigrum* a Cr (VI)

Tal como o realizado nos ensaios com Ni e Cr (III), os ensaios de exposição das plântulas de *S. nigrum* a concentrações elevadas de Cr (VI) decorreu em cultura hidropónica. Foram consideradas 3 situações, a situação controlo sem adição do metal ao meio nutritivo, um tratamento prolongado com 375  $\mu\text{M}$  de Cr (VI), durante 4 semanas, e um tratamento de choque com 1000  $\mu\text{M}$  de deste metal, durante uma semana.

Tal como se pode observar na figura 14, após uma semana de tratamento com 1000  $\mu\text{M}$  de Cr (VI), as plantas apresentavam deformações e clorose foliar acentuada, para além das folhas terem sofrido um elevado grau de abscisão. Com efeito, a parte aérea das plantas resumia-se ao caule e às folhas mais jovens.



**Figura 14** - Fotografia obtida após a semana de tratamento de *S. nigrum* com Cr (VI). À esquerda é possível observar plantas controlo e à direita plantas sujeitas ao tratamento de choque com 1000  $\mu\text{M}$  de Cr (VI).

A avaliação do grau de stress imposto não foi realizada para este metal, tal como descrito anteriormente para Ni e Cr (III), visto que as plantas sujeitas ao tratamento prolongado morreram antes do final do tempo de exposição e as plantas sujeitas ao tratamento de choque não apresentavam, no final do tratamento, biomassa suficiente para a avaliação dos biomarcadores de stress considerados.

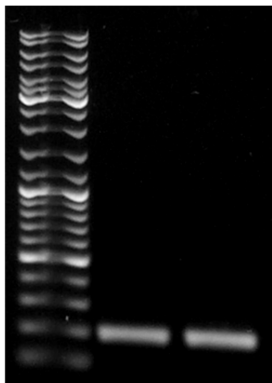
Este efeito tão nefasto provocado pela exposição das plantas a níveis elevados com Cr (VI) pode estar relacionado com o facto deste metal ser muito mais tóxico que o Cr (III), uma vez que o transporte para o interior da planta é efectuado recorrendo a transportadores de sulfatos [89], o que faz com que haja competição entre o enxofre e este metal pesado, o que levará a problemas no desenvolvimento da planta. Outro dos factores que poderá contribuir para este efeito tóxico tão acentuado é o facto, já descrito para outras espécies vegetais, de que o Cr (VI) maioritariamente acumulado nas raízes é reduzido a Cr (III) sendo libertadas EROs neste processo, o que conduz a diversos danos membranares e ao nível do DNA, que por sua vez poderão culminar na morte das plantas [14, 89, 102].

Um dos factos surpreendentes deste ensaio foi a constatação da semelhança do efeito destas concentrações de Cr (III) e Cr (VI) no desenvolvimento das plântulas, onde se verificaram efeitos prejudiciais similares nas plântulas expostas aos dois tipos de Cr, e as diferenças no desenvolvimento posterior das plantas, onde se verificou um crescimento normal das plantas expostas a Cr (III) e a morte das plantas sujeitas a Cr (VI). Este dado sugere numa fase posterior de desenvolvimento as plantas adquirem mecanismos de tolerância (específicos?) para fazer face aos níveis elevados de Cr (III), mas não conseguem suportar uma concentração elevada de Cr (VI), devido ao stress oxidativo que este metal provocará em *S. nigrum*.

Devido à impossibilidade de repetir estes ensaios em tempo útil, os estudos com Cr (VI) ficaram suspensos nesta fase e serão retomados futuramente, recorrendo a uma gama de valores de concentração inferiores.

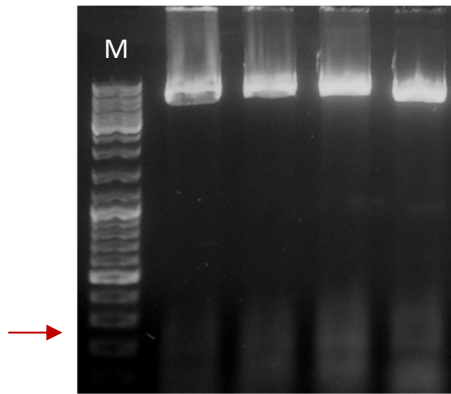
### 3.4. Elaboração de construções génicas para posterior silenciamento de MTs específicas em *S. nigrum*

Como se verificou da análise dos resultados descritos anteriormente, a acumulação de mRNAs da MT2c parece ser induzida especificamente pelo Ni na parte aérea das plantas expostas a este metal pesado, e por isso procedeu-se à tentativa de obtenção de plantas transgénicas com a expressão desta MT silenciada, de modo a que fosse possível verificar se a falta desta proteína afectava a tolerância de *S. nigrum* ao Ni. Para tal, recorreu-se à amplificação da região 3'UTR desta MT, utilizando *primers* específicos para esta região, produzindo amplificadores com 189bp. As bandas de interesse presentes no gel de agarose utilizado para analisar os produtos de PCR resultantes foram excisadas e purificadas, tendo o DNA obtido sido quantificado por electroforese me gel de agarose, comparando-o a um padrão conhecido (figura 15).



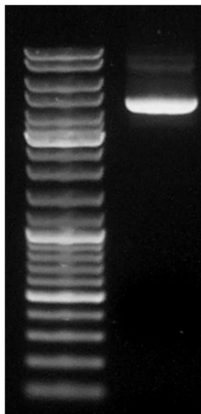
**Figura 15** – Quantificação dos fragmentos de DNA purificados relativos à região 3'UTR da MT2c DNA em gel de agarose (0,8 % (p/v)) por comparação com um padrão de fragmentos de DNA com massas e tamanhos moleculares conhecidos – GeneRuler DNA Ladder Mix (*Fermentas*, Lituânia).

De acordo com estes resultados, o DNA obtido por PCR foi ligado ao vector pTZ57R/T, e posteriormente utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Os resultados das reacções de restrição de rastreio dos DNAs plasmídicos extraídos das colónias de *E. coli* transformadas, portadores do fragmento de inserção de interesse, pode ser observado na figura 16.



**Figura 16** – Separação electroforética em gel de agarose (1%) dos resultados das restrições com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* dos DNAs plasmídicos extraídos de colónias de *E. coli* transformadas. M- GeneRuler DNA Ladder Mix (*Fermentas*, Lituânia). A seta assinala a posição da banda relativa ao fragmento clonado.

Com base nestes resultados, foi seleccionado o clone relativo à penúltima pista do gel anterior, e procedeu-se a nova extracção destes plasmídios com um *kit* comercial e a posterior quantificação em gel de agarose, cujo resultado pode ser observado na figura 17.



**Figura 17** – Quantificação do DNA plasmídico portador da região 3'UTR do cDNA da MT2c, após a sua extracção com um *kit* comercial, em gel de agarose (0,8% (p/v)) por comparação a um padrão de fragmentos de DNA com massas e tamanhos moleculares conhecidos – GeneRuler DNA Ladder Mix (*Fermentas*, Lituânia).

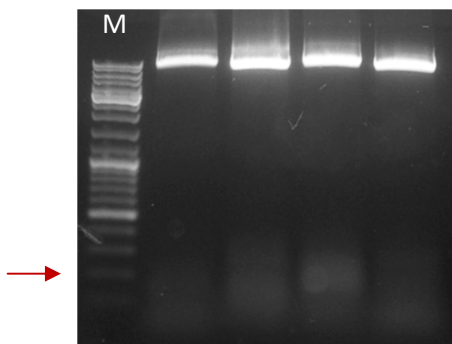
Para assegurar que o DNA obtido nos procedimentos referidos anteriormente possuía a sequência de interesse, procedeu-se à sua sequenciação, cujos resultados são apresentados na figura 18.

Com efeito, é possível observar que o DNA amplificado contém a sequência da região 3'UTR que se pretendia amplificar, tendo-se utilizado o DNA obtido para realizar uma reacção de ligação ao vector pG0229, previamente semi-preparado por outro elemento da equipa de investigação onde este trabalho se inseriu, para posteriormente transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (para uma melhor percepção da estratégia de clonagem utilizada consultar o Anexo III).

TTAGCCTCACTAAAGGGACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTTTTTTTTT  
TTTTTTTTTTTTTTTTGAGCAATAGAATCAAACCTTTCATTATCTTTGTTATTAATAAG  
AATAACATTGTTTTGTAACACAGCATTGCCAAATCATAGACAATGTATAAGGCCTTGCTG  
TATGAAAATACAATTCAACTGGCAAATAAACAGAAAAATAACAAGAGACAATCTACCCCT  
ATAACTAAAAATTAACACAGGTGAAGTCGAAAGGGTCGTTCCACAATTCAATCTTTTCTC  
CTATCCCAAATTGTGCAAACCGAAACAAGCGATCCCCGAGCCATCCATAGTAAAATGT  
CTCAAGGTTAACCGACGATGGTGGTTTCTGCGATCATGGAGGTAACGACGATGGGTCC  
ATATTTGAGGCTGGCCTTCTGTCCTCAAAGTATCCCTTGCCTGCCTTCTCTGTGTCTCTT  
CCAACACGGACAGATGCACCACGGTTTGAACCCCATTTGAAGGTGTTGATGTTGGCT  
GTCTCGTGCTTTCCAGTGAGACGACGCTCATTGCCTTACCATATGCAGCAATGTGTTCT  
TTGTGCTTCAGGCCAAGCGACAGCAACGAATTGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCT  
AGATT **GAGACCAAATGTCTCTTGT**TATATCAATTAAGTATGTGTTTTTAATAAGACT  
**ACAAAGCTATTGAACTGATCATCTACAAATCTTTATTGCAAAGGTTGTTTGATGTTAT**  
**TTCATGGTTTTTATGTTTGGTTTTCTAAATCTCATTAGTTATGTTTGTATGAAGGAAGT**  
**TGACATGGGCTTG**AATCGGATCCGGGCCCTCTAGAAGTATGACAGATACCATGGTCAAG  
AGTCCCCGTGTTCTCTCAAATGAAATGAACTTCC

**Figura 18** – Resultado da sequenciação do DNA plasmídico portador da região 3’UTR do cDNA da MT2c. Os *primers* utilizados na sua obtenção por PCR encontram-se assinalados a vermelho e a sequência de interesse salientada a amarelo. Toda a restante sequência nucleotídica faz parte do vector de clonagem pTZ57R/T

Como se pode verificar pela análise de restrição representada na figura 19, todas as colónias de *E. coli* obtidas possuíam o plasmídeo pG0229 recombinante, contendo a região 3’UTR do cDNA da MT2c.



**Figura 19** – Separação electroforética em gel de agarose (0,8% (p/v)) dos resultados das restrições com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* dos DNAs plasmídicos extraídos de colónias de *E. coli* transformadas. M- GeneRuler DNA Ladder Mix (*Fermentas*, Lituânia). A seta assinala a posição da banda relativa ao fragmento clonado.

Devido à falta de tempo para obter *S. nigrum* transgênicas com a expressão de MT2c silenciada, no final do procedimento de transformação de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 foram colocadas a crescer várias das colónias obtidas em meio líquido, tendo as culturas resultantes sido conservadas com glicerol a 10-15%, a -80°C, de modo a poderem ser utilizadas no futuro para conclusão deste procedimento.

## 4. CONCLUSÕES

---

A exposição de *S. nigrum* a concentrações elevadas de Ni provocou vários efeitos deletérios no crescimento e desenvolvimento destas plantas, nomeadamente o aparecimento de sintomas de toxicidade, como a redução do crescimento e clorose foliar.

A exposição prolongada, durante 4 semanas, a uma concentração de 7,5  $\mu\text{M}$  de Ni provocou uma diminuição significativa da biomassa fresca e seca, e da altura da parte aérea das plantas sujeitas ao tratamento, tendo provocado também a diminuição da biomassa e do comprimento das raízes destas. Este nível de Ni não provocou alteração significativa dos níveis de MDA quantificados nas raízes e na parte aérea das plantas tratadas, o que sugere que não terá ocorrido stress oxidativo pela exposição das plantas a este metal pesado. Tal é corroborado por não se terem verificado alterações significativas nos níveis de clorofilas e carotenóides. Verificou-se um aumento significativo do nível de prolina livre existente na parte aérea das plantas tratadas, o que poderá ser uma resposta das plantas à acumulação deste metal nestes tecidos, prevenindo o dano oxidativo.

O tratamento de choque durante 1 semana com uma concentração de 100  $\mu\text{M}$  de Ni conduziu também ao aparecimento de sintomas relacionados com a toxicidade deste metal pesado nas plantas, nomeadamente uma diminuição do crescimento destas e um aparecimento de clorose foliar. À imagem do sucedido na situação de tratamento prolongado, a exposição a este nível de Ni provocou uma diminuição significativa da biomassa fresca e seca, e da altura da parte aérea das plantas, mas provocou apenas a diminuição da biomassa das raízes, não tendo conduzido ao decréscimo do comprimento destas. Esta concentração de Ni levou ao aumento dos níveis de MDA presentes nas raízes das plantas, indicação de stress oxidativo nestes tecidos, acompanhado pelo aumento dos níveis de prolina livre existentes nas raízes, o que poderá ser um dos mecanismos que estas plantas desenvolveram para se protegerem dos danos oxidativos provocados por este tipo de stress. No caso da parte aérea das plantas não se verificaram alterações significativas nestes dois parâmetros, o que, conjuntamente com a ausência de alterações nos níveis de clorofilas e carotenóides, sugere que não terá ocorrido dano oxidativo nos tecidos fotossintéticos destas plantas.



Estes dados em conjunto apontam para a tolerância de *S. nigrum* a níveis elevados de Ni, uma vez que estas plantas sobrevivem a uma concentração elevada deste metal pesado, situação esta apoiada pela constatação da acumulação do metal nos tecidos das plantas sujeitas a ambos os tratamentos, maioritariamente a nível radicular, embora o nível de metal acumulado não permita considerar esta espécie como uma hiperacumuladora de níquel.

No caso do Cr (III), no final da exposição das plantas aos tratamentos prolongado com 375  $\mu\text{M}$  e de choque com 1000  $\mu\text{M}$ , estas não apresentavam qualquer sintoma visível de toxicidade, não se verificando qualquer diferença biométrica que permitisse a distinção das plantas tratadas com o metal pesado das plantas provenientes da situação controlo, apontando para uma tolerância desta espécie a altas concentrações de Cr (III).

Verificou-se também um aumento dos níveis de MDA quantificados nas raízes das plantas sujeitas a ambos os tratamentos, não se tendo verificado qualquer alteração na parte aérea das mesmas, o que indica que estes níveis de Cr (III) terão apenas provocado stress oxidativo nas raízes das plantas. Este dado é apoiado pelo facto de não se terem registado alterações significativas nos níveis de clorofilas e carotenóides. Apesar de se ter verificado um aumento do nível de peroxidação lipídica nas raízes das plantas sujeitas a ambos os tratamentos, apenas foi observada uma acumulação significativa de prolina livre nas raízes das plantas do tratamento de choque, sugerindo que as plantas sujeitas ao tratamento prolongado terão utilizado outros mecanismos de defesa antioxidante. No caso das partes aéreas das plantas provenientes de ambos os tratamentos, observou-se um aumento dos níveis de prolina livre, o que poderá estar relacionado, à imagem do descrito para o Ni, com a resposta das plantas à acumulação *per se* do metal pesado.

O conjunto destes dados apontam para a tolerância de *S. nigrum* a níveis elevados de Cr (III), tendo-se verificado também uma acumulação deste metal pesado nas plantas tratadas, maioritariamente nas raízes, tendo o nível de Cr (III) acumulado aumentado na situação de tratamento de choque, relativamente ao observado nas raízes das plantas do tratamento prolongado. Apesar desta capacidade de acumular Cr (III), o nível de metal acumulado, à semelhança do ocorrido com o Ni, não permite considerar esta espécie uma hiperacumuladora de crómio (III). Estes dados permitem concluir que *S. nigrum* não hiperacumula Ni nem Cr (III), embora possa ser utilizada em processos de fitorremediação, nomeadamente na fitoestabilização destes metais, impedindo a sua

lixiviação dos solos contaminados, já que esta espécie consegue tolerar níveis elevados destes dois metais.

Os ensaios exploratórios efectuados com Cr (VI) permitiram verificar a diferença de toxicidade entre esta forma e a forma trivalente, uma vez que as plantas expostas aos tratamentos com Cr (VI) não sobreviveram ao stress provocado por este metal pesado, indicativo de que estas plantas não conseguem suportar um nível elevado de Cr (VI).

Observou-se que a acumulação dos transcritos das MT2a é induzida pelo Ni nas partes aéreas e nas raízes, e pelo Cr (III) apenas nas raízes das plantas tratadas com estes metais. O facto de se ter verificado uma acumulação dos transcritos das MTs deste grupo nas plantas controlo sugere que estas poderão estar envolvidas nos processos normais de metabolismo destes metais, apontando para a participação das MT2a num processo de defesa não específico de um determinado metal.

No caso das MT2b, não foi observada qualquer acumulação dos seus transcritos em nenhum dos tecidos das plantas controlo e das tratadas com ambos os metais.

No que diz respeito às MT2c, verificou-se uma acumulação dos seus transcritos apenas na parte aérea das plantas expostas ao Ni, sugerindo um papel específico deste grupo de MTs na homeostasia do Ni, uma vez que o Cr (III) não induziu qualquer acumulação.

O padrão de acumulação dos transcritos das MT2d é semelhante ao observado para as MT2a, uma vez que esta acumulação é induzida quer pelo Ni, quer pelo Cr (III), havendo também acumulação destes transcritos nos tecidos das plantas controlo. Este dado parece indicar que estas MTs estão envolvidas no metabolismo e homeostasia dos metais nas plantas, assim como num processo primário de defesa a elevadas quantidades de metais pesados, de um modo inespecífico relativamente a um determinado metal.

No caso das MTs do tipo 3, cuja acumulação de transcritos foi descrita como sendo confinada aos frutos maduros, órgão este que não se havia ainda desenvolvido aquando dos ensaios efectuados, surpreendentemente observou-se uma acumulação destes transcritos das MT3 na parte aérea das plantas expostas a Ni, principalmente nas plantas provenientes do tratamento de choque, indicando o envolvimento destas MTs na tolerância de um nível elevado de Ni, contribuindo para a tolerância da planta a este metal pesado.

Estes novos dados são muito importantes para o esclarecimento do papel dos vários tipos de MTs na homeostasia dos metais, e espera-se que contribuam para clarificar a informação científica disponível no que diz respeito a este tema.

À semelhança do Ni, o Cr (III) induziu uma maior acumulação de mRNAs das MT2a e MT2d, não se verificando uma indução específica de nenhum dos outros tipos de MTs estudados, sugerindo que a tolerância destas plantas a concentrações muito elevadas de Cr (III) poderá estar também relacionada com outro grupo de MTs, nomeadamente as MT1, descritas como específicas da zona radicular, onde se verificou uma predominância da acumulação deste metal pesado nas plantas estudadas, podendo haver ainda participação de outros agentes quelantes, como os ácidos orgânicos e as fitoquelatinas.

Este trabalho permite, pois, apoiar a hipótese da existência uma especificidade no papel de determinadas metalotioninas, neste caso das MT2c e das MT3, na tolerância e homeostasia do Ni e, possivelmente, de outros metais com propriedades químicas semelhantes.

Como a acumulação de mRNAs da MT2c foi induzida especificamente pelo Ni na parte aérea das plantas, iniciaram-se os procedimentos com vista a obter plantas transgênicas com a expressão desta MT silenciada, de modo a verificar a contribuição desta proteína na homeostasia do Ni. Para isso foi elaborada uma construção génica contendo a região 3'UTR desta MT clonada no sentido inverso sob o controlo de um promotor constitutivo, tendo sido obtidas colónias de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 contendo a construção de interesse, as quais foram perpetuadas, e serão utilizadas, no futuro, para concluir este procedimento.

## **Perspectivas futuras**

Apesar da importância crescente que a fitorremediação tem vindo a adquirir nos últimos anos, há ainda uma grande lacuna no conhecimento dos processos fisiológicos inerentes a esta tecnologia, nomeadamente no que diz respeito ao papel das metalotioninas, que, como se constatou no presente trabalho, poderão ser determinantes na homeostasia de alguns metais pesados que contaminam o ambiente. Assim, o conhecimento das funções com que cada grupo de MTs contribui para a tolerância das plantas a um dado metal é fundamental para se desenvolverem técnicas de engenharia genética com vista a maximizar a sua eficiência de utilização para limpeza ambiental.

No que diz respeito ao presente trabalho, a continuação futura destes estudos poderá passar, numa primeira abordagem, pela conclusão dos ensaios com a forma hexavalente do crómio, de modo a ser possível comparar os efeitos nefastos provocados pelo Cr (III) e Cr (VI) e determinar qual o nível máximo desta forma metálica que *S. nigrum* conseguirá tolerar. Outra das tarefas a concluir será a obtenção de *S. nigrum* transgénicas com o gene que codifica as MT2c silenciado, de modo a ser possível determinar até que ponto esta falta de função influencia a tolerância ao Ni.

Outras futuras abordagens poderão passar pelo estudo das MTs do tipo 1, descritas como específicas da zona radicular, onde os metais estudados se acumularam em maior quantidade, a fim de se tentar verificar o envolvimento deste grupo de MTs na homeostasia do Ni e do Cr. Também será interessante realizar um estudo semelhante com outros metais, nomeadamente um micronutriente como o ferro ou o cobre, e verificar o envolvimento das MTs na homeostasia destes metais.

Esta é, pois, uma excelente área de investigação onde muito há ainda para explorar, com inúmeros caminhos de investigação possíveis, a fim de se poder potenciar o uso eficiente da fitorremediação na limpeza de locais contaminados com este tipo de poluentes, um dos principais problemas ambientais a nível global.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- [1] **Akinci, I. E.; Akinci, S.** (2010) Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.) *African Journal of Biotechnology* 9: 4589-4594
- [2] **Aprill, W.; Sims, R. C.** (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265
- [3] **Baker, A. J. M.; McGrath, S. P.; Reeves, R. D.; Smith, J. A. C.** (2000) Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal polluted soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*: 85–108
- [4] **Bañuelos, G. S.** (2000) Factors influencing field phytoremediation of selenium-laden soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*: 41–61
- [5] **Bañuelos, G. S.; Meek, D. W.** (1990) Accumulation of selenium in plants grown on selenium-treated soil. *Journal of Environmental Quality* 19: 772–777
- [6] **Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D.** (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207
- [7] **Binz, P. A.; Kägi, J. H. R.** (2001) Metallothionein. <http://www.unizh.ch/~mtpage/MT.html>
- [8] **Bjerrum, N.**, ed (1936) Bjerrum's Inorganic Chemistry, Ed 3rd. Heinemann, London
- [9] **Blaylock, M. J.; Huang, J. W.** (2000) Phytoextraction of metals. *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*: 53–70
- [10] **Burken, J. G.** (2003) Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 59–84
- [11] **Burken, J. G.; Schnoor, J. L.** (1997) Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science & Technology* 31: 1399–1406
- [12] **Butt, A.; Mousley, C.; Morris, K.; Beynon, J.; Can, C.** (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* 16: 209–221

- [13] **Callahan, D. L.; Baker, A. J. M.; Kolev, S. D.; Wedd, A. G.** (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11: 2-12
- [14] **Cervantes, C.; Campos-García, J.; Devars, S.; Gutiérrez-Corona, F.; Loza-Tavera, H.; Torres-Guzmán, J. C.; Moreno-Sánchez, R.** (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 335-347
- [15] **Chen, C.; Huang, D.; Liu, J.** (2009) Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean* 37: 304-313
- [16] **Cherian, G. M.; Chan, H. M.** (1993) Biological functions of metallothioneins—a review. 87–109
- [17] **Clendennen, S. K.; May, G. D.** (1997) Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiology* 115: 463–469
- [18] **Cobbett, C.; Goldsbrough, P. B.** (2002) Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182
- [19] **Colangelo, E. P.; Guerinot, M. L.** (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 322-330
- [20] **Coupe, S. A.; Taylor, J. E.; Roberts, J. A.** (1995) Characterisation of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra* L. leaflets. *Planta* 97: 442–447
- [21] **del Sal, G.; Manfioletti, G.; Schneider, C.** (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Research* 16: 9878
- [22] **Dushenkov, S.** (2003) Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant Soil* 249: 167–175
- [23] **Dushenkov, S.; Kapulnik, Y.** (2000) Phytoremediation of metals. *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*: 89–106
- [24] **Eapen, S.; D'Souza, S. F.** (2005) Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances* 25: 97-114
- [25] **Edmonds, J. M.; Chweya, J. A., eds** (1997) Black nightshades. *Solanum nigrum* L. and related species. International Plant Genetic Resources Institute, Roma
- [26] **Ermler, U., et al** (1998) Active sites of transition-metal enzymes with a focus on nickel. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 749-758

- [27] **Ferrat, L.; Pergent-Martini, C.; Roméo, M.** (2003) Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 65: 187-204
- [28] **Ferro, A.; Chard, J.; Kjelgren, R.; Chard, B.; Turner, D.; Montague, T.** (2001) Groundwater capture using hybrid poplar trees: evaluation of a system in Ogden, Utah. *International Journal of Phytoremediation* 3: 87–104
- [29] **Ferro, A. M.; Rock, S. A.; Kennedy, J.; Herrick, J. J.; Turner, D. L.** (1999) Phytoremediation of soils contaminated with wood preservatives: greenhouse and field evaluations. *International Journal of Phytoremediation* 1: 289–306
- [30] **Freisinger, E.** (2008) Plant MTs – long neglected members of the metallothionein superfamily. *Dalton Transactions*: 6663-6675
- [31] **Gajewska, E.; Sklodowska, M.; Slaba, M.; Mazur, J.** (2006) Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots *Biologia Plantarum* 50: 653-659
- [32] **Garcia-Hernandez, M.; Murphy, A.; Taiz, L.** (1998) Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in Arabidopsis. *Plant Physiology* 118: 387–397
- [33] **Giritch, A.; Ganai, M.; Stephan, U. W.; Baumlein, H.** (1998) Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Molecular Biology* 37: 701–714
- [34] **Glass, D. J.** (1999) U.S. and International Markets for Phytoremediation, 1999–2000. In. Needham, MA: D. Glass Assoc.
- [35] **Hamer, D. H.; Thiele, D. J.; Lemontt, J. E.** (1985) Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228: 685-690
- [36] **Hansen, D.; Duda, P. J.; Zayed, A.; Terry, N.** (1998) Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environmental Science & Technology* 32: 591–597
- [37] **Harms, H.; Bokern, M.; Kolb, M.; Bock, C.** (2003) Transformation of organic contaminants by different plant systems. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 285–316
- [38] **Heath, R. L.; Packer, L.** (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198



- [39] **Horne, A. J.** (2000) Phytoremediation by constructed wetlands. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*: 13–40
- [40] **Hsieh, H. M.; Liu, W. K.; Huang, P. C.** (1995) A novel stress-inducible metallothionein like gene from rice. *Plant Molecular Biology* 28: 381–389
- [41] **Hudspeth, R. L.; Hobbs, S. L.; Anderson, D. M.; Rajasekaran, K.; Grula, J. W.** (1996) Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton. *Plant Molecular Biology* 31: 701–705
- [42] **Hutchinson, S. L.; Schwab, A. P.; Banks, M. K.** (2003) Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the rhizosphere. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 355–386
- [43] **Jeffers, P. M.; Liddy, C. D.** (2003) Treatment of atmospheric halogenated hydrocarbons by plants and fungi. *Transformation and Control of Contaminants*: 787–804
- [44] **Katz, S. A.; Salem, H.,** eds (1994) The biological and environmental chemistry of chromium. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- [45] **Khalid, B. Y.; Tinsley, J.** (1980) Some effects of nickel toxicity on rye grass. *Plant and Soil* 55: 139-144
- [46] **Kleiman, I. D.; Cogliatti, D. H.** (1997) Uptake of chromate in sulfate deprived wheat plants. *Environmental Pollution* 1–2: 131–135
- [47] **Krämer, U.** (2010) Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 517-534
- [48] **Lane, B. G.; Kajioka, R.; Kennedy, T. D.** (1987) The wheat germ Ec protein is a zinc containing metallothionein. *Molecular and Cellular Biology* 65: 1001–1005
- [49] **Lasat, M. M.** (2002) Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109–120
- [50] **Ledger, S. E.; Gardner, R. C.** (1994) Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*). *Plant Molecular Biology* 25: 877–886
- [51] **Lichtenthaler, H. K.** (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382
- [52] **Lin, Y.; Kao, C.** (2005) Nickel Toxicity of Rice Seedlings: Cell Wall Peroxidase, Lignin, and NiSO<sub>4</sub>-inhibited Root Growth. *Crop, Environment & Bioinformatics* 2: 131-136

- [53] **Lin, Y. C.; Kao, C. H.** (2007) Proline accumulation induced by excess nickel in detached rice leaves. *Biologia Plantarum* 51: 351-354
- [54] **Lin, Z.-Q.; Schemenauer, R. S.; Cervinka, V.; Zayed, A.; Lee, A.; Terry, N.** (2000) Selenium volatilization from a soil-plant system for the remediation of contaminated water and soil in the San Joaquin Valley. *Journal of Environmental Quality* 29: 1048–1056
- [55] **Liu, J. Y.; Lu, T.; Zhao, N. M.** (2000) Classification and nomenclature of plant metallothionein-like proteins based on their cysteine arrangement patterns. *Acta Botanica Sinica* 42: 649–652
- [56] **Lytle, C. M.; Lytle, F. W.; Yang, N.; Qian, J. H.; Hansen, D.; Zayed, A.; Terry, N.** (1998) Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: potential for in situ heavy metal detoxification. *Environmental Science & Technology* 32: 3087–3093
- [57] **Ma, L. Q.; Komar, K. M.; Tu, C.** (2001) A fern that accumulates arsenic. *Nature* 409: 579
- [58] **McCutcheon, S. C.; Schnoor, J. L.** (2003) Overview of phytotransformation and control of wastes. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 3–58
- [59] **McGrath, S. P.; Smith, S.** (1990) Chromium and nickel. *Heavy Metals in Soils*: 125-150
- [60] **Mehta, S. K.; Gaur, J. P.** (1999) Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist* 143: 253-259
- [61] **Morikawa, H.; Takahashi, M.; Kawamura, Y.** (2003) Metabolism and genetics of atmospheric nitrogen dioxide control using pollutant-philic plants. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 765–786
- [62] **Negri, M. C.; Gatliff, E. G.; Quinn, J. J.; Hinchman, R. R.** (2003) Root development and rooting at depths. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 233–262
- [63] **Negri, M. C.; Hinchman, R. R.** (2000) The use of plants for the treatment of radionuclides. *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*: 107–132
- [64] **Neumann, P. M.; Chamel, A.** (1986) Comparative phloem mobility of nickel in nonsenescent plants. *Plant Physiology* 81: 689-691

- [65] **Newman, L. A. e. a.** (1997) Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars. *Environmental Science & Technology* 31: 1062–1067
- [66] **Nieminen, T. M.; Ukonmaanaho, L.; Rausch, N.; Shoty, W.** (2007) Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Metal Ions in Life Sciences* 2: 1-30
- [67] **Olson, P. E.; Reardon, K. F.; Pilon-Smits, E.** (2003) Ecology of rhizosphere bioremediation. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants:* 317–354
- [68] **Panda, S. K.; Choudhury, S.** (2005) Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 95-102
- [69] **Pandey, N.; Sharma, C. P.** (2003) Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environmental and Experimental Botany* 49: 195-200
- [70] **Pernía, B.; Sousa, A.; Reyes, R.; Castrillo, M.** (2008) Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia* 33: 112-119
- [71] **Pilon-Smits, E.** (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39
- [72] **Rabie, M. H.; Abdel-Latif, E. A.; Asy, K. G.; Eleiwa, M. E.** (1992) The Effect of Nickel on Plants. III. The Effect of Foliar Nickel on Yield and Elemental Content of Some Crops. *Journal of King Abdulaziz University: Science* 4
- [73] **Rai, V.; Vajpayee, P.; Singh, S.; Mehrotra, S.** (2004) Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science* 167: 1159-1169
- [74] **Ramírez-Díaz, M. I.; Díaz-Pérez, C.; Vargas, E.; Riveros-Rosas, H.; Campos-García, J.; Cervantes, C.** (2008) Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21: 321-332
- [75] **Raskin, I., Ensley, B. D** ed (2000) Phytoremediation of toxic metals using plants to clean the environment. New York: John Wiley & Sons
- [76] **Rauser, W. E.** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31: 19–48
- [77] **Reeves, R. D.** (1992) *Hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In vegetative of ultramafic (serpentine) soils.* . Intercept Limited, U.K.

- [78] **Reeves, R. D.; Baker, A. J. H.** (2000) Metal accumulating plants. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*: 193–229
- [79] **Reid, S. J.; Ross, G. S.** (1997) Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiologia Plantarum* 100: 183–189
- [80] **Robinson, N. J.; Tommey, A. M.; Kuske, C.; Jackson, P. J.** (1993) Plant metallothioneins. *Biochemical Journal* 295: 1–10
- [81] **Rock, S. A.** (2003) Field evaluations of phytotechnologies. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*: 905–924
- [82] **Rugh, C. L.; Wilde, H. D.; Stack, N. M.; Thompson, D. M.; Summers, A. O.; Meagher, R. B.** (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 93: 3182–3187
- [83] **Salgado, P. E. T.** (1996) Toxicologia dos metais. *Fundamentos de Toxicologia*: 154-172
- [84] **Salt, D. E.; Kramer, U.; Smith, R. D.; Raskin, I.** (2000) The role of root exsudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Phytoremediation of contaminated soil and water*: 189-200
- [85] **Salt, D. E.; Prince, R. C.; Pickering, I. J.; Raskin, I.** (1995) Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiology* 109: 1427–1433
- [86] **Salt, D. E.; Smith, R. D.; Raskin, I.** (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 643–668
- [87] **Salt, D. E. e. a.** (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468–474
- [88] **Sambrook, J.; Russel, D.** (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- [89] **Schiavon, M.; Pilon-Smits, E.; Wirtz, M.; Hell, R.; Malagoli, M.** (2008) Interactions between Chromium and Sulfur Metabolism in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Quality* 37: 1536-1545

- [90] **Schnoor, J. L.; Licht L. A; McCutcheon, S. C.; Wolfe, N. L.; Carreira, L. H.** (1995) Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology* 29: 318A–323A
- [91] **Seregin, I. V.; Kozhevnikova, A. D.** (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 257-277
- [92] **Shanker, A. K.; Cervantes, C.; Loza-Tavera, H.; Avudainayagam, S.** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* 31: 739–753
- [93] **Snowden, K. C.; Richards, K. D.; Gardner, T. C.** (1995) Aluminum-induced genes—induction by toxic metals, low calcium and wounding and pattern of expression in root tips. *Plant Physiology* 107: 341–348
- [94] **Sun, R.; Zhou, Q.; Sun, F.; Jin, C.** (2007) Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd- hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany* 60: 468-476
- [95] **Sunderman, F. W.; Oskarsson, A.**, eds (1991) Metals and Their Compounds in the Environment, 1101 – 1126
- [96] **Taiz, L.; Zeiger, E.** (2006) *Plant Physiology*, Ed 4th. Sinauer Associates, Inc.USA
- [97] **Teixeira, J.; Pereira, S.; Canovas, F.; Salema, R.** (2005) Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *Journal of Experimental Botany* 56: 663-671
- [98] **Terry, N.; Bañuelos, G. S.**, eds (1999) Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis, Boca Raton, FL
- [99] **Van Aken, B.** (2008) Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology* 26 (5): 225-227
- [100] **White, C. N.; Rivin, C. J.** (1995) Characterization and expression of a cDNA encoding a seed-specific metallothionein in maize. *Plant Physiology* 108: 831–832
- [101] **Winter-Sydnor, M. E.; Redente, E. F.** (2002) Reclamation of high-elevation, acidic mine waste with organic amendments and topsoil. *Journal of Environmental Quality* 31: 1528–1537

- [102] **Yu, X.; Gu, J.; Xing, L.** (2008) Differences in uptake and translocation of hexavalent and trivalent chromium by two species of willows. *Ecotoxicology* 17: 747-755
- [103] **Zhou, J.; Goldsbrough, P. B.** (1994) Functional homologs of animal and fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *Plant Cell* 6: 875–884



## ANEXOS

---

### Anexo I – Composição de soluções utilizadas

#### - Tampão TAE 10x

- Tris-base 400 mM
- Acetato de sódio 200 mM
- EDTA (pH=8,0) 20 mM

Para preparar as soluções de trabalho a 1x e a 0,25x faz-se a diluição apropriada em água destilada.

#### - Tampão STET

- Sacarose 8% (p/v)
- Triton X-100 0,1%
- EDTA 50 mM
- Tris-HCl (pH=8,0) 50 mM

Esterilizar a solução por filtração.



## Anexo II – Sequências dos *primers* utilizados

### 1- Primers utilizados para discriminar os diversos grupos de MTs e respectivas temperaturas específicas de emparelhamento (TM)

MT2b Fwd → 5' - GGGATCCGATTATGTCTTG - 3' (TM = 46°C)

MT2b Rev → 5' - ATTACCAGAAGCAGAGATGC - 3'

MT2c Fwd → 5' - GATGTGGGATGTACCCTGAC - 3' (TM = 49°C)

MT2c Rev → 5' - GTTACAAGCCCATGTCAACTTC - 3'

MT3c Fwd → 5' - GTCGGACAAGTGTAGTAGTTG - 3' (TM = 44°C)

MT3c Rev → 5' - AGACCAAAGAGACAGACTAGAG - 3'

MT2ab Fwd → 5' - GCTGTGGAGGATGCAAGAT - 3' (TM = 50°C)

MT2ab Rev → 5' - CTTAGAGCAAGTGCAAGGGTTAC - 3'

MT2cd Fwd → 5' - GATGTGGGATGTACCCTGAC - 3' (TM = 49°C)

MT2cd Rev → 5' - GCAGTTTGATCCACATTTGC - 3'

MT3 Fwd → 5' - TGCTGATGTCAGCCAATG - 3' (TM = 48°C)

MT3 Rev → adaptador R9

### 2- Primers utilizados para amplificar a região 3'UTR das MT2c e respectiva temperatura específica de emparelhamento (TM)

MT2c 3'UTR Fwd → 5' - CAGAGATCGAAGAAAATAGTGTGTG - 3'

MT2c 3'UTR Rev → 5' - AAGCAGAGATGCTCGTGTTAC - 3'

TM = 45°C

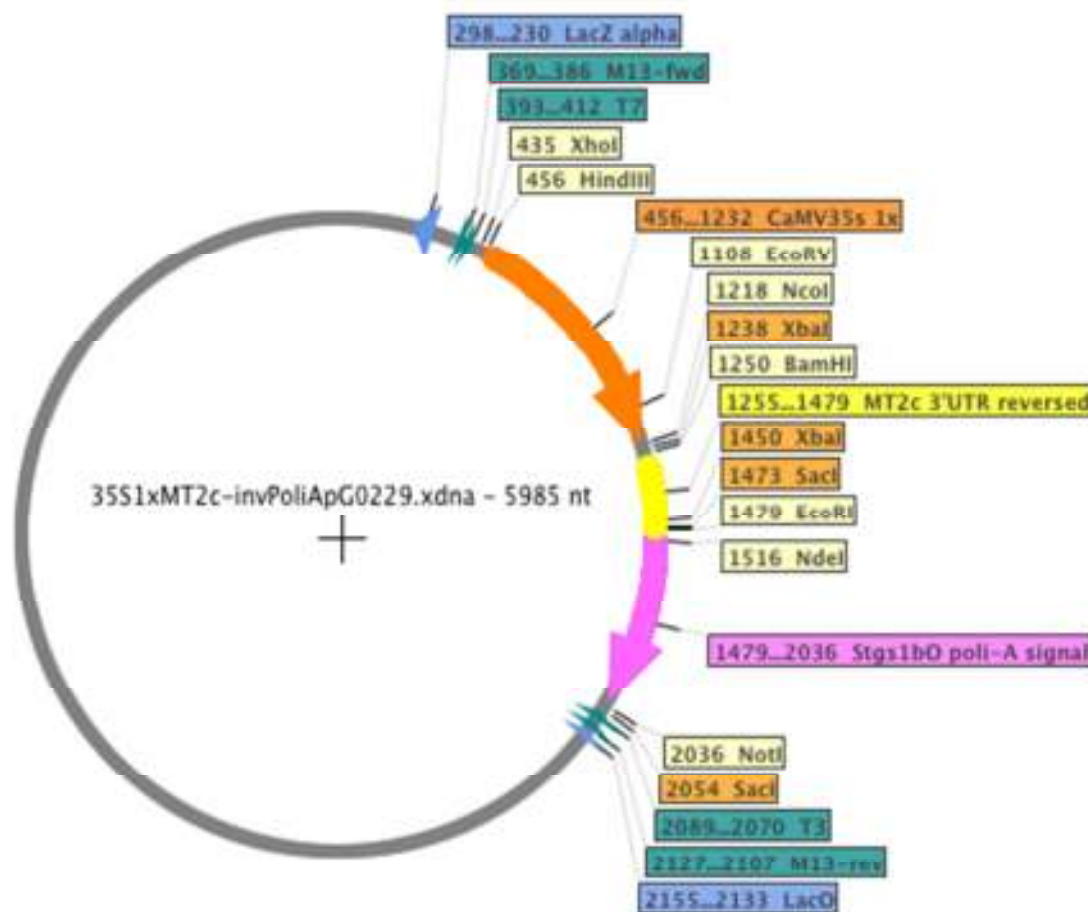
### 3- Adaptador R9

R9 → 5' - CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC - 3'

### 4- Primer M13 rev (-29)

M13 ver (-29) → 5' - CAGGAAACAGCTATGACC - 3'

### Anexo III – Mapa do plasmídio pG0229 final para o silenciamento da expressão do gene que codifica a MT2c



**Figura 20** – Mapa do plasmídio pG0229 final obtido para futuro silenciamento do gene que codifica a MT2c. A seta laranja representa o promotor constitutivo 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV), a linha amarela representa a sequência 3'UTR da MT2c clonada no sentido inverso e a seta rosa corresponde ao fragmento de DNA correspondente ao sinal de poliadenilação do cDNA que codifica a isoenzima citosólica da glutamina sintetase de *Solanum tuberosum* L. (Stgs1b) [97].

