



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

**WALDEMAR VIANA DE ANDRADE JÚNIOR**

**MECANISMO DE TOLERÂNCIA EM PLANTAS JOVENS DE UCUÚBA (*Viola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb) EXPOSTAS AO CÁDMIO E POTENCIAL PARA FITOESTABILIZAÇÃO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, NUTRICIONAL E DE CRESCIMENTO**

**BELÉM**

**2019**

**WALDEMAR VIANA DE ANDRADE JÚNIOR**

**MECANISMO DE TOLERÂNCIA EM PLANTAS JOVENS DE UCUÚBA (*Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb) EXPOSTAS AO CÁDMIO E POTENCIAL PARA FITOESTABILIZAÇÃO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, NUTRICIONAL E DE CRESCIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Ciências Florestais: área de concentração Ecologia e Ecofisiologia de Árvores, para obtenção do título de **Doutor**.

Orientador: Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto.

Co-Orientadores: Benedito Gomes dos Santos Filhos

Ricardo Shigueru Okumura

**BELÉM**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia  
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A553m Andrade Junior, Waldemar Viana de

Mecanismo de tolerância em plantas jovens de Ucuúba (*Viola surinamensis* (rol. Ex rottb.) warb) expostas ao cádmio e potencial para fitoestabilização: respostas fisiológicas, bioquímicas, nutricional e de crescimento / Waldemar Viana de Andrade Junior. - 2019.  
107 f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais (PPGCF), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto

Coorientação: Prof. Dr. Benedito Gomes dos Santos Filho e Prof. Dr. Ricardo Shigueru Okumura.

1. Myristicaceae. 2. Metais pesados. 3. Fotossíntese. 4. Fator de Bioconcentração. 5. Prolina. I. Oliveira Neto, Cândido Ferreira de

---

CDD: 583.22

WALDEMAR VIANA DE ANDRADE JÚNIOR

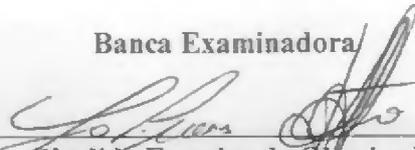
**MECANISMO DE TOLERÂNCIA EM PLANTAS JOVENS DE UCUÚBA (*Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb) EXPOSTAS AO CÁDMIO E POTENCIAL PARA FITOESTABILIZAÇÃO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS, NUTRICIONAL E DE CRESCIMENTO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Ciências Florestais: área de concentração Ecologia e Ecofisiologia de Árvores, para obtenção do título de Doutor.

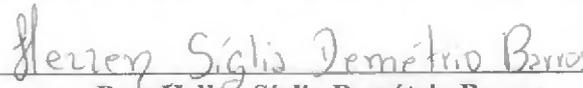
07/06/2019

Data da Aprovação

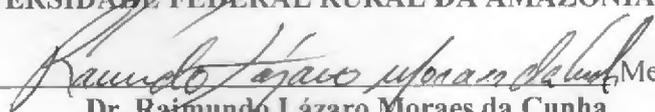
Banca Examinadora

 Orientador  
Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA

 Membro 1  
Dra. Cristine Bastos do Amarante  
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI - MPEG

 Membro 2  
Dra. Hellen Sígla Demétrio Barros  
Sem Vínculo Institucional

 Membro 3  
Dr. Marcel do Nascimento Botelho  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

 Membro 4  
Dr. Raimundo Lázaro Moraes da Cunha  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

Dedico aos meus pais, Waldemar Viana de Andrade (In memoriam) e Celecina Viana de Andrade, a minha querida esposa Ana Cleide da Costa Silva Andrade, as minhas lindas filhas, Cleidiane da Silva Andrade e Waldeane da Silva Andrade e a minha neta, Sofia Andrade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tudo o que tem me proporcionado.

À Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) pela oportunidade de realização do estudo.

À Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Sustentabilidade (SEMAS/PA) e a Secretaria de Estado de Educação (SEDUC/PA) pela liberação para estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e apoio a pesquisa.

Agradeço especialmente aos meus pais, Waldemar Viana de Andrade (In memoriam) e Celecina Viana de Andrade, por terem me proporcionado o caminho do saber.

A minha esposa Ana Cleide da Costa Silva Andrade, pela paciência, dedicação, compreensão, companheirismo, confiança, oração, incentivo e apoio irrestrito em todos os momentos.

As minhas filhas, Cleidiane da Silva Andrade e Waldeane da Silva Andrade meus eternos amores, pela compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu sobrinho, Waldemar Henrique, pela assistência nas correções gramaticais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cândido Neto, pelo acolhimento, críticas, orientações e valiosas sugestões desde a elaboração do projeto.

A Dra. Cristine Amarante do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pelo apoio e ajuda nas análises do Cádmiio e de macro e micronutrientes.

Ao Dr. Ricardo Okumura pela revisão dos artigos, críticas e sugestões.

Ao Dr. Eniel Cruz da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela doação das sementes, ajuda e orientações durante a germinação.

Aos colegas do grupo de Estudo da Biodiversidade em Plantas Superiores da Amazônia (EBPS), especialmente, a Jéssica Suellen e Diana Jhulia pela ajuda e apoio do início ao fim do experimento.

À Coordenação, professores, secretária e colegas do Curso de Doutorado em Ciências Florestais.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com críticas e sugestões construtivas para a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Virola surinamensis* (Ucuúba) é uma árvore Neotropical que ocorre naturalmente nos solos inundáveis das florestas de várzea, igapó e nos estuários. O Cádmiio (Cd) é um dos metais pesados mais tóxicos e persistentes no ambiente, podendo ser incorporado e bioacumulado nos componentes da cadeia alimentar. O objetivo do estudo foi avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas, o crescimento vegetativo, a distribuição de nutrientes, a capacidade de fitoextração e a tolerância de plantas jovens de *V. surinamensis* submetidas a cinco concentrações de Cd (0, 15, 30, 45 e 60 mg L<sup>-1</sup>) por 60 dias. Foram avaliados o potencial hídrico de antemanhã ( $\Psi_{am}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ), a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ), a concentração de CO<sub>2</sub> intercelular ( $C_i$ ), a relação da fotossíntese líquida e concentração de CO<sub>2</sub> intercelular ( $A/C_i$ ), a eficiência instantânea de uso da água ( $EUA$ ), o teor de clorofila total ( $Chl$ ), a máxima eficiência fotoquímica do PSII ( $F_v/F_m$ ), o coeficiente de extinção fotoquímica ( $qP$ ), o coeficiente de extinção não-fotoquímico ( $NPQ$ ), a taxa de transporte de elétrons ( $ETR$ ), o fator de bioconcentração ( $FBC$ ), o fator de translocação ( $FT$ ), o índice de tolerância ( $IT$ ), a concentração de nitrato, nitrato redutase ( $NR$ ), amônia livre, aminoácidos solúveis totais ( $AST$ ), as proteínas solúveis totais ( $PST$ ), amido, prolina, sacarose e carboidratos solúveis totais ( $CST$ ), açúcares redutores, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, massa seca da parte aérea ( $MSPA$ ), a massa seca da raiz ( $MSR$ ), a massa seca total ( $MST$ ) e a razão raiz parte aérea ( $R/PA$ ). O  $\Psi_{am}$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $A$ ,  $A/C_i$  e  $EUA$  foram menores que o controle, mas a  $Chl$  aumentou na dose de 15 e 30 mg L<sup>-1</sup> e o  $C_i$  foi maior que o controle.  $F_v/F_m$ ,  $qP$  e  $ETR$  reduziram nas plantas com Cd, mas a  $NPQ$  aumentou. As concentrações de Cd aumentaram em diferentes tecidos vegetais (raiz > caule > folha). O maior valor de FBC foi na dose de 30 e 45 mg L<sup>-1</sup> Cd e do FT na concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> Cd, enquanto o IT foi mais elevado na dose de 15 mg L<sup>-1</sup> Cd. Em geral, o Cd não afetou a concentração de nitrato na raiz, mas teve um efeito positivo nas folhas. A  $NR$ , a amônia, os  $AST$  e as  $PST$  reduziram nas plantas com Cd.  $CST$ , prolina, sacarose e açúcares redutores aumentaram nas plantas com Cd. O Cd afetou a altura, o diâmetro do caule, o número de folhas e a produção de biomassa, além de influenciar negativamente em Fe, Mg, Ca, N, P e K, especialmente na raiz. O Zn aumentou nas raízes e folhas, enquanto o Mn reduziu na raiz e aumentou nas folhas das plantas com Cd. Todas as plantas sobreviveram até o final do experimento. Os resultados demonstram tolerância e baixa capacidade da planta na fitoextração de Cd, indicando que a *V. surinamensis* pode ser promissora para fitoestabilização de Cd.

**Palavras-chave:** Myristicaceae. Metais pesados. Fotossíntese. Fator de bioconcentração. Tolerância. Prolina.

## ABSTRACT

*Virola surinamensis* (Ucuúba), is a Neotropical tree occurring naturally in the floodplain of the lowland forests, igapó and estuaries. Cadmium (Cd) is one of the most toxic and persistent heavy metals in the environment, and can be incorporated and bioaccumulated into the components of the food chain. The objective of the study was to evaluate the physiological and biochemical responses, vegetative growth, nutrient distribution, phytoextraction capacity and tolerance of young plants of *V. surinamensis* submitted to five concentrations of Cd (0, 15, 30, 45 and 60 mg L<sup>-1</sup>) for 60 days. The predawn water potential ( $\Psi_{am}$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), the liquid assimilation rate of CO<sub>2</sub> ( $A$ ), the concentration of intercellular CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ), the relation of liquid photosynthesis and intercellular CO<sub>2</sub> concentration ( $A/C_i$ ), the instantaneous efficiency of water use ( $EWU$ ), the chlorophyll total content ( $Chl$ ), the maximum photochemical efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ), the photochemical extinction coefficient ( $qP$ ), the non-photochemical extinction coefficient ( $NPQ$ ), electrons transport rate ( $ETR$ ), bioconcentration factor ( $BCF$ ), translocation factor ( $TF$ ), the tolerance index ( $TI$ ), the nitrate concentration, nitrate reductase ( $NR$ ), free ammonium, total soluble aminoacids ( $TSA$ ), total soluble proteins ( $TSP$ ), starch, proline, sucrose and total soluble carbohydrates ( $TSC$ ), reducing sugars, plant height, stem diameter, number of leaves, dry matter of aerial part ( $DMAP$ ), dry matter of root ( $DMR$ ), total dry mass ( $TDM$ ), root aerial part ratio ( $R/AP$ ) were evaluated. The  $\Psi_{am}$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $A$ ,  $A/C_i$  and  $EWU$  were lower than the control, but  $Chl$  increased at the dose of 15 and 30 mg L<sup>-1</sup> and  $C_i$  was higher than the control.  $F_v/F_m$ ,  $qP$ ,  $ETR$  reduced in plants with Cd, but  $NPQ$  increased. Cd concentrations increased in different plant tissues (root > stem > leaf). The highest BCF value was 30 and 45 mg L<sup>-1</sup> Cd and FT at 45 mg L<sup>-1</sup> Cd, whereas IT was higher at 15 mg L<sup>-1</sup> Cd dose. Cd did not affect the nitrate concentration in the root, but had a positive effect on the leaves. The NR, ammonia, TSA and TSP decreased in plants with Cd. TSC, proline, sucrose and reducing sugars increased in plants with Cd. Cd affected height, stem diameter, number of leaves and biomass production. The Cd negatively influenced Fe, Mg, Ca, N, P and K, especially in the root. Zn increased in the roots and leaves, while the Mn reduced in the root and increased in the leaves of the plants with Cd. All the plants survived until the end of the experiment. The results demonstrate tolerance and low plant capacity in the phytoextraction of Cd, indicating that *V. surinamensis* may be promising for Cd phytostabilization.

**Keywords:** Myristicaceae. Heavy metal. Photosynthesis. Bioconcentration factor. Tolerance. Proline.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

**Figura 1** - Os possíveis mecanismos que influenciam a concentração de Cd no solo..... 18

**Figura 2** - Diagrama mostrando a absorção e o transporte de cádmio das raízes para o xilema das plantas através de caminhos apoplásticos e simplásticos.....20

**Figura 3** - Mecanismos de absorção, acumulação e transporte de Cd.....25

### 2 EFFECT OF CADMIUM ON YOUNG PLANTS OF *Virola surinamensis*

**Figure 1** - (A) Predawn water potential ( $\Psi_{pd}$ ), (B) net photosynthetic rate ( $A$ ), (C) stomatal conductance ( $g_s$ ), (D) transpiration ( $E$ ), (E) internal  $CO_2$  concentration ( $C_i$ ) and (F) net photosynthesis to intercellular  $CO_2$  concentration ratio ( $A/C_i$ ) in young plants of *V. surinamensis* exposed to five concentrations of cadmium (0, 15, 30, 45 and 60 mg). Different letters for concentrations of cadmium in solution indicate significant differences in the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SD,  $n = 7$ ..... 46

**Figure 2** - (A) Instantaneous water-use efficiency ( $A/E$ ), (B) total chlorophyll (SPAD index), (C) maximum photochemical efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ), (D) electron transport rate ( $ETR$ ), (E) photochemical quenching coefficient ( $qP$ ), and (F) non-photochemical quenching coefficient ( $NPQ$ ) in young plants of *V. surinamensis* exposed to five concentrations of cadmium (0, 15, 30, 45 and 60 mg). Different letters for concentrations of cadmium in solution indicate significant differences in the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SD,  $n = 7$ ..... 47

**Figure 3** - (A) Cadmium concentration in the roots, (B) cadmium concentration in the stem, (C) cadmium concentration in the leaves, (D) bioconcentration factor, (E) translocation factor and (F) tolerance index in young plants of *V. surinamensis* exposed to five concentrations of cadmium (0, 15, 30, 45 and 60 mg). ND = not detected; DM = dry mass. Different letters for concentrations of cadmium in solution indicate significant differences in the Kruskal–Wallis test ( $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SD,  $n = 7$ ..... 48

### 3 METABOLISMO DO NITROGÊNIO E CARBONO EM PLANTAS JOVENS DE UCUÚBA (*Virola surinamensis*) NA PRESENÇA DO CÁDMIO

**Figura 1** - a: Concentração de nitrato na raiz, b: concentração de nitrato na folha, c: concentração da redutase do nitrato na raiz, d: concentração da redutase do nitrato na folha, e: concentração de amônio na raiz, f: concentração de amônio na folha em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ ..... 66

**Figura 2** - a: Concentração de aminoácidos solúveis totais na raiz, b: concentração de aminoácidos solúveis totais na folha, c: concentração de proteínas solúveis totais na raiz, d: concentração de proteínas solúveis totais na folha, e: concentração de prolina na raiz, f: concentração de prolina na folha em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de

cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....67

**Figura 3** - a: Concentração de carboidratos solúveis totais na raiz, b: concentração de carboidratos solúveis totais na folha, c: concentração de sacarose raiz, d: concentração de sacarose na folha, e: concentração de açúcares redutores na raiz, f: concentração de açúcares redutores na folha em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....68

#### 4 CRESCIMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE NUTRIENTES EM PLANTAS JOVENS DE *Virola surinamensis* EXPOSTAS AO CÁDMIO

**Figura 1** - A: Raízes menores e necrosadas, B: folhas menores e cloróticas em *V. surinamensis* após 60 dias de exposição ao cádmio.....85

**Figura 2** - A: Altura da planta, B: diâmetro do caule e C: número de folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio. Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $P < 0.05$ ) Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....86

**Figura 3** - A: Massa seca da raiz, B: massa seca do caule, C: massa seca da folha, D: massa seca da parte aérea, E: massa seca total, F: razão raiz/parte aérea em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....86

**Figura 4** - A: Concentração de Fe na raiz, B: concentração de Fe nas folhas, C: concentração de Mg na raiz, D: concentração de Mg nas folhas, E: concentração de Ca na raiz, F: concentração de Ca nas folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....87

**Figura 5** - A: Concentração de Zn na raiz, B: concentração de Zn nas folhas, C: concentração de Mn na raiz, D: concentração de Mn nas folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....88

**Figura. 6** - A: Concentração de N na raiz, B: concentração de N nas folhas, C: concentração de P na raiz, D: concentração de P nas folhas, E: concentração de K na raiz, F: concentração de K nas folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .....89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A** - Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>
- APG** - The Angiosperm Phylogeny Group
- APX** - Ascorbato Peroxidase
- ARN** - Atividade da redutase do nitrato
- AsA** - Ácido ascórbico
- ATP** - Adenosina tri-fosfato
- ATPase** -Adenosina tri-fosfato sintase
- CAT** - Catalase
- CdCl<sub>2</sub>** - Cloreto de cádmio
- Chl** - Teor de clorofila total
- C<sub>i</sub>** - Concentração de CO<sub>2</sub> intercelular
- A/C<sub>i</sub>**- Relação entre a fotossíntese líquida e concentração de CO<sub>2</sub> intercelular
- CYS** - Cisteína
- Cyt b6f** - Citocromo b6f
- DC** - Diâmetro do caule
- DCT** - Dose crítica de toxidez
- DHAR** - Dehidroascorbato reductase
- E** - Transpiração
- EBPS** - Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores
- EMBRAPA** - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EROs** - Espécies reativas de oxigênio
- ETR** - Taxa de transporte de elétrons
- EUA (A/E)** - Eficiência instantânea de uso da água
- γ-ECS** - γ-glutamilcisteína sintetase
- F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>** -Eficiência quântica fotoquímica máxima do fotossistema II
- FBA** - Fator de bioacumulação
- FT** - Fator de translocação
- g<sub>s</sub>** - Condutância estomática
- GDH** - Glutamato desidrogenase
- GLN** - Glutamina
- GLU** - Glutamato
- Gly**- Glicina

**GOGAT** - Sintase do glutamato (Glutamina oxoglutarato Aminotransferase)  
**GPOD** - Guiacol peroxidase  
**GPX**- Glutationa peroxidase  
**GR** - Glutationa redutase  
**GS** - Glutamina sintetase  
**GSH** - Glutationa reduzida  
**GSHS** - Glutationa sintase  
**H** - Altura da planta  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio  
**HNO<sub>3</sub>** - Ácido nítrico  
**HClO<sub>4</sub>** - Ácido perclórico  
**IT**- Índice de tolerância  
**MDA** - Malondialdeído  
**MDHAR** - Monodehidroascorbate redutase  
**MPa** - Mega Pascal (1 MPa - 0,1 bar)  
**MPEG** - MuseuParaenseEmílioGoeldi  
**MSF** - Massa seca das folhas e folíolos  
**MSPA** - Massa seca da parte aérea  
**MSR** - Massa seca da raiz  
**MST** - Massa seca total  
**MTs** - Metalotioneínas  
**NiR** - Nitrito redutase  
**NC** - Nível de contaminação de cádmio  
**NF** - Número de folhas  
**NPQ** - Coeficiente de extinção não-fotoquímico  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** - Oxigênio singleto  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ânion superóxido  
**OH<sup>-</sup>** - Radical hidroxila  
**PCD** - Morte celular programada  
**PCs** - Fitoquelatinas  
**PEPCase** - Phosphoenolpyruvate carboxylase  
**Prol** - Prolina  
**PSI** - Fotossistema I  
**PSII** - Fotossistema II

**qP** - Coeficiente de extinção fotoquímica

**QA** - Quinona A

**QB** - Quinona B

**R/PA** - Razão raiz parte aérea

**RubisCo** - Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase

**-SH** - Sulfidril (tiol)

**SOD** - Superóxido Dismutase

**SPAD** - Medidor de clorofila portátil

**UFRA** - Universidade Federal Rural da Amazônia

**$\Psi_{am}$**  - Potencial antemanhã

## SUMÁRIO

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Objetivos</b> .....	16
1.1.1 Objetivo geral .....	16
1.1.2 Objetivos específicos .....	16
<b>1.2 Revisão de literatura</b> .....	17
1.2.1 Fontes de contaminação de cádmio .....	17
1.2.2 Biodisponibilidade, absorção, transporte e acumulação de cádmio nas plantas .....	18
1.2.3 Toxicidade do cádmio em planta .....	21
1.2.4 Tolerância das plantas ao cádmio .....	24
1.2.5 Descrição e importância de ( <i>Virola surinamensis</i> (Rol. ex Rottb.) Warb) .....	28
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
<b>2 EFFECT OF CADMIUM ON YOUNG PLANTS OF <i>Virola surinamensis</i></b> .....	39
<b>ABSTRACT</b> .....	39
<b>2.1 Introduction</b> .....	40
<b>2.2 Methods</b> .....	41
<b>2.3 Results</b> .....	45
<b>2.4 Discussion</b> .....	49
<b>2.5 Conclusion</b> .....	52
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	53
<b>LITERATURE CITED</b> .....	53
<b>3 METABOLISMO DO NITROGÊNIO E CARBONO EM PLANTAS JOVENS DE UCUÚBA (<i>Virola surinamensis</i>) NA PRESENÇA DO CÁDMIO</b> .....	60
<b>RESUMO</b> .....	60
<b>ABSTRACT</b> .....	61
<b>3.1 Introdução</b> .....	62
<b>3.2 Material e Métodos</b> .....	63
<b>3.3 Resultados</b> .....	65
<b>3.4 Discussão</b> .....	69
<b>3.5 Conclusão</b> .....	73
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	74
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74

<b>4 CRESCIMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE NUTRIENTES EM PLANTAS JOVENS DE <i>Viola surinamensis</i> EXPOSTAS AO CÁDMIO</b> .....	80
<b>RESUMO</b> .....	80
<b>ABSTRACT</b> .....	81
<b>4.1 Introdução</b> .....	82
<b>4.2 Material e Métodos</b> .....	83
<b>4.3 Resultados</b> .....	86
<b>4.4 Discussão</b> .....	90
<b>4.5 Conclusão</b> .....	94
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	95
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	101

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

Os metais pesados são constituintes naturais da crosta terrestre, mas as atividades antrópicas alteraram drasticamente seus ciclos geoquímicos e seu equilíbrio bioquímico (ISMAIL et al., 2013). A contaminação ambiental por metais pesados, tem sido associada, especialmente, a intensa atividade industrial e agrícola (BHARGAVA et al., 2012).

Os resíduos da mineração e o uso excessivo de fertilizantes fosfatados com cádmio (Cd) e água de irrigação contendo essas substâncias tóxicas resultam no aumento da concentração desses metais no solo e podem causar graves desequilíbrios nos ecossistemas terrestres e aquáticos, isto porque, o Cd é um dos metais pesados mais tóxico e persistente, mesmo a níveis muito baixos e aliado a alta mobilidade do solo para as plantas, pode ser incorporado e bioacumulado aos demais componentes da cadeia alimentar, afetando rapidamente o número crescente de organismos (ZAYNEB et al., 2015).

Diante deste cenário, é crescente a demanda por estudos voltados para a recuperação de solos e aquíferos contaminados com altas concentrações de metais pesados. Neste sentido, a fitorremediação tem sido proposta como uma das principais técnicas promissoras de descontaminação de ambientes por metais como o Cd, especialmente por ser um método econômico, ambientalmente compatível e poder ser aplicada em extensas áreas (ZHAO et al., 2015). A fitorremediação é uma técnica que usa espécies vegetais capazes de remover contaminantes do solo, água e sedimentos, sendo extremamente necessário para mitigar os impactos nos ecossistemas (ALI et al., 2013).

Todas as plantas extraem metais do solo, no entanto, poucos vegetais possuem a capacidade para extrair, acumular e tolerar altos níveis de metais pesados (FAN et al., 2011). As plantas remediadoras consideradas acumuladoras de metais são naturalmente capazes de acumular metais pesados, como o Cd, nos seus tecidos sem desenvolver qualquer sintoma de toxicidade (CHAVES; SOUZA, 2014). A capacidade de acumular esses metais varia significativamente entre as espécies e entre as cultivares dentro das espécies, uma vez que diferentes mecanismos de captação de íons são relativamente específicos em cada espécie, com base em suas características genéticas, morfológicas, fisiológicas e anatômicas (LONE et al., 2008).

Estudos envolvendo espécies florestais para a fitorremediação de metais pesados são escassos. Algumas espécies lenhosas demonstraram ter relativa capacidade de tolerar e acumular o Cd, *Swietenia macrophylla* (FAN et al., 2011), *Ricinus communis* L. (BAUDDH;

SINGH, 2012), *Populus × canescens* (DAI et al., 2013), *Populus nigra* L. (JAKOVLJEVIĆ et al., 2014), *Morus* sp (ZHOU et al., 2015), *Salix nigra* e *Salix matsudana* (NIKOLIĆ et al., 2015), *Malus* spp (TOŠIĆ et al., 2015), *Lagerstroemia indica* e *Lagerstroemia fauriei* (WANG et al., 2016), *Prosopis juliflora* (MICHEL-LÓPEZ et al., 2016), *Moringa oleifera* Lam (YADAV; SRIVASTAVA, 2017), *Populus deltoides* L. e *Populus × euramericana* (NIKOLIĆ et al., 2017) e *Cassia alata* (SILVA et al., 2017), enquanto outras tiveram seu crescimento comprometido, com baixa acumulação e maior sensibilidade ao metal, *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* (SOARES et al., 2005), *Jatropha curcas* (CHAVES; SOUZA, 2014), *Salix alba* (NIKOLIĆ et al., 2015) e *Calophyllum brasiliense* Cambess (PEREIRA et al., 2017).

A procura por espécies florestais que apresentem características desejáveis como, sistemas de raízes profundos e densos (USHARANI; VASUDEVAN, 2017), elevada taxa de exsudação radicular (BOLAN et al., 2011), maior tempo de vida, crescimento rápido, grande produção de biomassa (CAIRES et al., 2011), competitividade, vigor (LAMENGO; VIDAL, 2007), tolerância e capacidade de acumular preferencialmente metais pesados, como o Cd, na parte aérea da planta, são de grande interesse para fitorremediação de solos contaminados (NIKOLIĆ et al., 2017). Visto que, esses elementos, uma vez absorvido permanecerão por um período mais longo imobilizados nos tecidos das plantas, retardando a ciclagem e o retorno desses contaminantes ao solo. Conservando assim, a utilidade e fertilidade do solo (ALI et al., 2013).

Compreender as características e as estratégias que permitam a sobrevivência das espécies arbóreas submetidas as condições de estresse por metais pesados como o Cd, podem servir para direcionar estudos e programas sobre fitorremediação para a preservação de áreas naturais e recomposição de ambientes contaminadas por esses metais.

Na Amazônia, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos nesta área de conhecimento, desta forma, sendo a *Virola surinamensis*, uma espécie florestal de crescimento relativamente rápido, alta produção de biomassa, rústica e amplamente distribuída e adaptada aos ecossistemas de várzea e igapó na Amazônia, especialmente nos estuários, pode atuar na fitorremediação e na tolerância ao Cd. Visto que, esses ambientes, são suscetíveis à contaminação por serem receptores importantes de nutrientes, contaminantes orgânicos e inorgânicos, incluindo os metais pesados (KHAN et al., 2017).

Considerando tais aspectos foram elaboradas as seguintes questões: (1) O crescimento de *V. surinamensis* é alterado pela exposição ao Cd? (2) plantas jovens de *V. surinamensis* desenvolvem mecanismos de tolerância ao Cd e capacidade de fitorremediação?

Considerando a fitotoxicidade do Cd, aceita-se como hipótese que plantas jovens de *V. surinamensis* apresentam diferentes estratégias fisiológicas, bioquímicas, nutricional e de crescimento e para tolerar ambientes contaminados por Cd.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas, fisiológicas e bioquímicas, o crescimento vegetativo, a distribuição de nutrientes, a capacidade de fitoextração e a tolerância de plantas jovens de *V. surinamensis* submetidas a diferentes concentrações de Cd.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Analisar os efeitos do estresse por Cd sobre os aspectos fisiológicos (fotossíntese, transpiração, condutância estomática, concentração interna de dióxido de carbono, temperatura foliar e eficiência do uso da água) em *V. surinamensis*;

Avaliar os efeitos das doses de Cd sobre a fluorescência da clorofila a (fluorescência variável e máxima, coeficiente de extinção fotoquímica, coeficiente de extinção não-fotoquímico e a taxa de transporte de elétrons) em *V. surinamensis*;

Avaliar a capacidade de fitoextração (fator de bioacumulação e de translocação) de Cd em *V. surinamensis*;

Determinar o índice de tolerância para as diferentes concentrações de Cd e para cada órgão da planta de *V. surinamensis*;

Analisar os efeitos das doses de Cd sobre os aspectos bioquímicos (carboidratos solúveis totais, amido, sacarose, açúcares redutores, prolina, proteínas solúveis totais, aminoácidos solúveis totais, amônio, nitrato, redutase do nitrato, clorofila total) de *V. surinamensis*;

Avaliar os efeitos do Cd sobre o crescimento (altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, massa seca total e relação entre massa seca da raiz e parte aérea) de *V. surinamensis* submetidas aos tratamentos com Cd;

Analisar a concentração de Cd, micro e macronutrientes nas raízes e parte aérea (caules e folhas) das plantas de *V. surinamensis*.

## 1. 2 Revisão de literatura

### 1. 2. 1 Fontes de contaminação de cádmio no solo

Os metais pesados catiônicos e aniônicos são elementos químicos metálicos ou metalóides com densidade superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  e normalmente estão presentes em baixas concentrações no ambiente (SHARMA et al., 2016). No entanto, com a crescente industrialização os metais pesados foram excessivamente liberados para o meio ambiente, criando uma grande preocupação mundial, especialmente por não serem biodegradáveis, acumulando-se no ambiente e tecidos dos seres vivos (bioacumulação) e as suas concentrações aumentam à medida que passam de níveis tróficos inferiores para níveis tróficos mais elevados, fenômeno conhecido como biomagnificação (ALI et al., 2013).

O cádmio (Cd) é um metal pesado não essencial, de densidade  $8,6 \text{ g cm}^{-3}$  (GUPTA; ABDULLAH, 2011). É altamente tóxico e se encontra naturalmente distribuído na crosta terrestre ( $0,1 - 0,5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ), atmosfera ( $1 - 5 \text{ ng m}^{-3}$ ) (KHAN et al., 2016), sedimento marinho ( $< 1 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ) e água do mar ( $< 0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (BAZZI, 2014). No solo, normalmente está presente na forma de impureza no minério de zinco (Zn), mas, quantidades substanciais de Cd são liberadas para o meio ambiente durante a fundição de Zn (KHAN et al., 2017).

O aumento constante dos níveis de Cd no ambiente em todo o mundo (YAN et al., 2015) oriundos de atividade agrícolas e industriais tem contribuído para a degradação e contaminação dos solos e das águas superficiais e subterrâneas (AHMAD et al., 2014) e, mesmo em baixa concentração pode ter efeitos tóxicos aos organismos aquáticos e do solo, incluindo plantas e animais, e finalmente sobre a saúde humana (KHAN et al., 2017). Concentrações de metais pesados além dos limites têm efeitos na saúde porque interferem no funcionamento normal de sistemas vivos (ALI et al., 2013).

No Brasil, a resolução 420 do Conselho Nacional de Meio Ambiente, CONAMA (BRASIL, 2009) determina como prevenção que a concentração máxima de Cd no solo não seja superior a  $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca e para áreas industriais, como critério de investigação, o valor máximo permitido do metal é de  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca.

As fontes de contaminação de Cd em solos agrícolas incluem lodos de esgoto, herbicidas e fertilizantes (GAO et al., 2015), especialmente os fertilizantes fosfatados (WANG et al., 2015). O Cd está presente em vários produtos de origem industrial como ligas de aço e baterias recarregáveis níquel-cádmio (Ni-Cd), pigmentos de tinta, reagentes para a fabricação



fenólico, carbonila e carboxílico, aumentando a afinidade destes compostos com os íons Cd ( $\text{Cd}^{2+}$ ), reduzindo sua disponibilidade para as plantas (AHMAD et al., 2014; KHAN et al., 2017).

Solos ricos em matéria orgânica e exsudados radiculares aumentam a imobilização do Cd nas partículas do solo, reduzindo a sua biodisponibilidade (ONIRAN et al., 2013). Além disso, a maior quantidade de húmus aumenta a adsorção de Cd no solo, reduzindo a mobilidade ou biodisponibilidade do metal (KHAN et al., 2017) e o teor da matéria orgânica tem uma forte influência sobre a capacidade de troca catiônica entre o Cd e outros metais (ONIRAN et al., 2013). Ademais, o Cd, ocorre na solução do solo na forma iônica livre ( $\text{Cd}^{2+}$ ), predominantemente, mas também como quelatos de Cd (VERBRUGGEN et al., 2009; ONIRAN et al., 2013). Os agentes quelantes se aderem aos íons metálicos livres na solução do solo formando complexos solúveis e, assim, reduzem as atividades reativas dos íons metálicos no solo (ONIRAN et al., 2013).

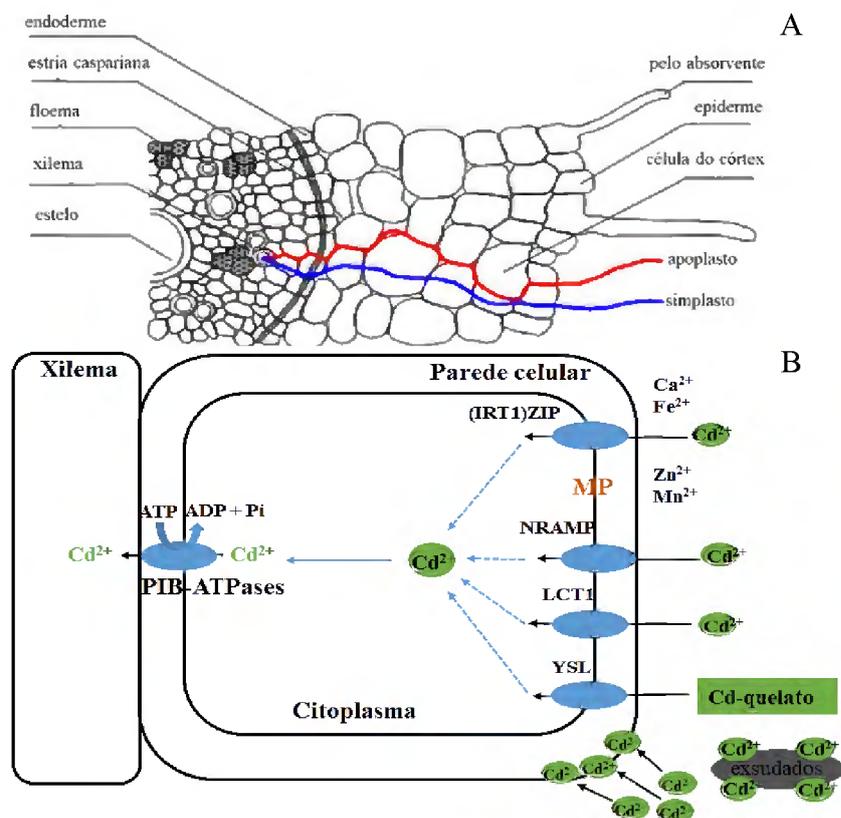
A baixa concentração de  $\text{Cd}^{2+}$  na solução do solo combinado com o baixo coeficiente de difusão deste elemento, sugere que sua chegada no sistema de raiz da planta seja por fluxo de massa (LUX et al., 2011). O Cd é absorvido principalmente na forma iônica, como o cátion divalente ( $\text{Cd}^{2+}$ ), e a região apical da raiz e os pêlos radiculares são as zonas mais ativas para a absorção de  $\text{Cd}^{2+}$  do solo e essas estruturas podem mediar a absorção da maior parte desse metal (SONG et al., 2016).

A entrada de  $\text{Cd}^{2+}$  na raiz das plantas pode ocorrer através das vias apoplásticas e ou simplásticas (Figura 2A) antes de entrar no xilema e ser translocado para a parte aérea (VACULÍK et al., 2012; HE et al., 2013; BALESTRI et al., 2014; SONG et al., 2016). Esse processo envolve principalmente três vias: (1) o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) liberado através da respiração das células da raiz da planta combina com a água para formar ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), este por sua vez é dissociado em íon de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) e bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) na solução do solo, assim, o  $\text{H}^+$  pode ser trocado por  $\text{Cd}^{2+}$  presentes no substrato e este por sua vez é adsorvido rapidamente na superfície das células epidérmicas da raiz, sem gasto de energia (SONG et al., 2016). Assim, o  $\text{Cd}^{2+}$  se movimenta da epiderme da raiz até a endoderme por via apoplástica (YAMAGUCHI et al., 2011); (2) embora o Cd não seja um elemento essencial para as plantas, devido à sua semelhança química com cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ) e ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e sua alta solubilidade em água é facilmente absorvido pelas raízes, por canais iônicos desses minerais essenciais (SONG et al., 2016; TODD, 2016) (Figura 2B). A absorção do  $\text{Cd}^{2+}$  pelo plasmalema da planta parece ser mediada por proteínas transportadoras (IRT1) da

família ZIP para  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  (NAZAR et al., 2012), NRAMP (Proteínas de macrófagos associadas à resistência natural-transportador de  $\text{Fe}^{2+}$ ) (TAKAHASHI et al., 2011), LCT1 (URAGUCHI et al., 2011) ou por canais de  $\text{Ca}^{++}$  (SONG et al., 2016) (Figura 2B). Neste processo, o  $\text{Cd}^{2+}$  é deslocado através do parênquima cortical por via simplástica (HE et al., 2013); (3) para aumentar a disponibilidade de íons no solo da rizosfera, as raízes de plantas secretam ativamente compostos de baixo peso molecular (exsudados), como MAs (ácidos muginaicos), que quelam  $\text{Cd}^{2+}$  e formam complexos de ligandos metálicos (SONG et al., 2016). Desta forma, o  $\text{Cd}^{2+}$  entra nas células da epiderme do sistema de raiz como quelatos através de proteínas YSL (*Yellow-Stripe 1-Like*) (CURIE et al., 2009) (Figura 2B).

Após a passagem pela epiderme da raiz e radialmente pelo córtex radicular o  $\text{Cd}^{2+}$  é transportado simplásticamente para o estelo e liberado para o xilema da planta (AKHTER et al., 2014; SONG et al., 2016). O Cd é carregado a partir do simplasto para o xilema por PIB-ATPases de metais pesados, também conhecidos como ATPases de metais pesados (HMAs) tais como AtHMA4 localizadas na membrana plasmática (SHARMA; DIETZ; MIMURA, 2016) (Figura 2B).

**Figura 2** - Diagrama mostrando a absorção e o transporte de cádmio das raízes para o xilema das plantas através de caminhos apoplásticos e simplásticos



**Fonte:** A. Modificado de Song et al. (2016); B. Modificado de Lux et al. (2011).

Em plantas tolerantes ao Cd, o metal é acumulado preferencialmente na raiz, no vacúolo das células (seqüestro vacuolar) e o transporte para a parte aérea é restrito, sendo que sua concentração decrescente nos seguintes órgãos: caules, folhas, frutos e sementes (LUX et al., 2011). O menor transporte de Cd para o tecido foliar tem sido evidenciado em diversos estudos (FAN et al., 2011; JAKOVLJEVIĆ et al., 2013; DAI et al., 2013; MARMIROLI et al., 2013; CHAVES; SOUZA, 2014; NIKOLIĆ et al., 2017) e pode ser uma estratégia de proteção do aparato fotossintético das plantas. Entretanto, esses resultados são constratantes aos de outros trabalhos, que descreveram uma maior concentração do Cd nas folhas do que em outros órgãos (DOMINGUEZ et al., 2008; TOŠIĆ et al., 2015; LIU et al., 2016). Sendo assim, o padrão de alocação e a compartimentalização são processos chaves que a planta utiliza para lidar com a toxicidade do Cd, limitando as interações do metal com as células ou com os compartimentos metabolicamente ativos dentro da célula e esses processos dependem do período de exposição ao Cd, condições ambientais circundantes e idade da planta ou genótipo (ISAURE et al., 2015; ZOUARI et al., 2016).

### 1. 2. 3 Toxicidade do cádmio em plantas

O cádmio (Cd) é um metal pesado não essencial que é prontamente absorvido, podendo ser rapidamente translocado em plantas, tornando-o altamente biodisponível e, portanto, tóxico, mesmo a concentrações relativamente baixas (BASHIR et al., 2015). Dependendo da concentração, o Cd pode interferir na captação, transporte e utilização de macro e micronutrientes pelas plantas (DI BACCIO et al., 2014). Redução de minerais como  $Mg^{2+}$  (DI BACCIO et al., 2014; LIU et al., 2015; WANG et al., 2016; ZOUARI et al., 2016),  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  em plantas tratadas com cádmio provavelmente ocorre devido o  $Cd^{2+}$  competir com os transportadores de membrana daqueles minerais (HE et al., 2013), embora os mecanismos subjacentes a esta interferência ainda não sejam completamente compreendidos (DI BACCIO et al., 2014). Além disso, são observadas redução do nitrogênio (N) e fósforo (P) (HE et al., 2013) e alterações na atividade de várias enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio (SONG et al., 2016), incluindo, as da assimilação do nitrato (Nitrato redutase, NR e Nitrito redutase, NiR), e amoníaco (Glutamina sintetase, GS; Glutamina oxoglutarato Aminotransferase, GOGAT e Glutamato desidrogenase, GDH) (SINGH et al., 2016).

Os sintomas de fitotoxicidade pelo Cd incluem ainda, redução de pigmentos acessórios como os carotenóides (FERNÁNDEZ et al., 2013; ASLAN et al., 2014; ZOUARI et al., 2016;

SOLTI et al., 2016; NIKOLIĆ et al., 2017; SILVA et al., 2017) e mudanças nos índices de clorofila a, b e total que podem resultar em sintomas visuais como a clorose foliar, especialmente em folhas jovens (FERNÁNDEZ et al., 2013; ELLOUMI et al., 2014; YAN et al., 2015). Essas alterações podem ser acompanhadas em reduções significativas da atividade fotossintética das plantas (ELLOUMI et al., 2014; HERNÁNDEZ et al., 2015; YANG et al., 2015; WANG et al., 2016; ZOUARI et al., 2016; MICHEL-LÓPEZ et al., 2016; NIKOLIĆ et al., 2017; SILVA et al., 2017).

O processo fotossintético é negativamente impactado pelo Cd, principalmente pela inibição da transferência de elétrons da quinona A (QA) para a quinona B (QB) do fotosistema II (DI BACCIO et al., 2014; TODD, 2016), com alteração do rendimento potencial da reação fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) (FERNÁNDEZ et al., 2013; YANG et al., 2015; SOLTI et al., 2016) e de enzimas chave de fixação de  $CO_2$ , ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase (RubisCo) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase) (TRAN; POPOVA 2013). Ademais, a redução da fotossíntese em plantas expostas ao Cd seria devido a alteração na biossíntese de clorofila em função de distúrbio na disponibilidade de glutatona, na inibição da atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulínico desidratase (ALA-D), distúrbio da função da protoclorofila redutase, a interferência na absorção de outros cations divalentes como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  ou a substituição de  $Mg^{2+}$  por Cd nas moléculas de clorofila (PARMAR et al., 2013). Assim, a diminuição da atividade fotossintética em plantas sob estresse por Cd pode resultar em alterações na concentração de amido e carboidratos solúveis nos tecidos da planta (HE et al., 2013; ELLOUMI et al., 2014) e no desequilíbrio nutricional orgânico entre metabolismo do carbono e nitrogênio (CI et al., 2009).

A toxicidade por Cd pode afetar as relações hídricas, respiração (OLÁH; HEPP; MÉSZÁROS, 2015), transpiração, condutância estomática e concentração intercelular de  $CO_2$  (ELLOUMI et al., 2014; SONG et al., 2016; ZOUARI et al., 2016, NIKOLIĆ et al., 2017). A diminuição da condutância estomática e transpiração observada em plantas tratadas com Cd pode estar relacionada ao aumento das concentrações do ácido abscísico (ABA) (BELIMOV et al., 2015). A redução da condutância estomática em plantas exposta ao Cd pode resultar em limitações concomitantes na difusão de vapor de água e  $CO_2$  para o interior das células, podendo afetar significativamente a taxa fotossintética (NIKOLIĆ et al., 2017). Entretanto, o fechamento estomático pode ser uma estratégia de tolerância das plantas para diminuir a absorção de metais pesados do solo e reduzir a acumulação desses compostos e seus efeitos fitotóxicos.

Redução da área foliar (CHAVES; SOUZA, 2014; ELLOUMI et al., 2014; ZOUARI et al., 2016; SOLTI et al., 2016; NIKOLIĆ et al., 2017), enrolamento das folhas (TRAN; POPOVA, 2013), baixa produção de biomassa, inibição do crescimento e, eventualmente a morte da planta tem sido evidenciada em plantas exposta a doses crescentes de Cd (CHAVES; SOUZA, 2014; DAL CORSO; MANARA; FURINI, 2013; YAN et al., 2015; SOLTI et al., 2016; NIKOLIĆ et al., 2017). O menor crescimento de raízes, diâmetro e altura de caules e número de folhas (CHAVES; SOUZA, 2014; NIKOLIĆ et al., 2017), nas plantas exposta a doses crescentes de Cd, tem relações estreitas entre produção de biomassa e mudanças nas relações hídricas e atividade fotossintética (NIKOLIĆ et al., 2017). Ou seja, a presença de Cd reduz o potencial hídrico das plantas, afetando a absorção e o transporte de macro e micronutrientes para a parte área, reduzindo a produção de compostos orgânicos, resultando, desta forma no menor crescimento do vegetal. Adicionalmente, a menor abertura estomática em plantas expostas a doses de Cd pode reduzir a disponibilidade de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese acarretando a redução de suas taxas de crescimento (CHAVES; SOUZA, 2014).

Evidencias apontam que o Cd induziu o aparecimento da necrose nas zonas meristemáticas e de alongamento das raízes das plantas (ABOZEIDE et al., 2017), afetando significativamente o tamanho do ápice da raiz e o desenvolvimento de pêlos radiculares (BALESTRI et al., 2014). Estudo recente evidencia que a necrose do sistema de raiz em plantas tratadas com CdCl<sub>2</sub>, está relacionada com o aumento de superóxidos, mediado pela maior atividade da NADPH oxidase, complexo enzimático associado a plasmalema (ABOZEIDE et al., 2017).

Alterações na espessura do tecido radicular, da epiderme e endoderma da raiz (MARQUES et al., 2011; TRAN; POPOVA 2013), assim como, a diferenciação de elementos do xilema (BALESTRI et al., 2014) também tem sido relatada em plantas submetidas a doses de Cd. Essas mudanças anatômicas ocorrem, pelo menos em parte, devido o aumento da lignificação das paredes celulares (CUNHA et al., 2008) o que pode afetar a permeabilidade das raízes à água e a taxa de transpiração (NIKOLIĆ et al., 2017). Também tem sido relatado que, alterações nos parâmetros estruturais das folhas como a espessura do mesofilo e da epiderme, o tecido paliçádico, a nervura principal e o tecido vascular em plantas expostas a metais pesados como o Cd, podem afetar a fotossíntese e, portanto, a produção de biomassa e o desempenho da planta as condições do estresse (NIKOLIĆ et al., 2017).

A toxicidade das plantas por Cd induz alterações do equilíbrio redox celular resultando no aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), como o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), radical

hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) (SINGH et al., 2016), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), podendo causar danos graves às células vegetais (YAN et al., 2015; ZOUARI et al., 2016) através da oxidação de lipídios da membrana, proteínas e ácidos nucleicos, alterações na estrutura da parede celular, degeneração de cloroplastos, mitocôndrias (HE et al., 2013), pigmentos, enzimas (WANG et al., 2015) e vazamento de eletrólitos (ZOUARI et al., 2016).

As proteínas e enzimas são inativadas ou desnaturadas devido a ligação do Cd com grupos funcionais (sulfidrina, -SH) desses compostos orgânicos, resultando no deslocamento dos co-fatores essenciais como Fe, Mn, Zn, Cu, níquel (Ni) e molibdênio (Mo) (DAL CORSO et al., 2013) podendo levar a vários distúrbios metabólicos (YAN et al., 2015). A produção de EROs na célula devido o Cd, afeta a atividade de enzimas antioxidantes e, portanto, altera os complexos de multiproteínas dos tilacóides, como as do fotossistema I (PSI), fotossistema II (PSII), ATP sintase (ATPase) e citocromo b6f (Cyt b6f) o que, em última análise, diminui a eficiência fotossintética da planta (BASHIR et al., 2014). Portanto, a redução da geração de EROs e a coordenação do equilíbrio redox intracelular são importantes para o desenvolvimento de plantas (LIU et al., 2015).

#### 1. 2. 4 Tolerância das plantas ao cádmio

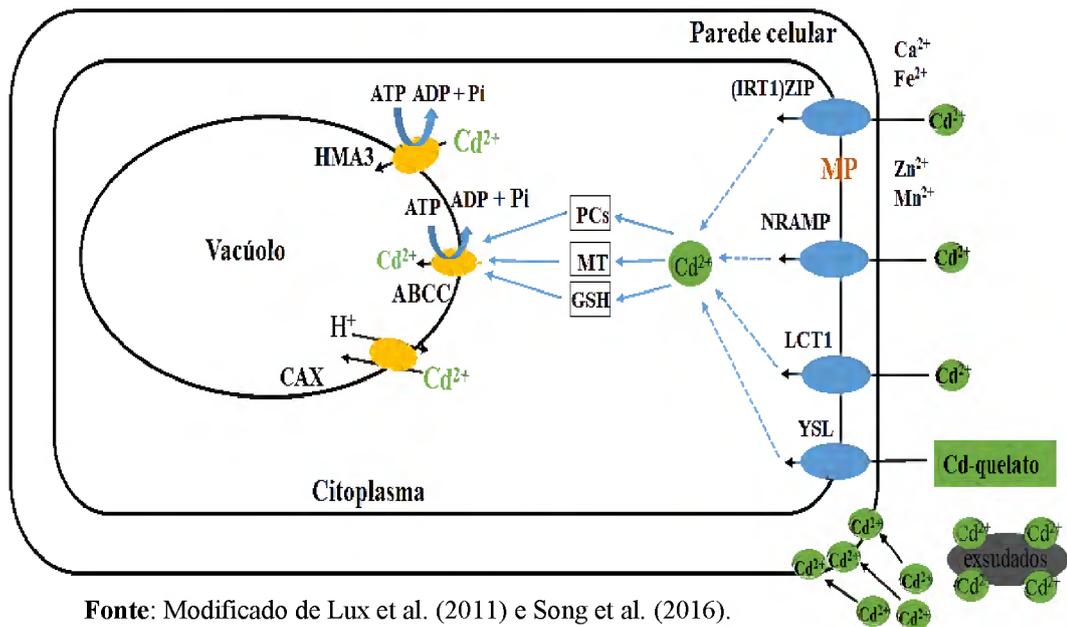
A tolerância das plantas aos metais pesados pode ser definida como a capacidade de sobreviver a níveis desses contaminantes que são tóxicos para outras plantas, e se manifesta como uma interação entre um genótipo e seu meio ambiente (MACNAIR et al., 2000; GALLEGO et al., 2012). Apesar da fitotoxicidade do Cd, tolerância a este elemento tem sido observado em várias espécies de plantas, devido desenvolveram diferentes mecanismos eficientes para restringir ou neutralizar o efeito inibitório do excesso do metal (GALLEGO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2015; WANG et al., 2016).

A exposição da planta ao excesso de Cd pode acelerar a maturação do sistema radicular e resultar na formação de estrias de Caspari, lamelas de suberina, endoderme, modificações nos componentes de parede celular, com deposição de suberina (LUX et al., 2011; BALESTRI et al., 2014), lignina, polissacarídeos, proteínas, fosfato e pectina (PARROTA et al., 2015) mais próximas do ápice da raiz, que formam as barreiras físicas ao movimento de Cd no apoplasto (YIN et al., 2015), limitando assim, a transferência do metal para o xilema e uma diminuição do acúmulo deste elemento nos tecidos aéreos da planta (LUX et al., 2011). A restrição na

translocação do Cd para os órgãos acima do solo protege os tecidos foliares metabolicamente ativos, especialmente, os fotossintetizantes (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011).

Adicionalmente, a parede celular (Figura 3) do tecido radicular por ser a primeira barreira à captação de metais pesados em plantas (WANG et al., 2015), liga-se ao Cd impedindo que o metal migre através das membranas citoplasmáticas dessas células (LIU et al., 2015).

**Figura 3** - Mecanismos de absorção, acumulação e transporte de Cd.



Fonte: Modificado de Lux et al. (2011) e Song et al. (2016).

Os metais podem se ligar a parede celular das plantas devido à presença de grupos funcionais como carboxila (-COOH), hidroxila (-OH) e tiol (-SH), presentes nos componentes de parede (MEHES-SMITH et al., 2013). Portanto, modificações de espessura e constituição química das barreiras apoplásticas do sistema de raiz, são adaptações importantes para a tolerância das plantas ao metal (MARQUES et al., 2011). Além disso, exsudados radiculares como ácido orgânico (ácido oxálico, ácido málico e ácido cítrico) também atuam como quelantes de Cd (Figura 3), imobilizando-os na solução do solo para impedir a sua entrada nas raízes (PÁL et al., 2006; NAZAR et al., 2012; HERNANDEZ et al., 2015).

No simplasto (Figura 3) o movimento do  $Cd^{2+}$  pode ser limitado devido formar complexos ligandos de Cd (quelato de Cd) no citosol com fitoquelatinas (PCs) (CdPCs) (SONG et al., 2016; HERNANDEZ et al., 2015), glutatona reduzida (GSH) (CdGSH) (ISAURE et al., 2015) e metalotioneínas (MTs) (CdMTs) (TOMAS et al., 2014; HERNANDEZ et al., 2015). Assim, os ligandos de Cd poderão ser transportados ao interior dos vacúolos (sequestro de Cd) (HERNANDEZ et al., 2015; SONG et al., 2016; HASANUZZAMAN et al., 2017), para proteger o citoplasma e organelas das células fisiologicamente funcionais contra a toxicidade

do metal (HE et al., 2013; ISAURE et al., 2015; HASANUZZAMAN et al., 2017). Ademais, o seqüestro de Cd e sua retenção nos vacúolos pode diminuir o nível de Cd livre na célula e assim potencialmente influenciar na redução do movimento do metal em toda a planta (WANG et al., 2015).

O transporte de Cd pelo tonoplasto (Figura 3), pode ser feito através do antiporte  $H^+/Cd^{2+}$  por meio de proteínas trocadoras de cátions (AtCAX2 e AtCAX4), pelas P1B-ATPases de metais pesados como a proteína AtHMA3 (altamente expresso em células de guarda, hidatódios, tecidos vasculares e ápice de raiz) e como quelante de Cd mediados por transportadores ABC, como as proteínas AtMRP3 (Multidrug Resistance Protein 3) (SHARMA; DIETZ; MIMURA 2016).

O acúmulo de Cd nas raízes de plantas arbóreas expostas a doses crescentes do metal tem sido relatada em várias espécies (VACULÍK et al., 2012; BAUDDH; SINGH, 2012; CHAVES; SOUZA, 2014; WANG et al., 2016; SILVA et al., 2017). Entretanto, aumento significativo na concentração de Cd no tecido foliar foi evidenciado em *Populus jacquemontiana* (SOLTI et al., 2016) e *L. fauriei* (Wang et al., 2016).

Uma classe de plantas raras, cerca de 450 espécies de angiospermas, foram identificadas como hiperacumuladoras de metais pesados, representando menos de 0,2% de todas as espécies conhecidas (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011). Essas metalófitas tem a capacidade de acumular grandes quantidades de metais pesados do solo (SINGH et al., 2016). Nessas plantas, os metais pesados não são acumulados nas raízes, mas sim, em órgãos acima do solo (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011; SHARMA et al., 2016). Essas plantas podem acumular mais de 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> (peso seco) na parte aérea (BAKER et al., 2000), especialmente nas folhas, sem apresentar sintomas de fitotoxicidade devido ao eficiente mecanismo de desintoxicação por quelação no citoplasma ou armazenado em vacúolose ou pelo seqüestro de metais em locais como a epiderme, tricomas e cutícula, onde causam menos danos à maquinaria fotossintética (TRAN; POPOVA 2013; SINGH et al., 2016). A maioria do Cd retirados do solo por essas plantas, são translocados rapidamente e eficientemente pelo xilema para a parte aérea da planta, provavelmente impulsionada pela transpiração (TRAN; POPOVA 2013; SONG et al., 2016; WANG, 2016). As plantas hiperacumuladores se distinguem das não-hiperacumuladores através de três características básicas: capacidade muito maior de absorver metais pesados do solo, translocação de metais mais rápida e efetiva capacidade de desintoxicar e sequestrar enormes quantidades de metais pesados nas folhas (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011).

O estresse por Cd também ativa nas plantas várias defesas bioquímicas, como as enzimas antioxidante: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) (YAN et al., 2015; WU et al. 2015), Guaiacol peroxidase (GPOD)(MA et al., 2013), Ascorbato Peroxidase (APX), Glutathione Redutase (GR), Glutathione desidrogenase, também conhecida como dehidroascorbato reductase (DHAR), monodehidroascorbate reductase (MDHAR), Glutathione peroxidase (GPX) e compostos antioxidante não enzimático como a glutathione (GSH), ácido ascórbico (AsA) (MONTANARO; DICHIO, 2012; WU et al., 2015), prolina e açúcares solúveis totais (YAN et al., 2015) para eliminar ou manter os níveis de EROs sob controle, e assim reparar os efeitos fitotóxicos dos oxidantes (HERNÁNDEZ et al., 2015), permitindo, pelo menos em parte, a restauração dos centros de reação do PSII e o aumento da atividade fotossintética das plantas (SOLTI et al., 2016).

A acumulação de prolina em plantas submetidas a tratamento com Cd pode estar relacionada a sua atuação como um quelante de metal (LIANG et al., 2013). A prolina, portanto, constitui-se numa barreira pela qual o influxo de Cd nas raízes é controlado (ZOUARI et al., 2016). Além disso, a acumulação de prolina pode contribuir para o ajuste osmótico ao nível celular e proteção enzimática, estabilização da estrutura da membrana, macromoléculas e organelas (LIANG et al., 2013; ASLAN et al., 2014; WANG et al., 2016), estimular a produção de antioxidantes para a eliminação de radicais livres, regular o potencial redox celular e sustentar o fotossistema II (SINGH et al., 2016).

O aumento da síntese de prolina em plantas exposta ao Cd tem sido relacionado a tolerância de várias espécies vegetais (HE et al., 2013; WANG et al., 2016). Em plantas jovens de *L. indica* e *L. fauriei* submetidas a doses crescentes de Cd foi verificado aumento na concentração de prolina (WANG et al., 2016). Entretanto, estudo realizado por Nikolić et al., (2016) evidenciaram redução significativa nos teores de prolina nas folhas em *Populus x euramericana* submetidas a doses de Cd. Esses autores atribuíram a diminuição desse aminoácido a deficiência de N induzida por Cd, o que resultou na menor atividade de NR, com o conseqüente aprimoramento da degradação da prolina em relação à síntese.

Estudo recente demonstra que o suprimento de prolina exógena reduz o teor de Cd nas folhas e raízes de plantas tratadas com este metal, melhora os teores de  $Ca^{2++}$ ,  $Mg^{2++}$  e  $K^+$ , na raiz e parte aérea, aumenta pigmentos fotossintéticos, a fotossíntese líquida, condutância estomática, transpiração, altura da planta, perímetro foliar, peso seco das folhas e raízes e atenua o estresse oxidativo ocasionado por Cd pela melhora das atividades enzimáticas antioxidantes como a SOD, CAT, GPX e APX (ZOUARI et al., 2016).

Nas plantas extressadas por metais como o Cd, o acúmulo de açúcares, podem ativar as reações geradoras de NADPH para eliminar ou manter os níveis de EROS sob controle e, assim, reparar os efeitos fitotóxicos dos oxidantes (EL-BELTAGI e MOHAMED, 2013). Assim, o aumento dos carboidratos em plantas exposta ao Cd pode ser um mecanismo de proteção para reduzir a toxicidade do metal pela desintoxicação da EROs, por meio da quelação do Cd, possibilitando, a manutenção dos centros de reação do PSII e a atividade fotossintética da planta (Shah et al. 2017). Tem sido sugerido que o aumento de açúcares em plantas sobre estresse por Cd, pode funcionar como osmólito compatível para o ajustamento osmótico (Gubrelay et al. 2013; Singh et al. 2016), ou seja, o acúmulo de carboidratos em plantas sob efeito do Cd pode servir para a manutenção do estado hídrico da planta, favorecendo a proteção dos tecidos e os processos fisiológicos.

## 1. 2. 5 Descrição e importância da *Virola surinamensis* (Rol. ex. Rottb.) Warb

### 1. 2.5.1 Distribuição geográfica

A *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. conhecida popularmente como ucuúba, é uma espécie arbórea que ocorre naturalmente nos solos inundáveis das florestas de várzea, igapó e margens de rios e igarapés (JARDIM; MOTA, 2007; HIRUMA-LIMA et al., 2009; CNCFLORA, 2012), pertence à família Myristicaceae, ordem magnoliales, segundo o sistema de classificação baseado no The Angiosperm Phylogeny Group (APG) III (2009). Esta família possui 20 gêneros e cerca de 500 espécies, com distribuição natural em toda a região neotropical, alcançando continentes asiático e africano (LI; WILSON, 2008). *V. surinamensis* é encontrada no arquipélago das Antilhas, ilhas de Guadalupe, Granada, Trinidad e Tobago, Guatemala, Amazônia Colômbiana e Peruana, Bolívia, Venezuela, Brasil (GALUPPO; CARVALHO, 2001), Costa Rica, Equador, Guianas, Panamá e Suriname (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE, 2008). No Brasil, sua distribuição geográfica, abrange os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Ceará, Maranhão, Piauí e Mato Grosso (MYRISTICACEAE, 2014).

### 1. 2.5.2 Importância econômica

*V. surinamensis* é uma espécie de relevante potencial sócio-econômico, ecológico, ambiental e medicinal. Sua madeira é amplamente empregada na construção de interiores,

carpintaria, marcenaria, fabricação de caixas, palitos de fósforo, laminados, compensados, celulose e papel (CESARINO, 2006). A resina da casca do caule e as folhas são usadas na medicina popular para o tratamento de erisipelas, cólicas, dispepsia, processos inflamatórios (VAN DEN BERG, 2010), úlcera, gastrite, câncer (HIRUMA-LIMA et al., 2009), reumatismo, artrite (CESARINO, 2006) e na prevenção da picada do mosquito da malária pelos índios da Amazônia (MAIA et al., 2000). Recentemente os extratos das folhas de *V. surinamensis* mostraram atividade antileishmanias (VEIGA et al., 2017). Além disso, há também a comercialização do óleo rico em lipídios, conhecido como “sebo de ucuúba” extraído das sementes e usado na fabricação de sabões, velas, cosméticos e perfumes (CESARINO, 2006). Além de fornecer abundante quantidade de frutos para aves e outros animais silvestres (LORENZI, 1992), a Ucuúba apresenta excelente taxa de sobrevivência em plantios controlados, sendo por isso recomendada para recomposição de áreas alteradas na região amazônica (NEVES; GONGALVES, 2003), especialmente as de preservação permanentes (LORENZI, 1992).

### 1. 2.5.3 Características dendrológicas e fenológicas

A Ucuuba é uma espécie arbórea, esciófila e higrófila, com crescimento rápido e que se desenvolve bem em ambientes já explorados (MACEDO; ANDERSON, 1993), podendo atingir 40 metros de altura e 1 metro de DAP (GALUPPO; CARVALHO, 2001). A madeira é leve com densidade de 0,48 g/cm<sup>3</sup>, superfície áspera e baixa resistência ao apodrecimento (LORENZI, 1992). Sistema radicular pivotante, raiz primária axial, cilíndrica, sinuosa, sub-herbácea, crassa e delgada (GURGEL et al., 2006). As folhas são pequenas, medindo de 10 cm a 13 cm de comprimento (GALUPPO; CARVALHO, 2001). Espécie dioica, com inflorescências em panículas cônicas; polinizada especialmente por insetos dípteros, *Copestylum* sp e *Erystalys* sp (JARDIM; MOTA, 2007). O fruto é um folículo simples, carnoso e deiscente (GURGEL et al., 2006) constituído de duas valvas, que se abrem quando maduros, através da sutura ventral. Em cada fruto existe uma semente (CRUZ; BARROS, 2016).

As sementes são totalmente envolvidas por arilo de coloração vermelha, carnoso e fimbriado (GALUPPO; CARVALHO, 2001) e possuem comportamento recalcitrante (LIMAS et al., 2007). São duras, com tegumento impermeável com alto grau de dormência, decorrentes da imaturidade do embrião (PIÑA-RODRIGUES, 1999) resultando numa germinação lenta e desuniforme (CRUZ; BARROS, 2016). A dispersão de sementes, ocorre principalmente na

estação chuvosa (GALUPPO; CARVALHO, 2001). A dispersão é feita de forma zoocórica por aves e macacos e hidrocórica (CESARINO, 2006). A germinação é epígea (CRUZ; BARROS, 2016), criptocotiledonar e emergência reta (GURGEL et al., 2006). Os seus cotilédones são ricos em triacilgliceróis e ácidos graxos (KATO et al., 2012).

A fenologia reprodutiva é anual, iniciando aos seis anos de idade, com floração ocorrendo entre os meses de agosto a novembro e fevereiro a abril, com frutificação entre fevereiro e maio (CESARINO, 2006), coincidindo com o período chuvoso e de elevação dos rios amazônicos.

## REFERÊNCIAS

ABOZEID, A.; YING, Z.; LIN, Y.; LIU, J.; ZHANG, Z.; TANG, Z. Ethylene Improves Root System Development under Cadmium Stress by Modulating Superoxide Anion Concentration in *Arabidopsis thaliana*. **Front Plant Science**, v. 8, n. 253, p. 1-15, 2017.

AHMAD, I.; AKHTAR, M. J.; AHMAD, Z. Z.; NAVEED, M.; MITTER, B.; SESSITSCH, A. Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 18, p. 11054-11065, 2014.

AKHTER, M. T. F., OMELON, C. R., GORDON, R.A., MOSER, D., MACFIE, S. M. Localization and chemical speciation of cadmium in the roots of barley and lettuce, **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 10-19, 2014.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p.869-881, 2013.

ASLAM, R.; ANSARI, M.Y.K.; CHOUDHARY, S.; BHAT, T. M.; JAHAN, N. Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annum* L. – An important spice crop of India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 5, p. 465-472, 2014.

BAKER, A. J. M.; MCGRATH, S. P., REEVES, R.S., SMITH, J. A. C. **Metal hyperaccumulator plant: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils**. In: Terry, N., Bannelos, G.N. (Eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publ. FL, USA, p. 85-107, 2000.

BALESTRI, M.; CECCARINI, A.; FORINO, L. M. C.; ZELKO, I.; MARTINKA, M.; LUX, A.; CASTIGLIONE, M.R. Cadmium uptake, localization and stress-induced morphogenic response in the fern *Pteris vittata*. **Planta**, v. 239, n. 5, p. 1-10, 2014.

BASHIR, H.; QURESHI, M. I.; IBRAHIM, M. M.; IQBAL, M. Chloroplast and photosystems: Impact of cadmium and iron deficiency. **Photosynthetica**, v. 53, n. 3, p. 1-15, 2015.

- BASHIR, H.; IBRAHIM, M. M.; BAGHERI, R.; AHMAD, J.; ARIF, I. A.; BAIG, M. A.; QURESHI, M. I. Influence of sulfur and cadmium on antioxidants, phytochelatins and growth in Indian mustard. **AoB PLANTS Advance**, v. 12, n. 7, p. 1-35, 2015.
- BAUDDH, K.; SINGH, R. P. GROWTH, tolerance efficiency and phytoremediation potential of *Ricinus communis* (L.) and *Brassica juncea* (L.) in salinity and drought affected cadmium contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 85, p. 13-22, 2012.
- BAZZI, A. O. Heavy metals in seawater, sediments and marine organisms in the Gulf of Chabahar, Oman Sea. *Journal of Oceanography and Marine*, v. 5, n. 3, p. 20-29, 2014.
- BELIMOV, A. A.; DODD, I. C.; SAFRONOVA, V. I.; MALKOV, N. V.; DAVIES, W. J.; TIKHONOVICH, I. A. The cadmium-tolerant pea (*Pisum sativum* L.) mutant SGECD<sup>1</sup> is more sensitive to mercury: assessing plant water relations. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 8 p. 2359-2369, 2015.
- BOLAN, N.; PARK, J.; ROBINSON, B.; NAIDU R, HUH K. Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. **Advance in Agronomy**, v. 112, n. 145-204. 2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**: Brasília, DF, n. 249, p. 81-84, 2009. Seção 1.
- BHARGAVA, A.; CARMONA, F. F.; BHARGAVA, M.; SRIVASTAVA, S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v. 105, p. 103-120, 2012.
- CAIRES, S. M.; FONTES, M. P. F.; FERNANDES, R.B.A.; NEVES, J. C. L.; Fontes R. L. F. Desenvolvimento de mudas de Cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, **35**: 1181-1188, 2011.
- CI, D.; JIANG, D.; DAI, T.; JING, Q.; CAO, W. Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. **Chemosphere** v. 77, n. 11, 1620-1625, 2009.
- CHAVES, L. H. G.; SOUZA, R. S. Crescimento, distribuição e acumulação de cádmio em plantas de *Jatropha curcas*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 286-291, 2014.
- CHANG, C. Y.; YU, H. Y.; CHEN, J. J.; LI, F. B.; ZHANG, H. H.; LIU, C. P. Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 3, p.1547-1560, 2014.
- CNCFlora. ***Virola surinamensis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: [http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Virola surinamensis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Virola%20surinamensis). Acesso em: 29 out 2017.
- CUNHA, K. P. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; PIMENTEL, R. M. M.; ACCIOLY, A. M. A.; SILVA, A. J. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1319-1328, 2008.

CURIE, C.; CASSIN, G.; COUCH, D.; DIVOL, F.; HIGUCHI, K.; LE JEAN, M.; MISSON, J.; SCHIKORA, A.; CZERNIC, P.; MARI S. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. **Annals of Botany**, v. 103, n. 1, p.1-11, 2009.

CRUZ, E. D.; BARROS, H. S. D. **Germinação de sementes de espécies amazônicas: ucuúba [*Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb.]**. Belém-Pa: Embrapa Amazônia Oriental (Comunicado Técnico, 273), 2016.

DAI, H.; SHAN, C.; JIA, G.; LU, C.; YANG, T.; WEI, A. Cadmium detoxification in *Populus x canescens*. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 950-955, 2013.

DAL CORSO, G.; MANARA, A.; FURINI, A. An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1117-1132, 2013.

DI BACCIO, D.; CASTAGNA, A.; TOGNETTI, R.; RANIERI, A.; SEBASTIANI, L. Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, p. 1693-1705, 2014.

DOMINGUEZ, M. T.; MARANON, T.; MURILLI, J. M.; SCHULIN, R. ROBINSON, B. H. Trace elements accumulation in woody plants of the Guadamar valley, SW Spain: a large – scale phytomanagement case study. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 50-59, 2008.

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Alleviation of Cadmium Toxicity in *Pisum sativum* L. Seedlings by Calcium Chloride. *Notulae Botanice Horti Agrobotanici*, v. 41, p. 157-168, 2013.

ELLOUMI, N.; ZOUARI, M.; CHAARI, L.; JOMNI, C.; ROUINA, B. B.; ABDALLAH, F. B. Ecophysiological responses of almond (*Prunus dulcis*) seedlings to cadmium stress. Institute of Botany, **Slovak Academy of Sciences**, v. 69, n. 5, p. 604-609, 2014.

FERNÁNDEZ, R.; BERTRAND, A.; REIS, R.; MOURATO, M. P.; MARTINS, L. L.; GONZÁLEZ, A. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. **Journal of Hazardous Materials**, v. 15, n. 244-245, p. 555-562, 2013.

GALLEGO, A. S. M.; PENA, L. B.; BARCIA, R. A.; AZPILICUETA, C. E.; IANNONE, M. F.; ROSALES, E. P.; ZAWOZNIK, M. S.; GROPPAA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 33-46, 2012.

GALUPPO, S.C.; CARVALHO, J. O. P. de. **Ecologia, manejo e utilização da *Virola surinamensis* Rol. (Warb.)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 38p.

GAO, W.; NAN, T.; TAN, G.; ZHAO, H.; TAN, W.; MENG, F.; LI, Z.; X, Q. L.; WANG, B. Cellular and Subcellular Immunohistochemical Localization and Quantification of Cadmium Ions in Wheat (*Triticum aestivum*). **Plos One**, v. 10, n. 5. 2015.

GUBRELAY, U.; AGNIHOTRI, R.K.; SINGH, G.; KAUR, R.; SHARMA, R. Effect of heavy metal Cd on some physiological and biochemical parameters of Barley (*Hordeum vulgare* L.). **International Journal of Agricultural Crop Science**, v. 5, p. 2743-2751, 2013.

GUPTA, D.; ABDULLAH. Toxicity of copper and Cadmium on germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) seeds. **Indian Journal Scientific Research**, v. 2, n. 3, p. 67-70, 2011.

GURGEL, E. S. C.; CARVALHO, A. C. M.; SANTOS, J. U. M.; SILVA, M. F. *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb. (Myristicaceae): aspectos yristicaceae): aspectos morfológicos do fruto, semente, germinação e plântula germinação e plântula. Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. **Ciências Naturais**, Belém, v. 1, n. 2, p. 37-46, 2006.

HAOUARI, C. C.; NASRAOUI, A. H.; BOUTHOUR, D.; HOUDA, M. D.; DAIEB, C. B.; MNAI, J.; GOUIA, H. Response of tomato (*Solanum lycopersicon*) to cadmium toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll content and photosynthesis rate. **African Journal of Plant Science**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2012.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ANEE, T. I.; FUJITA, M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 2, 249-268, 2017.

HE, J.; LI, H.; LUO, J.; MA, C.; LI, S.; QU, L. GAI, Y.; JIANG, X.; JANZ, D. POLLE, A.; TYREE, M.; LUO, Z-B. A Transcriptomic Network Underlies Microstructural and Physiological Responses to Cadmium in *Populus x canescens*. **Plant Physiology**, v. 162, p. 424-439, 2013.

HERNÁNDEZ, L. E.; SOBRINO-PLATA, J.; MONTERO-PALMERO, M. B.; CARRASCO-GIL, S.; FLORES-CÁCERES, M. L.; ORTEGA-VILLASANTE, C.; ESCOBAR, C. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloïd stress. **Journal of Experimental**, v. 66, n. 10, p. 2901-2911, 2015.

HIRUMA-LIMAA, C. A.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 406-409, 2009.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. Americas Regional Workshop (Conservation & Sustainable Management of Trees, Costa Rica, November 1996) 1998. *Virola surinamensis*. In: IUCN. Red list of threatened species. Version 2016.3. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/search>. Acesso em: 15 abr. 2017.

ISAURE, M. P.; HUGUET, S.; MEYER, CL.; CASTILLO-MICHEL, H.; TESTEMALE, D.; VANTELON, D.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VERBRUGGEN, N.; SARRET, G. Evidence of various mechanisms of Cd sequestration in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, the non-accumulator *Arabidopsis lyrata*, and their progenies by combined synchrotron-based techniques. **Journal of Experimental Botany Advance**, p. 1-14, 2015.

- ISMAIL, S.; KHAN, F.; IQBAL, Z. M. Phytoremediation: Assessing Tolerance of Tree Species Against Heavy Metal (Pb and Cd) Toxicity. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 6, p. 2181-2186, 2013.
- JAKOVLJEVIĆ, T.; BUBALO, M. C.; ORLOVIĆ, S.; SEDAK, M.; BILANDŽIĆ, N.; BROZINČEVIĆ, I.; REDOVNIKOVIĆ, I. R. Adaptive response of poplar (*Populus nigra* L.) after prolonged Cd exposure period. **Environmental Science Pollution Research Int.** v. 21, n. 5, p. 3792-37802, 2014.
- JARDIM, M. A. G.; MOTA, C. G. Biologia floral de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. (Myristicaceae). **Revista Árvore** [online]. v. 31, n.6, p.1155-1162. 2007.
- KATO, M. J.; YOSHIDA, M.; LOPES, N. P.; SILVA, D. B.; CAVALHEIRO, A. J. Uptake of Seeds Secondary Metabolites by *Virola surinamensis* Seedlings. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-5, 2012.
- KHAN, M. I. R.; IQBAL, N.; MASOOD, A.; MOBIN, M.; ANJUM, N. A.; KHAN, N. A. Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolism in cadmium challenged plants. **Plant Growth Regul.** v. 78, p. 1-11. 2016.
- KHAN, M. A.; KHAN, S.; KHAN, A.; ALAM, M. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. **Science of the Total Environment**, v.601–602, p. 1591-1605, 2017.
- KHAN, M. Z. H.; HASAN, M.R.; KHAN, M.; AKTAR, S.; FATEMA, K. Distribution of Heavy Metals in Surface Sediments of the Bay of Bengal Coast. **Journal of Toxicology**, v. 2017, p.1-7, 2017.
- LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. **Fitorremediação: Plantas como agentes de despoluição?** Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e meio ambiente, Curitiba, v. 17, p. 9-18, 2007.
- LIANG, X.; ZHANG, L.; NATARAJAN, S. K.; BECKER, D. F. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidant Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998-1011, 2013.
- LIU, S.-L.; YANG, R.-J.; MA, M.-D.; DAN, F.; ZHAO, Y.; JIANG, P.; WANG, M.-H. Effects of exogenous NO on the growth, mineral nutrient content, antioxidant system, and ATPase activities of *Trifolium repens* L. plants under cadmium stress. **Acta Physiology Plantarum**, v. 37, n. 1721, p. 1-17, 2015.
- LIU, H.; WANG, H.; MA, Y.; WANG, H.; SHI, Y. Role of transpiration and metabolism in translocation and accumulation of cadmium in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). **Chemosphere**, v. 144, p. 1960-1965, 2016.
- LONE MI, HE Z, STOFFELLA PJ, YANG X. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. **Journal of Zhejiang University Science B.** v. 9, n. 3, p. 210-220, 2008.
- LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULÍK, M.; WHITE, P. J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 1, p. 21-37, 2011.

MA, Y.; HE, J.; MA, C.; LUO, J.; LI, H.; LIU, T.; POLLE, A.; PENG, C.; LUO, Z. B. Ectomycorrhizas with *Paxillus involutus* enhance cadmium uptake and tolerance in *Populus* × *canescens*. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 3, p. 627-42. 2013.

MA, Y.; OLIVEIRA, R. S.; FREITAS, H.; ZHANG, C. Biochemical and Molecular Mechanisms of Plant-Microbe-Metal Interactions: Relevance for Phytoremediation. **Front Plant Science**, v. 7, n. 918, p. 1-19, 2016.

MACEDO, D.S.; ANDERSON, A.B. Early ecological changes associated with logging in an Amazon floodplain. **Biotropica**, v. 25, n. 2, p. 151-163, 1993.

MACNAIR, M. R.; TILSTONE, G.H, SMITH, S. E. 2000. **The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants**. In: Terry N, Banuelos G, eds. Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC, 235-250.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. das G. B.; ANDRADE, E. H. de A. **Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais**. Belém, PA: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2002. 173p.

MARMIROLI, M.; IMPERIALE, D.; MAESTRI, E.; MARMIROLI, M. The response of *Populus* spp. to cadmium stress: Chemical, morphological and proteomics study. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1333-1344, 2013.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SOARES, A. M.; GOMES, M. P.; MARTINS, G. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de Eucalipto expostas ao cádmio. **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 997-1006, 2011.

MEHES-SMITH, M.; NKONGOLO, K.; CHOLEWA, E. Coping Mechanisms of Plantstometal contaminated Soil. In: Environmental Changeand Sustainability. Steven, v.54, n. 90, 2013.

MYRISTICACEAE. In: **FLORA do Brasil 2020 em construção**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB19795>. Acesso em: 23 mar. 2017.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 199-216, 2010.

NAZAR, R.; IQBAL, N.; MASOOD, A.; KHAN, M. I. R.; SYEED, S.; KHAN, N. A. Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 1476-1489, 2012.

NEVES, E.J.M.; GOLÇALVES, E.M. **Aspectos silviculturais e nutricionais de *Virola surinamensis* (ROL.) Warb. plantada em latossolo amarelo da Amazônia Ocidental**. Comunicado Técnico EMBRAPA, v. 99, 2003.

NIKOLIĆ, N.; ZORIĆ, L.; CVETKOVIĆ, I.; PAJEVIĆ, S.; BORIŠEV, M.; ORLOVIĆ, S.; PILIPOVIĆ, A. Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus* × *euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. **iForest Biogeosciences & Forestry**, v. 10, n. 3, p. 635-644, 2017.

OLÁH, V.; HEPP, A. MÉSZÁROS, I. Comparative study on the sensitivity of turions and active fronds of giant duckweed (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) to heavy metal treatments. **Chemosphere**, v. 132, p. 40-46, 2015.

OLANIRAN, A. O; BALGOBIND, A.; PILLAY, B. Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10197-10228, 2013.

PÁL, M.; HORVÁTH, E.; JANDA, T.; PÁLDI, E.; SZALAI, G. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. **Journal Plant Nutritionna Soil Science**, v. 169, n. 2, p. 239-246, 2006.

PARMAR, P., KUMARI, N.; SHARMA, V. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. **Botanical Studies**, v. 54, n. 45, p.1-6, 2013.

PARROTTA, L.; GUERRIERO, G.; SERGEANT, K.; CAI, G.; HAUSMAN, J. F. Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. **Front Plant Science**, v. 6, n. 133, p. 1-16, 2015.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, v. 180, p. 169-181, 2011.

RAFATI, M.; KHORASANI, N.; MOATTAR, F.; SHIRVANY, A.; MORAGHEB, F.; HOSSEINZADEH, S. Phytoremediation Potential of *Populus Alba* and *Morus alba* for Cadmium, Chromium and Nickel Absorption from Polluted Soil. **International Journal Environmental Reseach**, v. n. 4, p.961-970, 2011.

RODRIGUES, W. A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazônica**, v. 10, n. 1, p. 1-127, 1980.

SHAH, K.; MANKAD, A.U.; REDDY, M.N. Cadmium accumulation and its effects on growth and biochemical parameters in *Tagetes erecta* L. **Journal Pharmacognosy Phytochemistry**, v. 6, p. 111-115, 2017.

SHARMA, S.; RANA, S.; THAKKAR, A.; BALDI, A.; MURTHY, R. S. R.; SHARMA, R. K. Physical, Chemical and Phytoremediation Technique for Removal of Heavy Metals. **Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases**, v. 1, n. 2, p. 1-15, 2016.

SINGH, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. **Front Plant Science**, v. 6, p. 1143, 2016.

SILVA, J. R. R.; FERNANDES, A. R.; SILVA JUNIOR, M. L.; SANTOS, C. R. C.; LOBATO, A. K. S. Tolerance mechanisms in *Cassia alata* exposed to cadmium toxicity – potential use for phytoremediation. *Photosynthetica*, p. 1-10, 2017.

SOLTI, Á., SÁRVÁRI, É., SZÖLLŐSI, E.; BRIGITTA, TÓTH, B.; MÉSZÁROS, I.; FODOR, F.; SZIGETI, Z. Stress hardening under long-term cadmium treatment is correlated with the

activation of antioxidative defence and iron acquisition of chloroplasts in *Populus*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 71, n. 9-10, p. 323-334, 2016.

SONG, Y.; JIN, L.; WANG, X. Cadmium absorption and transportation pathways in plants. **International Journal of Phytoremediation**, v. 19, n. 2 p. 133-141, 2016.

TAKAHASHI, R.; BASHIR, K.; ISHIMARU, Y.; NISHIZAWA, N. K.; NAKANISHI, H. The role of heavy-metal ATPases, HMAs, in zinc and cadmium transport in rice. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n.12, p. 1605–1607, 2012.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP; An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.161, n. 2, p. 105-121, 2009.

TRAN, T. A.; POPOVA, L. P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 1-13, 2013.

TODD, C. D. Allantoin Increases Cadmium Tolerance in *Arabidopsis* via Activation of Antioxidant Mechanisms. **Plant and Cell Physiology Advance**, v. 57, n. 12, p. 2485-2496. 2016.

TOMAS, M.; PAGANI, M. A.; ANDREO, C. S.; CAPDEVILA, M.; BOFILL, R.; ATRIAN, S. His-containing plant metallothioneins: comparative study of divalent metal-ion binding by plant MT3 and MT4 isoforms. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v.19, n. 7, p. 49-64, 2014.

TOŠIĆ, S.; ALAGIĆ, A.; DIMITRIJEVIĆ, M.; PAVLOVIĆ, A.; NUJKIĆ, M. Plant parts of the apple tree (*Malus* spp.) as possible indicators of heavy metal pollution. **Ambio**, v.45, n. 4, p. 501-512, 2015.

URAGUCHI, S.; KAMIYA, T.; SAKAMOTO, T.; KASAI, K.; SATO, Y.; NAGAMURA, Y.; YOSHIDA, A.; KYOZUKA, J.; ISHIKAWA, S.; FUJIWARA, T. Low-affinity cation transporter (OsLCT1) regulates cadmium transport into rice grains. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 108, n. 52, p. 20959-20964, 2011.

USHARANI, B.; VASUDEVAN, N. Root Exudates of *Cyperus alternifolius* in Partial Hydroponic Condition under Heavy Metal Stress. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 3, p. 294-300, 2017.

VACULÍK, M.; KONLECHNER, C.; LANGER, I.; ADLASSNIG, W.; PUSCHENREITER, M.; LUX, A.; HAUSER, M.T.; Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 117-126, 2012.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais na Amazônia, Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 3 ed. Belém, Brasil: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2010.

VEIGA, A.; ALBUQUERQUE, K.; ELINETE CORRÊA, M.; BRIGIDO, H.; SILVA E SILVA, J.; CAMPOS, M.; SILVEIRA, F.; SANTOS, L.; DOLABELA, M. *Leishmania*

*amazonensis* and *Leishmania chagasi*: In vitro leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) warb. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 68-73, 2017.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759-776, 2009.

YAMAGUCHI, N.; MORI, S.; BABA, K.; KABURAGI-YADA, S.; ARAO, T.; KITAJIMAB, N.; HOKURA, A.; TERADA, Y. Cadmium distribution in the root tissues of solanaceous plants with contrasting root-to-shoot Cd translocation efficiencies. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p. 198-206, 2011.

YAN, H.; FILARDO, F.; HU, X.; ZHAO, X.; FU, D. H. Cadmium stress alters the redox reaction and hormone balance in oilseed rape (*Brassica napus*L.) leaves. **Environmental Science Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 58-69. 2015.

YANG, Y.; LI, X.; YANG, S.; ZHOU, Y.; DONG, C.; REN, J.; SUN, X.; YANG, Y. Comparative Physiological and Proteomic Analysis Reveals the Leaf Response to Cadmium-Induced Stress in Poplar (*Populus yunnanensis*). PLoS ONE, v. 10, n. 9, 2015.

WANG, F.; WANG, M.; LIU, Z.; SHI, Y.; HAN, T.; YE, Y.; SUN, J.; ZHU, C. Different responses of low grain-Cd-accumulating and high grain-Cd-accumulating rice cultivars to Cd stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 261-269, 2015.

WANG, Y.; GU, C.; BAI, S.; SUN, Z.; ZHU, T.; ZHU, X.; GRIT, D. H.; TEMBROCK, L. R. Cadmium accumulation and tolerance of *Lagerstroemia indica* and *Lagerstroemia fauriei* (Lythraceae) seedlings for phytoremediation applications. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n. 11, p. 1104-1112, 2016.

WU, Z.; ZHAO, X.; SUN, X.; TAN, Q.; TANG, Y.; NIE, Z.; QU, C.; CHEN, Z. HU, C. Antioxidant enzyme systems and the ascorbate-glutathione cycle as contributing factors to cadmium accumulation and tolerance in two oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) under moderate cadmium stress. **Chemosphere**, v. 138, p. 526-536. 2015.

ZAYNEB, C.; BASSEM, K.; ZEINEB, K.; GRUBB, C. D.; NOUREDDINE, D.; HAFEDH, M.; AMINE, E. Physiological responses of fenugreek seedlings and plants treated with cadmium. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, n.14, p. 10679-10689, 2015.

ZHAO S, SHANG X, DUO L. Heavy metal uptake and leaching from polluted soil using permeable barrier in DTPA-assisted phytoextraction. **Environmental Science Pollution Research**, v. 22, n. 7, p. 5263-5270, 2015.

ZHOU, L.; ZHAO, YE, WANG, S. Cadmium transfer and detoxification mechanisms in a soil-mulberry-silkworm system: phytoremediation potential. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 18031-18039, 2015.

ZOUARI, M.; AHMED, C. B.; ELLOUMI, N.; BELLASSOUED, K.; DELMAIL, D.; LABROUSSE, P.; ABDALLAH, F. B.; ROUINA, B. B. Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea*L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 195-205, 2016.

## 2 Effect of cadmium on young plants of *Virola surinamensis*<sup>1</sup>

**Abstract.** The steady increase in cadmium (Cd) levels in the environment from anthropogenic actions has contributed to environmental degradation. *Virola surinamensis* is a forest species that has desirable characteristics such as deep and dense roots, relatively rapid growth and high biomass production to remedy contaminated environments by Cd. The aim of this study was to assess the physiological responses and the phytoextraction and tolerance capacity of young plants of *V. surinamensis* submitted to Cd concentrations. The experimental design was a completely randomized design with five Cd concentrations (0, 15, 30, 45 and 60 mg L<sup>-1</sup>) for 60 days. Leaf water potential ( $\Psi_{pd}$ ), stomatal conductance ( $g_s$ ) and transpiration ( $E$ ) reduced in plants exposed to Cd. Lower values of maximum photochemical efficiency of photosystem II ( $F_v/F_m$ ), electron transport rate ( $ETR$ ) and photochemical quenching coefficient ( $qP$ ) were accompanied by reduction of photosynthesis ( $A$ ) with increasing concentrations of Cd, although the non-photochemical quenching coefficient ( $NPQ$ ), and intercellular CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ) showed increase. Instantaneous water-use efficiency ( $A/E$ ), net photosynthesis to intercellular CO<sub>2</sub> concentration ratio ( $A/C_i$ ) and total chlorophyll (Chl) reduced with increasing levels of Cd. Cadmium concentrations increased in different plant tissues (root > stem > leaf). The tolerance index (TI) indicated that *V. surinamensis* presented medium and high tolerance to Cd. The results of bioconcentration factor (BCF) and translocation factor (TF) showed low plant efficacy in Cd phytoextraction and suggest that *V. surinamensis* may be promising for phytostabilization of Cd.

**Keywords:** Bioconcentration factor; photosystem II; phytostabilization.

---

<sup>1</sup>Artigo aceito na revista AoB Plants. Disponível em: <https://academic.oup.com/aobpla/advance-articles>

## 2. 1 Introduction

The constant increase in cadmium (Cd) levels in the environment from agricultural and industrial activities has contributed to the degradation and contamination of soils, surface water and groundwater (Ahmad *et al.* 2014). This has created a major worldwide concern, especially as it is a non-biodegradable and easily absorbed, translocated and accumulated element in plant tissues (Ali *et al.* 2013), making it highly bioavailable and therefore toxic even at relatively low concentrations (Bashir *et al.* 2015).

The symptoms of phytotoxicity by Cd in plants include a modification in the indices of chlorophyll *a*, *b* and total, resulting in significant reductions in photosynthetic activity (Elloumi *et al.* 2014; Hernandez *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015; Michel-Lopez *et al.* 2016; Zouari *et al.* 2016; Nikolić *et al.* 2017; Silva *et al.* 2017), especially due to the inhibition of photosystem II (PSII) (Di Baccio *et al.* 2014) by changing the potential yield of the photochemical reaction ( $F_v/F_m$ ) (Fernandez *et al.* 2013; Yang *et al.* 2015; Solti *et al.* 2016) and CO<sub>2</sub>-fixing key enzymes, such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO) (Tran and Popova 2013). In addition, Cd in plants affects the water relations, respiration (Olah *et al.* 2015), transpiration, stomatal conductance and intercellular CO<sub>2</sub> concentration (Elloumi *et al.* 2014; Song *et al.* 2016; Zouari *et al.* 2016; Nikolić *et al.* 2017).

In the Amazon, flooded ecosystems are constantly susceptible to contamination, as they are receptors for nutrients and organic and inorganic contaminants, including heavy metals (Khan *et al.* 2017). High concentrations of Cd in water and sediments of these areas were demonstrated in studies by Seyler and Boaventura (2003) and Oliveira *et al.* (2017). Among heavy metals, Cd is considered one of the most toxic. Thus, the demand for solutions to recover soils and aquifers contaminated by metals, among them the Cd (Zhao *et al.* 2015).

Phytoextraction is a promising phytoremediation technique and consists of the absorption of soil or water contaminants by the plant root and its translocation to shoot (Sharma *et al.* 2016). The success of this technique involving forest species on Cd removal depends on the higher accumulation capacity of the metal, high biomass production and plant tolerance (Nikolić *et al.* 2017). However, only some plants suitable for phytoextraction of Cd are hyperaccumulating, that is, they have superior capacity to extract, accumulate and tolerate high levels of the metal (Fan *et al.* 2011). These plants can accumulate  $>100 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  (dry weight) in the aerial part (Van der Ent *et al.* 2013).

Studies involving woody species native to the Amazon for phytoremediation of Cd are scarce. In the present study, *Swietenia macrophylla* (Fan *et al.* 2011) and *Cassia alata* (Silva *et al.* 2017) demonstrated a capacity to accumulate and tolerate Cd, while *Calophyllum brasiliense* (Pereira *et al.* 2017) presented compromised growth, with low accumulation and greater sensitivity to Cd. To identify tree species with a capacity for phytoextraction of Cd, they can serve to direct studies and programmes on phytoremediation for the preservation of natural areas and the recomposition of environments contaminated by these metals.

In this work, we consider *Virola surinamensis* (Ucuuba) as a forest species with a deep and dense root system, relatively rapid growth and high biomass production. These characteristics are considered desirable and effective for woody plants to remediate metal contaminated soils, such as Cd (Abdul Qados 2015). In addition, Ucuuba is widely distributed in Amazonian floodplain and igapo ecosystems, which are potentially subject to the presence of Cd. In addition, this species has been successfully used in reclamation programmes for degraded areas, including high concentrations of copper (Cu) and zinc (Zn) in the litter (Costa *et al.* 2017). Suggesting that *V. surinamensis* develops mechanism of tolerance to environments contaminated by heavy metals.

Considering that Cd tolerance is modulated by defence mechanisms and that no studies on the behaviour of *V. surinamensis* exposed to Cd have been found, we tested the hypothesis that young plants of *V. surinamensis* trigger different physiological strategies to tolerate environments contaminated by Cd. Thus, this study aimed to assess (i) the water potential, gas exchange and the fluorescence of chlorophyll *a* and (ii) Cd concentration in different plant organs, bioaccumulation, translocation, and the phytoextraction and tolerance capacity of young plants of *V. surinamensis* submitted to Cd concentrations.

## **2. 2 Methods**

### **2. 2. 1 Experimental site**

The experiment was conducted in a greenhouse at the Federal Rural University of Amazonia (UFRA) in Belem, State of Para, Brazil (01°27'21"S, 48°30'16"W), from 15 September 2017 to 14 November 2017. According to the climatic classification of Koppen, the climate is type Af (Tropical rainforest), with an annual average precipitation of 2921.7 mm,

average temperature of 25.9 °C, average relative humidity of 86.8% and wind speed of 1.35 m s<sup>-1</sup> (Ramos *et al.* 2009).

### 2. 2. 3 Plant material and growth condition

Seeds of *V. surinamensis* were collected in the area of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Eastern Amazon), located in Belem, State of Para, Brazil (01°26'44.2"S, 48°25'03.8"W). These seeds were sown in 5-L polyethylene trays containing sand and sterilized sawdust (1:1, v/v), and maintained under mean air temperature ( $T_{\text{air}}$ ) and relative air humidity (RH) of 28 °C and 90%. After emergence, the seedlings containing the first pair of eophylls were transplanted to 10-L polyethylene pots containing yellow latosol and poultry litter (3:1, v/v). The seedlings grown were in a greenhouse for 180 days, being irrigated daily to replace the water lost by evapotranspiration. Subsequently, the young plants were removed and their roots washed with deionized water and transferred to 5-L Leonard pots containing sterilized and washed sand and 800 mL of nutrient solution of Sarruge (1975), replaced weekly and constituted of ( $\mu\text{M}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 400;  $\text{KNO}_3$ , 2000;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2000;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 800;  $\text{FeEDTA}$ , 400;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 400;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 400;  $\text{ZnCl}_2$ , 400;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 400; and  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 400. The pH was maintained at  $5.9 \pm 0.2$  using HCl and NaOH. The ionic strength was initiated in 25% (10 days) and then increased to 50% (35 days), remaining for a period of acclimatization of 45 days.

### 2. 2. 4 Leaf water potential, leaf gas exchange and total chlorophyll

Leaf water potential ( $\Psi_{\text{pd}}$ ) was determined in the morning between 0430 and 0530 h, using the Scholander's pressure bomb (m 670, PMS Instrument Co., Albany, OR, USA), as described by Pinheiro *et al.* (2008). The third leaf from apices was used as sample.

The variables net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A$ ), stomatal conductance to water vapour ( $g_s$ ), transpiration ( $E$ ), intercellular CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ), ratio of the net photosynthesis and intercellular CO<sub>2</sub> concentration ( $A/C_i$ ) and instantaneous water-use efficiency (WUE, calculated as the ratio between  $A$  and  $E$ ) were assessed using a portable infrared gas analyzer (LI-6400XT, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, NE, USA) equipped with a blue/red light source (LI-6400-02B, LI-COR) under a photosynthetically active radiation (PAR) flux of 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and CO<sub>2</sub> flux of 400 ppm (Silvestre *et al.* 2017). The assessments of gas exchanges

were carried out between 0900 and 1100 h, representing the daytime period in which photosynthesis reaches the maximum values, as determined from the diurnal curves of leaf gas exchanges. The measurements were always performed in completely expanded single sheets, located in the third node counted from the apex.

The total chlorophyll content (Chl) was determined using a portable chlorophyll meter (SPAD 502-plus, Konica Minolta, Osaka, Japan), with readings taken on the third adult leaf counted from the apex at three points on each side of the midrib of the adaxial leaf face (Jesus and Marrenco 2008). The results were expressed in SPAD (Soil Plant Analysis Development) index.

### 2. 2. 5 Fluorescence of chlorophyll *a*

The fluorescence of chlorophyll *a* was determined on the third adult leaf, counted from the apex, using the LI-6400XT (LI-COR Biosciences Inc., Lincon, NE, USA). Leaves adapted to the dark for 30 min were illuminated with a weak pulse of modulated radiation to obtain the initial fluorescence ( $F_0$ ). A saturating white light pulse of  $6.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  was applied for 0.8 s to ensure maximum fluorescence emission ( $F_m$ ). In the dark-adapted samples, the maximum photochemical efficiency of PSII was estimated by the ratio between variable and maximum fluorescence [ $F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$ ]. Saturating white light pulses were applied to achieve the maximum fluorescence ( $F'_m$ ). The actinic light was then switched off and the far-red radiation switched on to measure  $F_0$  adapted to the light ( $F'_0$ ). The capture efficiency of excitation energy by open PSII reaction centres ( $F'_v/F'_m$ ) was estimated as the ratio  $(F'_m - F'_0)/F'_m$ . The photochemical quenching coefficient ( $qP$ ) was calculated as  $qP = (F'_m - F_s)/(F'_m - F'_0)$  and the non-photochemical quenching coefficient ( $NPQ$ ) was determined from the equation of Stern–Volmer [ $NPQ = (F_m/F'_m) - 1$ ] (Krause and Weis 1991). The actual quantum yield of PSII electron transport ( $\Phi_{PSII}$ ) was calculated as  $(F'_m - F_s)/F'_m$  (Genty *et al.* 1989), where  $F_s$  is the steady state fluorescence. Electron transport rate ( $ETR$ ) was calculated as  $ETR = \Phi_{PSII} \times PPFD \times f \times \alpha$ , where  $PPFD$  is the photosynthetic photon flux density,  $f$  is a factor that contributes to energy partitioning between PSII and PSI and is assumed to be 0.5, indicating that the excitation energy is equally distributed between the two photosystems, and  $\alpha$  is the leaf absorbency by the photosynthetic tissues and is assumed to be 0.84 (Maxwell and Johnson 2000).

### 2. 2. 6 Cadmium analysis

Cadmium analysis was processed in triplicate according to the methodology described by Miyazawa *et al.* (2009), with adaptations. The dry matter (0.5 g) of each sample was digested in a digester tube with 8 mL of nitric acid solution (HNO<sub>3</sub>) + perchloric acid (HClO<sub>4</sub>) (3:1). After cooling, the solution in the tube was filtered and diluted with deionized water to a final volume of 50 mL. Cadmium contents were determined in this solution by atomic absorption spectrometry (Thermo Scientific ICE 3000).

### 2. 2. 7 Tolerance index

The tolerance index (TI) was determined to assess the plant ability to develop in the presence of Cd. The TI for Cd concentrations and for each plant organ was calculated according to Wilkins (1957), in which TI values can range from 0 (maximum sensitivity) to 1 (maximum tolerance).

$$TI = \frac{DMP_{solution\ with\ Cd\ (mg)}}{DMP_{control\ solution\ (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

where *DMP* solution with Cd is the dry mass of the plant in the solution with Cd and *DMP* control solution is the dry mass of the plant in the control solution.

### 2. 2. 8 Bioconcentration and translocation factor

To assess Cd phytoextraction capacity in *V. surinamensis*, the bioconcentration (BCF) and translocation factor (TF) were calculated at the end of the experiment, as in Fan *et al.* (2011).

$$BCF = \frac{C_{plant}}{C_{solution}} \quad (2)$$

where  $C_{plant}$  is the sum of the concentration of Cd (mg kg<sup>-1</sup>) in the plant organs (root, stem and leaves) and  $C_{solution}$  is the metal concentration of the nutrient solution (mg L<sup>-1</sup>).

$$FT = \frac{C_{aerial\ parte}}{C_{root}} \quad (3)$$

where  $C_{aerial}$  part is the sum of the concentration of Cd ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in plant organs (stem and leaves) and  $C_{root}$  is the concentration of the metal in the root of the plant ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

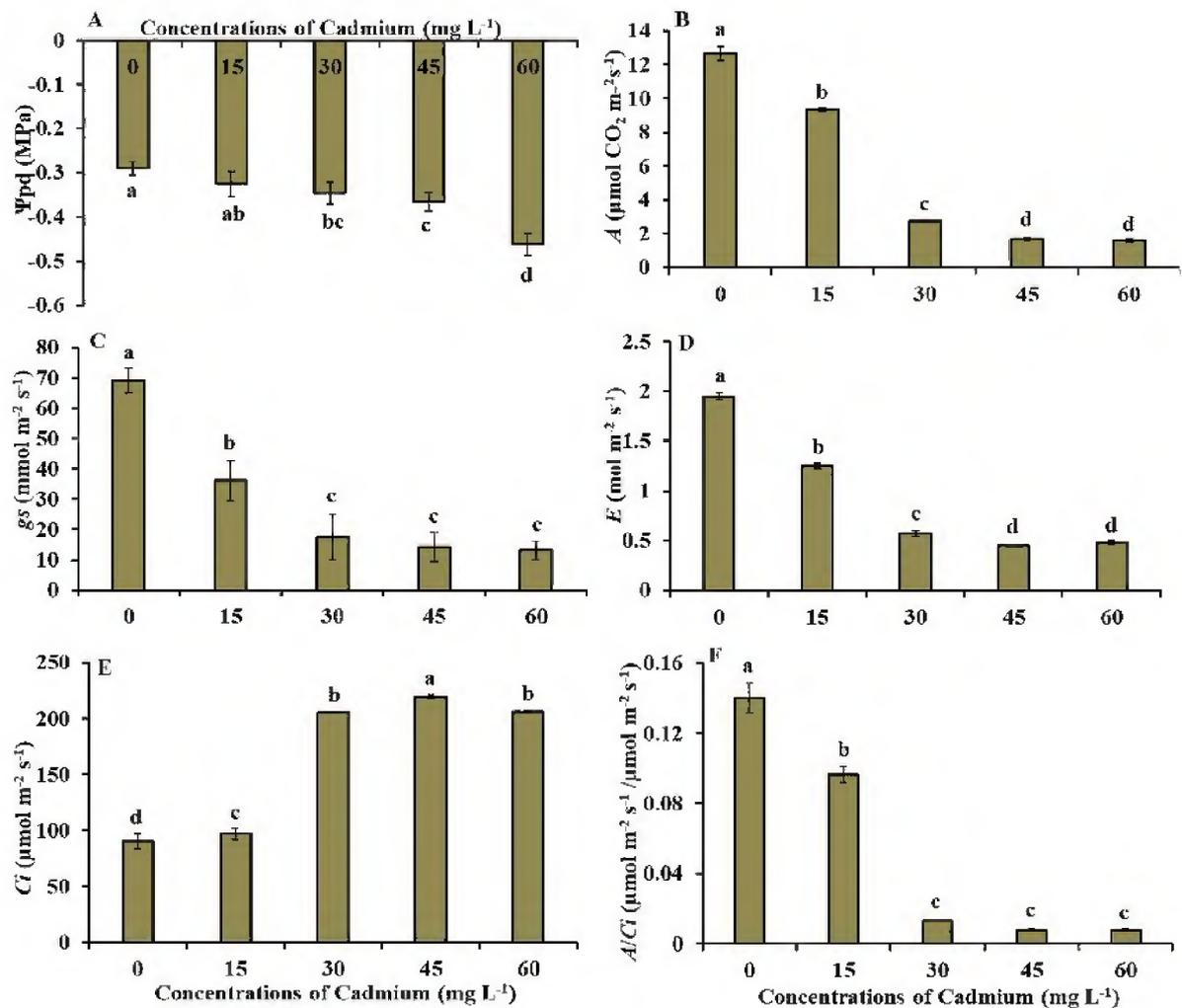
## 2. 2. 9 Data analysis

The experimental data were assessed for the normality and homogeneity of variances by the Shapiro–Wilk and Bartlett tests, respectively. For parametric variables, the means of treatments were submitted to PROC GLM, *post hoc* Tukey’s HSD test and correlation between variables by the PROC CORR linear of Pearson using the software SAS 9.1.3 (SAS 2007). For non-parametric variables, the data were assessed by the Kruskal–Wallis test with Bonferroni correction by the software RStudio version 1.1.383. The experimental data of all analyses were assessed at 5% significance.

## 2. 3 Results

### 2. 3. 1 Effect of Cd on water potential, gas exchange and total chlorophyll

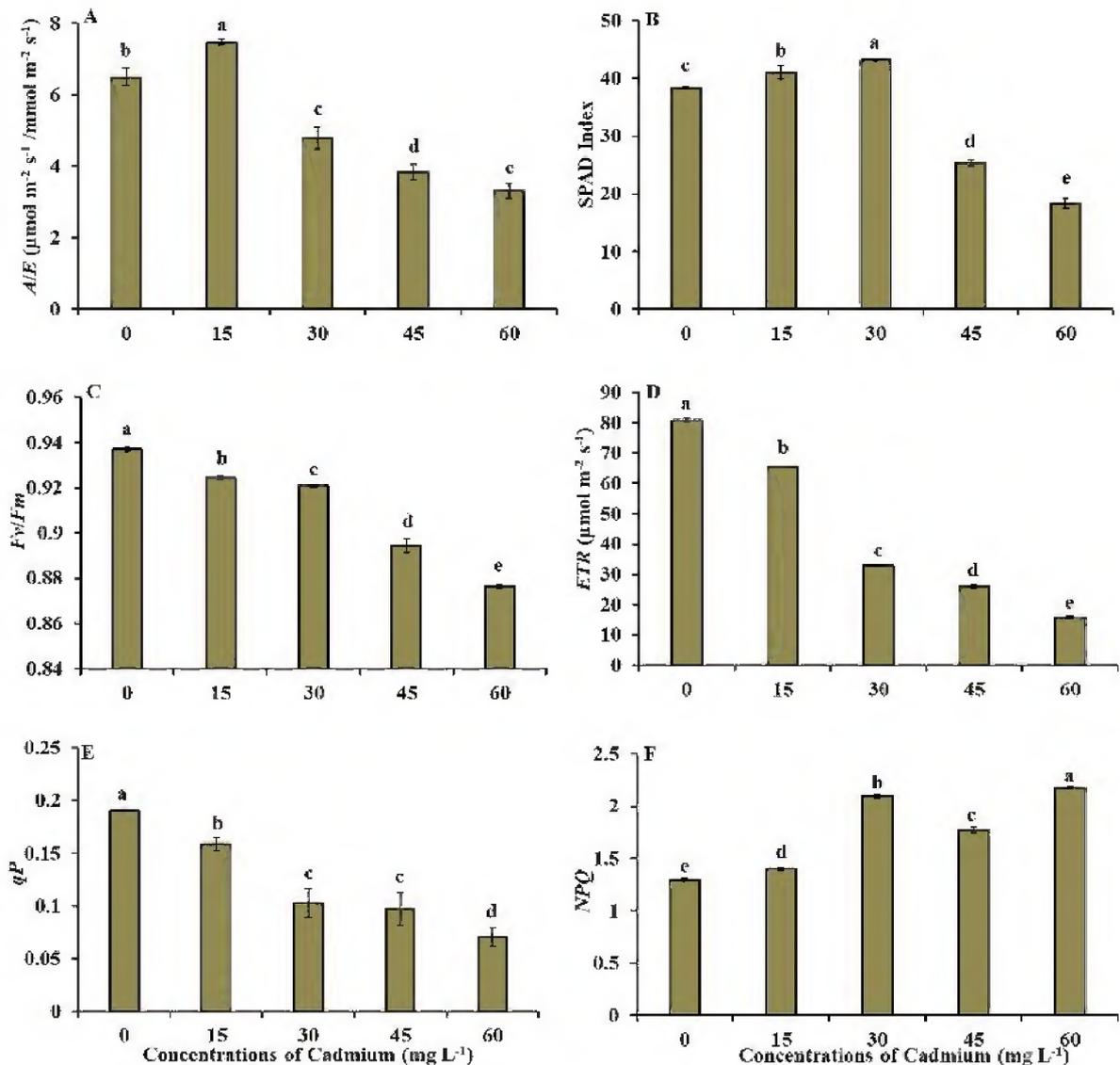
The  $\Psi_{pd}$ , gas exchange variables ( $A$ ,  $g_s$ ,  $E$ ,  $C_i$ ,  $A/C_i$  and  $A/E$ ) and total chlorophyll content (SPAD index) were significantly affected by exposure to Cd (Figs 1, 2 and Supporting Information-Appendix S1). The  $\Psi_{pd}$  reduced from  $-0.29$  MPa (control) to  $-0.46$  MPa (concentration of  $60 \text{ mg L}^{-1}$  of Cd) (Fig. 1A). Lowest values of net  $\text{CO}_2$  assimilation ( $1.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), stomatal conductance to water vapour ( $13.0 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) and transpiration ( $0.48 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) were obtained in concentration of  $60 \text{ mg L}^{-1}$  of Cd (Fig. 1B, C, D). Intercellular  $\text{CO}_2$  concentration increased from  $90.6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (control) to  $206.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (concentration of  $45 \text{ mg L}^{-1}$  of Cd) (Fig. 1E). The  $A/C_i$  ratio decreased from  $0.13 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (control) to  $0.007 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (concentration of  $60 \text{ mg L}^{-1}$  of Cd) (Fig. 1F). Water-use efficiency ( $A/E$ ) reached the lowest value ( $3.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  in concentration of  $60 \text{ mg L}^{-1}$  of Cd) (Fig. 2A). Total chlorophyll content (SPAD index) ranged from 38.3 (control) to 18.2 (concentration of  $60 \text{ mg L}^{-1}$  of Cd) (Fig. 2B).



**Figure 1.** (A) Predawn water potential ( $\Psi_{pd}$ ), (B) net photosynthetic rate ( $A$ ), (C) stomatal conductance ( $g_s$ ), (D) transpiration ( $E$ ), (E) internal CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ) and (F) net photosynthesis to intercellular CO<sub>2</sub> concentration ratio ( $A/C_i$ ) in young plants of *V. surinamensis* exposed to five concentrations of cadmium (0, 15, 30, 45 and 60 mg). Different letters for concentrations of cadmium in solution indicate significant differences in the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SD,  $n = 7$ .

### 2. 3. 2 Effect of Cd on the fluorescence of chlorophyll *a*

The fluorescence of chlorophyll *a* parameters were significantly affected by exposure to Cd (Fig. 2).  $F_v/F_m$  index decreased from 0.93 (control) to 0.87 (concentration of 60 mg L<sup>-1</sup> of Cd) (Fig. 2C).  $ETR$  and  $qP$  reduced from 80.8 and 0.19 (control) to 15.9 and 0.07 (concentration of 60 mg L<sup>-1</sup> of Cd), respectively (Fig. 2D and E).  $NPQ$  increased from 1.3 (control) to 2.17 (concentration of 60 mg L<sup>-1</sup> of Cd) (Fig. 2F).



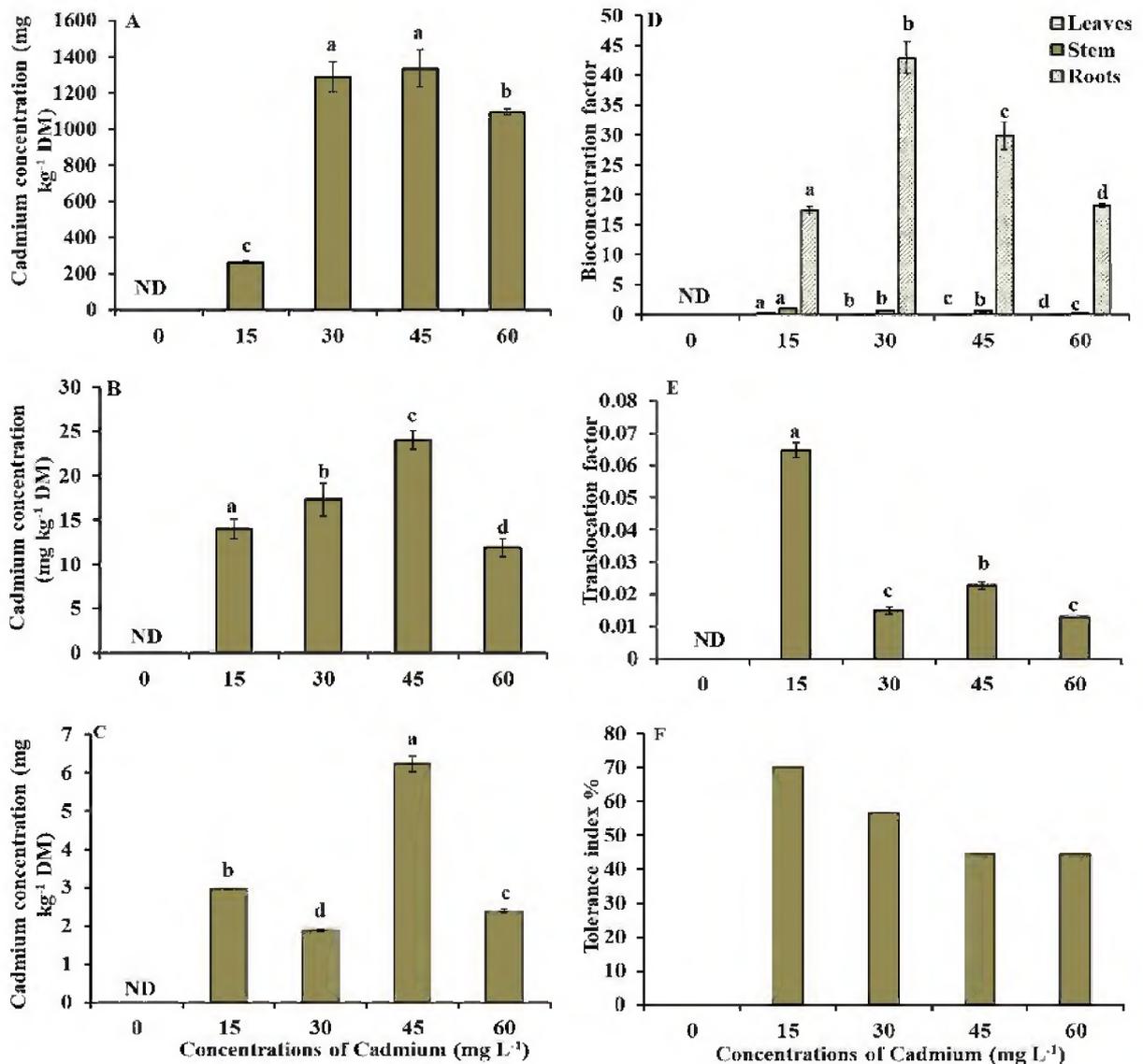
**Figure 2.** (A) Instantaneous water-use efficiency ( $A/E$ ), (B) total chlorophyll (SPAD index), (C) maximum photochemical efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ), (D) electron transport rate ( $ETR$ ), (E) photochemical quenching coefficient ( $qP$ ), and (F) non-photochemical quenching coefficient ( $NPQ$ ) in young plants of *V. surinamensis* exposed to five concentrations of cadmium (0, 15, 30, 45 and 60 mg). Different letters for concentrations of cadmium in solution indicate significant differences in the Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SD,  $n = 7$

### 2. 3. 3 Concentration of Cd in different tissues

The amount of Cd in the roots and shoot of *V. surinamensis* increased as Cd concentrations increased in the nutrient solution (Fig. 3), being the root system the plant tissue that promoted a higher Cd accumulation, with the highest value of 1333.5 mg kg<sup>-1</sup> DM at the concentration of 45 mg L<sup>-1</sup> of Cd (Fig. 3A). In the stem and leaves, the highest values of Cd (23.9 and 6.2 mg kg<sup>-1</sup> DM, respectively) were obtained at the concentration of 45 mg L<sup>-1</sup> of Cd (Fig. 3B and C). According to Fig. 3, *V. surinamensis* presented Cd contents in the different plant tissues, as the order root > stem > leaf.

## 2. 3. 4 BCF, TF and TI

In the plants of *V. surinamensis*, BCF was higher at the concentrations of 30 mg L<sup>-1</sup> of Cd (42.93) and 45 mg L<sup>-1</sup> of Cd (29.95) (Fig. 3D). The maximum value of TF (0.065) and TI (70.1%) occurred at the concentration of 15 mg L<sup>-1</sup> of Cd (Fig. 3E, F and Supporting Information-Appendix S2).



**Figure 3.** (A) Cadmium concentration in the roots, (B) cadmium concentration in the stem, (C) cadmium concentration in the leaves, (D) bioconcentration factor, (E) translocation factor and (F) tolerance index in young plants of *V. surinamensis* exposed to five concentrations of cadmium (0, 15, 30, 45 and 60 mg). ND = not detected; DM = dry mass. Different letters for concentrations of cadmium in solution indicate significant differences in the Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ). Mean  $\pm$  SD,  $n = 7$

## 2. 4 Discussion

The data of  $\Psi_{pd}$  (Fig. 1A) in young plants of *V. surinamensis* submitted to Cd concentrations indicated that, at a low variation in  $\Psi_{pd}$  value, the symptoms of water deficit began, such as the reduction of  $g_s$  (Fig. 1C). The decrease of  $g_s$  (Fig. 1C) in *V. surinamensis* submitted to Cd exposure is probably due to stomatal closure, reduction of stomata density, decrease in pore size (Elloumi *et al.* 2014) and decrease in stomatal size (Di Baccio *et al.* 2014; Nikolić *et al.* 2017). Reduction of stomatal conductance related to water potential was observed in *Eucalyptus camaldulensis* exposed to Cd (Marques *et al.* 2011).

According to Nikolić *et al.* (2017), changes in the stomata promote concomitant limitations in the diffusion of water vapour and CO<sub>2</sub> into the cells and influence carbon assimilation and loss of the photosynthetic activity of the plant submitted to the presence of Cd. On the other hand, the reduction of  $g_s$  in young plants of *V. surinamensis* may have been a strategy of tolerance to Cd to reduce its absorption and maintain the amount of water in the tissues for plant survival. Reduction of  $g_s$ ,  $E$  and  $A$  were also observed in other tree species exposed to Cd (Nikolić *et al.* 2017; Pereira *et al.* 2017).

Lowest levels of total chlorophyll in *V. surinamensis* exposed to Cd (Fig. 2B) suggest alteration in chlorophyll biosynthesis or degradation. Cadmium influences chlorophyll biosynthesis because the metal affects water relations (Olah *et al.* 2015), limits the absorption and transport processes and utilization of Mg<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> (He *et al.* 2013; Di Baccio *et al.* 2014; Huang *et al.* 2015) and/or replaces Mg<sup>2+</sup> in chlorophyll molecules, causing a disturbance of glutathione availability and inhibiting in activity of  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase enzyme (ALA-D) and function of proto-chlorophyll reductase (Parmar *et al.* 2013). Decrease in chlorophyll levels was also observed in other studies with arboreal species submitted to Cd (Yang *et al.* 2015; Nikolić *et al.* 2017).

The reduction in chlorophyll content by increased degradation or decreased biosynthesis may have been reflected in significant reductions in photosynthetic activity of plants under stress by Cd (Elloumi *et al.* 2014; Hernandez *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015; Michel-Lopez *et al.* 2016; Zouari *et al.* 2016; Nikolić *et al.* 2017; Silva *et al.* 2017).

The reduction of  $g_s$  by limiting the CO<sub>2</sub> influx in leaves may influence the reduction of photosynthetic rate (Di Baccio *et al.* 2014). Thus, the reduction of  $g_s$  would result in low mesophilic conductance to CO<sub>2</sub> and consequently in lower chloroplastidic CO<sub>2</sub>, justifying the decrease of photosynthesis in *V. surinamensis* (Fig. 1B). The influence of  $g_s$  on decrease of

photosynthesis in plants exposed to Cd was also observed in *C. brasiliense* (Pereira *et al.* 2017). However, the increase in intercellular CO<sub>2</sub> concentration ( $C_i$ ) (Fig. 1E) with concomitant reductions of  $g_s$  and  $A$  (Fig. 1C and B) in plants exposed to Cd suggests that decline of photosynthetic activity in *V. surinamensis* also occurs by non-stomatal limitation. The same behaviour was observed in other tree species (Nikolić *et al.* 2017). It has been reported that CO<sub>2</sub> fixation in chloroplast stroma may be affected by inhibition of enzymes of Calvin cycle (Li *et al.* 2015), such as RuBisCO (Parmar *et al.* 2013; Tran and Popova 2013; Yang *et al.* 2015), contributing to lower  $A$  values of plant. The inhibition of enzymes related to biochemical stage of photosynthesis, caused by exposure of plants to Cd, may have impaired the fixation and assimilation of photosynthetic CO<sub>2</sub> and result in increase of  $C_i$ . In addition, the reduction of instantaneous efficiency of carboxylation ( $A/C_i$ ) (Fig. 1F) in plants exposed to Cd reinforces the indication that high concentrations of metal may result in damage to biochemical aspects of photosynthesis causing losses in CO<sub>2</sub> assimilation rate.

Changes in stomatal opening, water balance and photosynthetic activity are known damages in plants exposed to Cd (Di Bacio *et al.* 2014). In this study, the combined effect of  $\Psi_{pd}$  and  $g_s$  reduction on plants exposed to Cd may have been the cause on reduction of  $E$  (Fig. 1D). The influence of stomatal conductance on transpiration of plants submitted to Cd concentrations was observed in other tree species (Nikolić *et al.* 2017). The reduction of transpiration in plants exposed to Cd can limit the transport of metal from roots to leaves and reduce the damage caused by photosynthetic apparatus (Gratao *et al.* 2015). Thus, the decrease of  $E$  in *V. surinamensis* in presence of Cd may have been a strategy of tolerance to metal for protection, maintenance or reduction of damages in photosystem components, in an attempt to plant survive.

The reduced values of WUE ( $A/E$ ) (Fig. 2A) in plants submitted to Cd are due to the low photosynthetic rate per unit of water loss in the plants, in which *V. surinamensis* showed a higher sensitivity to higher Cd concentrations. According to Pajević *et al.* (2009), the reduction of WUE in plants exposed to Cd occurs due to the inhibition of the absorption and transport of water, which causes changes in water balance and hence a low production of photoassimilates. Different behaviour was observed in *C. brasiliense* exposed to Cd (Pereira *et al.* 2017).

The effects of Cd stress on chlorophyll fluorescence parameters ( $F_v/F_m$ ,  $qP$ ,  $ETR$  and  $NPQ$ ) (Fig. 2) may indicate an inhibition of the activity of PSII, resulting in changes in the photosynthetic rate of plants (Pajević *et al.* 2009; Tang *et al.* 2015). The reduction of  $F_v/F_m$  values (Fig. 2C) in plants exposed to Cd were followed by a reduction of photosynthesis at a

carboxylation level, evidenced by an increase in  $C_i$  (Fig. 1E). The results obtained in present study in relation to chlorophyll fluorescence were evidenced in other tree species (Pietrini *et al.* 2009; Di Baccio *et al.* 2014; Ge *et al.* 2015).

Although the reduction of  $A$  was followed by a significant decrease in  $Fv/Fm$  and  $ETR$  (Fig. 2C and D) in plants submitted to Cd, the effect of the metal may not have been sufficient to cause damage to photosystem II. This occurs because plants that present  $Fv/Fm$  values close to 0.85 are considered healthy (Kalaji and Guo 2008; Nikolić *et al.* 2015), i.e. the maximum photochemical quantum efficiency of PSII was not affected by Cd, indicating the stability of thylakoid structure and the efficient flux of electrons through PSII, but with disturbances at a carboxylation level (Pajević *et al.* 2009). According to Nikolić *et al.* (2015), other disturbances, in addition to those in thylakoid and chloroplast membranes, may be involved in the reduction of photosynthesis in plants exposed to heavy metals. On the other hand, significant reductions in  $Fv/Fm$ , associated with low  $qP$  values (Fig. 2E), may reduce the photosynthetic efficiency of plants, as suggested by Pietrini *et al.* (2009) for poplar clones and Huang *et al.* (2015) for *Cornus controversa* treated with Cd.

The reduction of  $qP$  (Fig. 2E) and increase of  $NPQ$  (Fig. 2F) showed that the damage to PSII induced by a high Cd dose was not enough to cause the photoinactivation, with PSII being protected by an effective dissipation mechanism of heat to avoid the photoinhibition at the reaction centres (Li *et al.* 2015; Tang *et al.* 2015), these findings are corroborated by Ge *et al.* (2015).

Concentrations of 5-10  $\mu\text{g Cd g}^{-1}$  of DM in leaf tissue have been reported to be toxic to most plants (White and Brown 2010). Thus, tolerant plants are often exclusionary, limiting the entry and translocation of heavy metals from the root to shoot (Gallego *et al.* 2012). The high amount of Cd accumulated in the root of *V. surinamensis* (Fig. 3A) indicates the ability to absorb the Cd of the solution and retain the metal especially in the roots, which suggests exclusion and chelation of the metal in the cellular and subcellular compartments of the root system. This may have contributed to a restricted Cd transport from root to the shoot of plants, being a strategy to protect the photosynthetic apparatus, as well as the higher capacity of tolerance of the plant to Cd (Dai *et al.* 2013). The highest concentration of Cd in root was observed in other tree species (Nikolić *et al.* 2017; Pereira *et al.* 2017). Cadmium retention in roots occurs because the metal binds to functional groups, such as thiol, present in the cell wall components of plants (Mehes-Smith *et al.* 2013) and in other compounds such as glutathione (Hasanuzzaman *et al.* 2017), metallothioneins and phytochelatins (Hernandez *et al.* 2015).

Some of these compounds were observed in cell wall of root system of plants exposed to Cd (Fernandez *et al.* 2014), suggesting that cell wall of *V. surinamensis* root system may have functioned as a barrier to Cd translocation, justifying the higher concentration of metal in root. This is because, at least in part, the lignification can make the cell wall less penetrable, forming a barrier against the Cd influx or even bonding with the metal (Parrota *et al.* 2015).

The phytoextraction capacity can be evaluated by BCF and TF. The BCF evaluates the efficiency of the plant in accumulating metal in relation to the soil solution, while the TF demonstrates the ability of the plant to transport metal from root to shoot (Fan *et al.* 2011). Bioconcentration factor and TF, in aerial tissues of the plant,  $> 1.0$  are good indicators of the phytoextraction capacity of Cd (Dai *et al.* 2011). With the exception of Cd hyperaccumulating plants that have BCF and TF  $> 1$  and accumulate  $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$  DM of Cd in shoot, most plants have BCF  $< 1.0$  (Van der Ent *et al.* 2013). In this study, the BCF of the aerial part and the TF  $< 1.0$  (Fig. 3D and E) indicate that *V. surinamensis* has low capacity of phytoextraction of Cd and do not belong to the group of hyperaccumulators of this metal. On the other hand, values of BCF and TF  $< 1$  characterize species of metal phytostabilizing plants (Masarovičova *et al.* 2010). These plants accumulate more heavy metals from the substrate in their roots, but restrict their transport and entry into the aerial parts (Malik and Biswas 2012; Hosman *et al.* 2017). In this study, the results of BCF and TF (Fig. 3D and E) indicate the ability of the plant to bioconcentrate the Cd in the root, suggesting that *V. surinamensis* develop mechanisms to accumulate the metal in the root, being able to be effective for phytostabilization Cd. The values of BCF and TF in *V. surinamensis* are in agrément with those obtained in other studies (Michel-Lopez *et al.* 2016; Nikolić *et al.* 2017).

The tolerance of *V. surinamensis* to Cd, estimated by TI, based on the total dry mass of the plants, was similar to the other tree species (Wang *et al.* 2016; Nikolić *et al.* 2017). According to the scheme proposed by Lux *et al.* (2004), in relation to the tolerance index, plants may have high tolerance (TI  $> 60$ ), medium tolerance (TI between 0.35 and 60) and low tolerance (TI  $< 0.35$ ). The results obtained in this work in relation to TI (Fig. 3F) indicate that *V. surinamensis* presente medium and high tolerance to Cd.

## 2. 5 Conclusion

In this study, we demonstrated that changes in  $\Psi_{pd}$ ,  $g_s$  and  $E$  in *V. surinamenses* exposed to Cd may have limited the transport of metal from roots to leaves.

The results of chlorophyll and gas exchange fluorescence parameters suggest that decrease of net CO<sub>2</sub> assimilation in *V. surinamensis* is caused by stomatal limitations and changes in PSII with increasing Cd concentration.

The results of BCF and TF demonstrate low plant efficacy in Cd phytoextraction and suggest that *V. surinamensis* may be promising for Cd phytostabilization purposes.

### **Sources of Funding**

This study was financed in part by the Coordination of the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil (CAPES), Finance Code 001.

### **Conflict of Interest**

None declared.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to the Group of Studies on Biodiversity in Upper Plants of the Federal Rural University of Amazonia for the collaborations of researchers.

### **Supporting Information**

The following additional information is available in the online version of this article—

**Appendix S1.** Data used for leaf water potential, leaf gas exchange, total chlorophyll and fluorescence of chlorophyll *a*.

**Appendix S2.** Data used for bioconcentration factor, translocation factor and tolerance index.

### **Literature Cited**

Abdul Qados, AMS. 2015. Phytoremediation of PB and CD by native tree species grown in the Kingdom of Saudi Arabia. *India Journal Scientific Research and Technology* **3**: 22-34.

- Ahmad I, Akhtar MJ, Ahmad ZZ, Naveed M, Mitter B, Sessitsch A. 2014. Cadmium-tolerant bacteria induce metal stress tolerance in cereals. *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 11054-11065.
- Ali H, Khan E, Sajad MA. 2013. Phytoremediation of heavy metals concepts and applications. *Chemosphere* **91**: 869-881.
- Bashir H, Qureshi MI, Ibrahim MM, Iqbal M. 2015. Chloroplast and photosystems: Impact of cadmium and iron deficiency. *Photosynthetica* **53**: 1-15.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, **249**: 81-84, 2009.
- Costa BC, Suzuki PM, Martins WBR, Andrade VMS, Oliveira FA. 2017. Dinâmica da massa seca e propriedades químicas da liteira em *Virola surinamensis* e floresta sucessional na Amazônia oriental. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* **12**: 23-28.
- Dai ZY, Shu WS, Liao, B, Wan CY, Li JT. 2011. Intraspecific variation in cadmium tolerance and accumulation of a high-biomass tropical tree *Averrhoa carambola* L.: implication for phytoextraction. *Journal Environmental Monitoring* **13**: 1723-1729.
- Dai H, Shan C, Jia G, Lu C, Yang T, Wei A. 2013. Cadmium detoxification in *Populus x canescens*. *Turkish Journal of Botany* **37**: 950-955.
- Di Baccio D, Castagna A, Tognetti R, Ranieri A, Sebastiani L. 2014. Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. – *Journal Plant Physiology*. **171**: 1693-1705.
- Elloumi N, Zouari M, Chaari L, Jomni C, Rouina BB, Abdallah FB. 2014. Ecophysiological responses of almond (*Prunus dulcis*) seedlings to cadmium stress. *Biologia* **69**: 604-609.
- Fan KC, Hsi HC, Chen CW, Lee HL, Hseu ZY. 2011. Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedlings for phytoextraction applications. *Journal Environmental Manage* **92**: 2818-2822.
- Fernández R, Bertrand A, Reis R, Mourato MP, Martins LL, González A. 2013. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. *Journal of Hazardous Materials* **244**: 555-562.
- Fernández R, Fernández-Fuego D, Bertrand A, González A. 2014. Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: Role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry*. **78**: 63-70.

- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP, Zawoznik MS, Groppaa MD, Benavides MP. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* **83**: 33-46.
- Ge W, Jiao Y, Zou J, Jiang W, Liu D. 2015. Ultrastructural and Photosynthetic Response of *Populus* 107 Leaves to Cadmium Stress. *Polish Journal of Environmental Studies* **24**: 519-527.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**: 87-92.
- Gratão PL, Monteiro CC, Tezotto T, Carvalho RF, Alves LR, Peters LP, Azevedo RA. 2015. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *Biometals* **28**: 803-16.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M. 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology Molecular Biology Plants* **23**: 249-268.
- He J, Li H, Luo J, Ma C, Li S, Qu L, Gai Y, Jiang X, Janz D, Polle A, Tyree M, Luo ZB. 2013. A Transcriptomic Network Underlies Microstructural and Physiological Responses to Cadmium in *Populus x canescens*. *Plant Physiol* **162**: 424-439.
- Hernández LE, Sobrino-Plata J, Montero-Palmero MB, Carrasco-Gil S, Flores-Cáceres ML, Ortega-Villasante C, Escobar C. 2015. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloïd stress. *Journal of Experimental Botany* **66**: 2901-2911.
- Hosman ME, El-Feky SS, Mohamed MI, Shaker EM. 2017. Mechanism of Phytoremediation Potential of Flax (*Linum usitatissimum* L.) to Pb, Cd and Zn. *Asian Journal of Plant Science and Research* **7**: 30-40.
- Huang X, Jiang Y, Cheng X, Deng L, Liu X. 2015. Photosynthetic Performance and Anti-Oxidative Response of *Cornus Controversa* Seedlings Under Cadmium and Lead Stress. *Bangladesh Journal of Botany* **44**: 215-221.
- Jesus SV, Marengo RA. 2008. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta. Amazon* **38**: 815-818.
- Kalaji HM, Guo P. 2008. Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs. - In: Sánchez A, Gutierrez SJ. *Photochemistry Research Progress*. New York: Nova Science Publishers, **12**: 469-463.

- Khan MA, Khan S, Khan A, Alam M. 2017. Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the Total Environment* **601-602**: 1591-1605.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**: 313-349.
- Li S, Yang W, Yang T, Chen Y, Ni W. 2015. Effects of Cadmium Stress on Leaf Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis of *Elsholtzia argyi*-A Cadmium Accumulating Plant. *International Journal of Phytoremediation* **17**: 85-92.
- Lux A, Šottníková A, Opatrná J, Greger M. 2004. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum* **120**: 537-545.
- Malik N, Biswas AK. 2012. Role of higher plants in remediation of metal contaminated sites. *Scientific Reviews Chemical Communications* **2**: 141-146.
- Marques TLLSM, Soares AM, Gomes MP, Martins G. 2011. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de Eucalipto expostas ao cádmio. *Revista Árvore*. **35**: 997-1006.
- Masarovičová E, Kráľová K, Kummerová M. 2010. Principles of classification of medicinal plants as hyperaccumulators or excluders. *Acta Physiol Plant* **32**: 823-829.
- Marmioli M, Imperiale D, Maestri E, Marmioli M. 2013. The response of *Populus* spp. to cadmium stress: Chemical, morphological and proteomics study. *Chemosphere* **93**: 1333-344.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- Mehes-Smith M, Nkongolo K, Cholewa E. 2013. Coping Mechanisms of Plants to metal contaminated Soil. In: Silvern S, ed. *Environmental Change and Sustainability*. In Tech, Rijeka, Croatia **54**: 53-90.
- Michel-López CY, Gil FE, Ortíz GF, Santamaría JM, González-Mendoza D, Ceceña-Duran C, Juárez OG. 2016. Bioaccumulation and effect of cadmium in the photosynthetic apparatus of *Prosopis juliflora*. *Chemical Speciation & Bioavailability* **28**: 1-4, 1-6.
- Miyazawa M, Pavan MA, Muraoka T, Carmo CAFS, Melo WJ. 2009. Chemical Analysis of Plant Tissues. In: Silva FC, ed. *Manual of chemical analysis of soils, plants and fertilizers*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, DF, Brazil 191-233.

- Nikolić NP, Borišev MK, Pajević SP, Arsenov DD, Župunski MD, Orlović SS, Pilipović AR. 2015. Photosynthetic response and tolerance of three willow species to cadmium exposure in hydroponic culture. *Archives of Biological Sciences* **67**: 1411-1420.
- Nikolić N, Zorić L, Cvetković I, Pajević S, Borišev M, Orlović S, Pilipović A. 2017. Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus x euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. *Iforest* **10**: 635-644.
- Oláh V, Hepp A, Mészáros I. 2015. Comparative study on the sensitivity of turions and active fronds of giant duckweed (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden) to heavy metal treatments. *Chemosphere* **132**: 40-46.
- Oliveira ES, Oliveira GMTS, Melo NFAC. 2017. Concentração de hidrocarbonetos alifáticos e metais pesados na zona portuária de Vila do Conde, Rio Pará-Brasil. *Revista espacios* **38**: 1-12.
- Pajević S, Borisev M, Nikolic N, Krstic B, Pilipović A, Orlović S. 2009. Phytoremediation capacity of poplar (*Populus spp.*) and willow (*Salix spp.*) clones in relation to photosynthesis. *Archives of Biological Sciences* **61**: 239-247.
- Parmar P, Kumari N, Sharma V. 2013. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies* **54**: 1-6.
- Parrotta L, Guerriero G, Sergeant K, Cai G, Hausman JF. 2015. Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers Plant Science*. **2**: 133.
- Pereira AS, Cortez PA, Almeida AAF, Prasad MNV, França MGC, Cunha M, Jesus RM, Mangabeira PAO. 2017. Morphology, ultrastructure, and element uptake in *Calophyllum brasiliense* Cambess. (*Calophyllaceae* J. Agardh) seedlings under cadmium exposure. *Environmental Science Pollution Research* **24**: 15576-15588.
- Pietrini F, Zacchini M, Iori V, Pietrosanti L, Ferretti M, Massacci A. 2009. Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. *Plant Biology* **12**: 355-63.
- Pinheiro HA, Silva JV, Endres L, Ferreira VM, Camara CA, Cabral FF, Oliveira JF, Carvalho LWT, Santos JM, Santos Filho BG. 2008. Leaf gas exchange, chloroplastic pigments and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L.) seedlings subjected to salt stress conditions. *Industrial Crops and Products* **27**: 385-392.

- Ramos AM, Santos LAR, Fortes LTG. 2009. Normais climatológicas do Brasil 1961-1990, 1ª edição. Brasília: INMET.
- Sarruge JR. 1975. Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica* **1**: 231-233.
- Seyler PT, Boaventura GR. 2003. Distribution and Partition of Trace Metals in the Amazon Basin. *Hydrological Processes* **17**: 1345-1361.
- Sharma S, Rana S, Thakkar A, Baldi A, Murthy RSR, Sharma RK. 2016. Physical, Chemical and Phytoremediation Technique for Removal of Heavy Metals. *Journal of Heavy Metal Toxicity and Diseases* **1**: 1-15.
- Silva JRR, Fernandes AR, Silva Junior ML, Santos CRC, Lobato A KS. 2017. Tolerance mechanisms in *Cassia alata* exposed to cadmium toxicity – potential use for phytoremediation. *Photosynthetica* **55**: 1-10.
- Silvestre WVD, Silva PA, Palheta LF, Oliveira Neto CF, Souza R, Festucci-Buselli RA, Pinheiro HA. 2017. Differential tolerance to water deficit in two açai (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. *Acta Physiologiae Plantarum* **39**: 1-10.
- Solti Á, Sárvári É, Szöllösi E, Brigitta Tóth B, Mészáros I, Fodor F, Szigeti Z. 2016. Stress hardening under long-term cadmium treatment is correlated with the activation of antioxidative defence and iron acquisition of chloroplasts in *Populus*. *Zeitschrift für Naturforschung C* **71**: 323-334.
- Song Y, Jin L, Wang X. 2016. Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation* **19**: 133-141.
- Statistical Analysis System Institute – SAS. 2007. SAS® 9.1.3 (TS1M3) for Windows Microsoft. Cary, NC: SAS Institute.
- Tang Y, Bao Q, Tian G, Fu K, Cheng H. 2015. Heavy Metal Cadmium Tolerance on the Growth Characteristics of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) in China. In: Chen S, Zhou S, eds. *International Conference on Advances in Energy, Environment and Chemical Engineering*. Atlantis Press, Amsterdam, Beijing, Paris 289-295.
- Tran TA, Popova LP. 2013. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany* **37**: 1-13.
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* **362**: 319-334.
- White PJ, Brown, PH 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**: 1073-1080.

- Wang Y, Gu C, Bai S, Sun Z, Zhu T, Zhu X, Grit DH, Tembrock LR. 2016. Cadmium accumulation and tolerance of *Lagerstroemia indica* and *Lagerstroemia fauriei* (Lythraceae) seedlings for phytoremediation applications. *International Journal of Phytoremediation*. 18: 1104-1112.
- Wilkins DA. 1957. A technique for the measurement of lead tolerance in plants. *Nature* **180**: 37-38.
- Yang Y, Li X, Yang S, Zhou Y, Dong C, Ren J, Sun X, Yang Y. 2015. Comparative Physiological and Proteomic Analysis Reveals the Leaf Response to Cadmium-Induced Stress in Poplar (*Populus yunnanensis*). *PLoS ONE* **10**: 1-20.
- Zhao S, Shang X, Duo L. 2015. Heavy metal uptake and leaching from polluted soil using permeable barrier in DTPA-assisted phytoextraction. *Environmental Science Pollution Research* **22**: 5263-5270.
- Zouari M, Ahmed CB, Elloumi N, Bellassoued K, Delmail D, Labrousse P, Abdallah FB, Rouina BB. 2016. Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **128**: 195-205.

### 3 Metabolismo do nitrogênio e carbono em plantas jovens de Ucuúba (*Virola surinamensis*) na presença do cádmio<sup>2</sup>

**Resumo:** O aumento da concentração de cádmio (Cd) no ambiente, causado especialmente por resíduos da mineração e uso excessivo de fertilizantes fosfatados, podem causar graves desequilíbrios nos ecossistemas terrestres e aquáticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo do Nitrogênio e Carbono em plantas jovens de Ucuúba (*Virola surinamensis*) na presença de cádmio com a perspectiva da fitorremediação de ambientes contaminados. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco concentrações de Cd (0, 15, 30, 45 e 60 mg L<sup>-1</sup>), por 60 dias. No geral, o Cd não afetou a concentração de nitrato na raiz, mas teve efeito positivo nas folhas. A redução da nitrato redutase (NR) nas plantas expostas ao Cd, foi acompanhada pela diminuição da amônia, aminoácidos solúveis totais (AST) e proteínas solúveis totais (PST). O Cd promoveu aumento na concentração de carboidratos solúveis totais (CST), prolina, sacarose e açúcares redutores nas plantas. Os maiores valores do fator de bioconcentração na raiz e o fator de translocação menor que 1.0 indicam que *V. surinamensis* desenvolveram mecanismos de defesa no sistema radicular na presença de Cd, com potencial para fitoestabilização de Cd. *V. surinamensis* apresentou maior capacidade de autoproteção na forma de bioacumulação de carboidratos solúveis totais, sacarose e prolina, importante por sua tolerância à presença de Cd.

**Palavras-chave:** Nitrato redutase, carboidratos solúveis totais, prolina, sacarose, açúcares redutores

---

<sup>2</sup> Artigo submetido na revista *Physiology and Molecular Biology of Plants*

**Abstract:** The increased cadmium (Cd) concentration in the environment, caused especially by mining residues and excessive use of phosphate fertilizers, can cause serious imbalances in terrestrial and aquatic ecosystems. The aim of this study was to assess the Nitrogen and Carbon metabolism of young plants of Ucuúba (*Virola surinamensis*) in the presence of cadmium with the perspective of the phytoremediation of contaminated environments. The used experimental design was a completely randomized design with five Cd concentrations (0, 15, 30, 45, and 60 mg L<sup>-1</sup>), for 60 days. In general, Cd did not affect nitrate concentration in the root but had a positive effect on leaves. The reduction of nitrate reductase (NR) in plants exposed to Cd was followed by a decrease in ammonia, total soluble amino acids (TSA), and total soluble proteins (TSP). Cd promoted an increase in the concentration of total soluble carbohydrates (TSC), proline, sucrose, and reducing sugars in the plants. *V. surinamensis* presented a higher self-protection capacity in the form of bioaccumulation of total soluble carbohydrates, sucrose, and proline, important for its tolerance to the presence of Cd.

**Key words:** Nitrate reductase, total soluble carbohydrates, proline, sucrose, reducing sugars

### 3. 1 Introdução

O aumento da concentração de cádmio (Cd) no ambiente, ocasionado especialmente por resíduos da mineração e uso excessivo de fertilizantes fosfatados, causa graves desequilíbrios nos ecossistemas terrestres e aquáticos por ser altamente tóxico e persistente no ambiente, assim como apresenta grande mobilidade do solo para as plantas, podendo ser incorporado e bioacumulado aos demais componentes da cadeia alimentar, afetando rapidamente um número crescente de organismos (Zayneb et al. 2015).

Os níveis elevados de Cd no solo comumente causam muitos sintomas de estresse em plantas, como a redução da taxa fotossintética, que pode resultar em alterações na concentração de amido e carboidratos solúveis nos tecidos das plantas (He et al. 2013; Elloumi et al. 2014) e desequilíbrio nutricional entre o carbono e o metabolismo do nitrogênio (Ci et al. 2009), reduzindo assim a produção de biomassa e o crescimento total das plantas. A menor absorção de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Nasraoui-Hajaji et al. 2011; Nikolić et al. 2017), alterações na atividade da nitrato redutase (NR) (Song et al. 2016), concentração de amônia ( $\text{NH}_4^+$ ) (Sarangthem et al. 2017), prolina (Wang et al. 2016; Nikolić et al. 2017), proteínas solúveis totais (PST) e aminoácidos solúveis totais (AST) (Rahoui et al. 2015) em plantas sob efeito de Cd também foram observados.

Tem sido observado que as plantas superiores são mais sensíveis ao estresse por Cd (Xie et al. 2014). No entanto, estudo realizado por Andrade Júnior et al. (2019) demonstraram média e alta tolerância de *V. surinamensis* ao Cd. Variações na tolerância ao Cd, nas plantas, podem estar associadas a mudanças no metabolismo do nitrogênio e/ou carbono. A tolerância diferencial ao Cd pode ser atribuída ao acúmulo diferencial de aminoácidos como a prolina e açúcares, que servem como osmólitos compatíveis e antioxidantes ou estão envolvidos em outras vias de defesa da planta contra o estresse (Xie et al. 2014).

*Viola surinamensis* (Ucuúba) é uma espécie florestal de interesse econômico e medicinal, além de ser utilizada com sucesso na recomposição de áreas alteradas. É uma espécie amplamente distribuída e adaptada aos ecossistemas de várzea e igapó da Amazônia (Andrade Júnior et al. 2019). Esses ecossistemas são constantemente suscetíveis à contaminação por metais pesados (Khan et al. 2017), indicando que a planta possui estratégias para tolerar ambientes contaminados por metais pesados.

Testamos a hipótese de que *V. surinamensis* desenvolve estratégias bioquímicas capazes de tolerar altas concentrações de Cd. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o

metabolismo do Nitrogênio e Carbono em plantas jovens de *V. surinamensis* na presença do cádmio, com a finalidade de contribuir para a compreensão do potencial de *V. surinamensis* contra o estresse de Cd.

### 3. 2 Material e métodos

#### 3. 2. 1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) em Belém, estado do Pará, Brasil (01 ° 27'21 " S, 48 ° 30'16 " W) no período de 15 de setembro de 2017 a 14 de novembro de 2017. De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima é do tipo Af (Floresta tropical), com precipitação média anual de 2921.7 mm, temperatura média de 25.9 °C, umidade relativa média de 86.8% e velocidade do vento de 1.35 m s<sup>-1</sup>. (Ramos et al. 2009).

#### 3. 2. 2 Material da planta e condição de crescimento

Sementes de *V. surinamensis* foram coletadas na área da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental), localizada em Belém, Estado do Pará, Brasil (01° 26'44.2 " S, 48° 25'03.8 " W). Essas sementes foram semeadas em bandejas de polietileno de 5-L contendo areia e serragem esterilizada (1:1, v/v), e mantidas sob temperatura média do ar ( $T_{air}$ ) e umidade relativa do ar (UR) de 28 °C e 90%. Após a emergência, as plântulas contendo o primeiro par de eófilos foram transplantadas para vasos de polietileno de 10-L contendo latossolo amarelo e cama aviário (3:1, v/v). As mudas foram cultivadas em casa de vegetação por 180 dias, sendo irrigadas diariamente para repor a água perdida pela evapotranspiração. Posteriormente, as plantas jovens foram removidas, as raízes lavadas com água desionizada e transferidas para vasos de Leonard de 5-L contendo areia esterilizada e lavada e 800 mL de solução nutritiva de Sarruge (1975), substituídas semanalmente e constituídas de ( $\mu$ M): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400; KNO<sub>3</sub>, 2000; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O, 2000; MgSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 800; FeEDTA, 400; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 400; MnCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O, 400; ZnCl<sub>2</sub>, 400; CuCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O, 400; e H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O, 400. O pH foi mantido a 5,9 ± 0,2, utilizando HCl e NaOH. A força iônica foi iniciada em 25% (10 dias) e aumentada para 50% (35 dias), permanecendo por um período de aclimatização de 45 dias.

### 3. 2. 3 Delineamento Experimental e avaliação dos tratamentos

Após 45 dias de cultivo, as plântulas mais uniformes, considerando a altura, diâmetro do caule e número de folhas, foram submetidas a cinco concentrações de Cd (tratamentos) da seguinte maneira: 0 mg L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub> (controle), 15, 30, 45, e 60 mg L<sup>-1</sup> de CdCl<sub>2</sub>. As doses de Cd foram determinadas com base na Resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA (Brasil, 2009), que estabelece critérios e valores norteadores da qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete repetições, por tratamento, totalizando 35 unidades experimentais. Uma única planta por vaso foi considerada uma réplica. Todas as variáveis para comparações de tratamento foram avaliadas 60 dias após a diferenciação do tratamento com Cd.

### 3. 2. 4 Avaliações Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores da Amazônia (EBPS) da UFRA. Foram determinados: Teores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Cataldo et al. 1975), amônio livre (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Weatherburn, 1967), atividade da enzima redutase do nitrato (RNO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Hageman e Hucklesby, 1971), aminoácidos solúveis totais (AST) (Peoples, 1989), proteínas solúveis totais (PST) (Bradford, 1976); prolina (Bates, 1973), carboidratos solúveis totais (Dubois, 1956); sacarose (Van Handel, 1968) e açúcares redutores (Rinner et al. 2012).

### 3. 2. 4 Análises dos dados

Os dados experimentais foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para as variáveis paramétricas, as médias dos tratamentos foram submetidas ao PROC GLM, teste HSH post hoc de Tukey e correlação entre variáveis pelo PROC CORR linear de Pearson utilizando o software SAS 9.1.3 (SAS, 2007). Para as variáveis não paramétricas, os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni pelo software RStudio versão 1.1.383. Os dados experimentais de todas as análises foram avaliados a 5% de significância.

### 3. 3 Resultados

#### 3. 3. 1 Efeito do Cd na concentração de nitrato, redutase nitrato e amônio livre

As concentrações de nitrato nas raízes não foram afetadas significativamente pelo Cd, exceto para a dose de 15 mg L<sup>-1</sup> de Cd (Fig. 1a). Nas folhas, as concentrações de nitrato foram afetadas significativamente pelo Cd (Fig. 1b). Nas raízes, a concentração foi de 0,045 e 0,04 μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> de MS nos tratamentos controle (0 mg L<sup>-1</sup> de Cd) e na dose de 15 mg L<sup>-1</sup> de Cd, respectivamente (Fig. 1a), correspondendo uma redução de 11,1%, em comparação ao controle. Nas folhas, foram obtidos valores de 0,01 e 0,02 μmol NO<sub>3</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> de MS nas plantas controle (0 mg L<sup>-1</sup> de Cd) e na maior dose de Cd (60 mg L<sup>-1</sup> de Cd), respectivamente (Fig. 1b), caracterizando um aumento de 100% no tratamento de 60 mg L<sup>-1</sup> de Cd comparado ao tratamento controle.

A atividade da redutase do nitrato (ARN) foi significativamente afetada pelo Cd, tanto nas raízes quanto nas folhas (Fig. 1c, d). Nas raízes, o menor valor (0,33 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup>) ocorreu na dose de 60 mg L<sup>-1</sup> de Cd, representando redução de 56% em comparação ao tratamento controle (0,76 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> MF h) (Fig. 1c). Nas folhas, a redução foi mais acentuada, atingindo valor de 0,02 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup> na dose de 60 mg L<sup>-1</sup> de Cd, correspondendo decréscimo de 97,5% comparativamente ao tratamento controle (0,79 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> g<sup>-1</sup> MF h<sup>-1</sup>) (Fig. 1d).

O Cd afetou significativamente a amônia livre, tanto nas raízes quanto nas folhas (Fig. 1e, f). Nas raízes, foram obtidos valores de 9,52 mmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> de MS (0 mg L<sup>-1</sup> de Cd) e 1,39 mmol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> de MS (60 mg L<sup>-1</sup> de Cd), representando uma redução de 85,4% na maior dose de Cd comparativamente ao tratamento controle (Fig. 1e). Nas folhas, o efeito do Cd foi mais expressivo, promovendo redução de 87,8% na concentração da amônia na dose de 60 mg L<sup>-1</sup> de Cd (2,38 mmol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> de MS) em comparação ao tratamento controle (19,47 mmol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> de MS) (Fig. 1f).

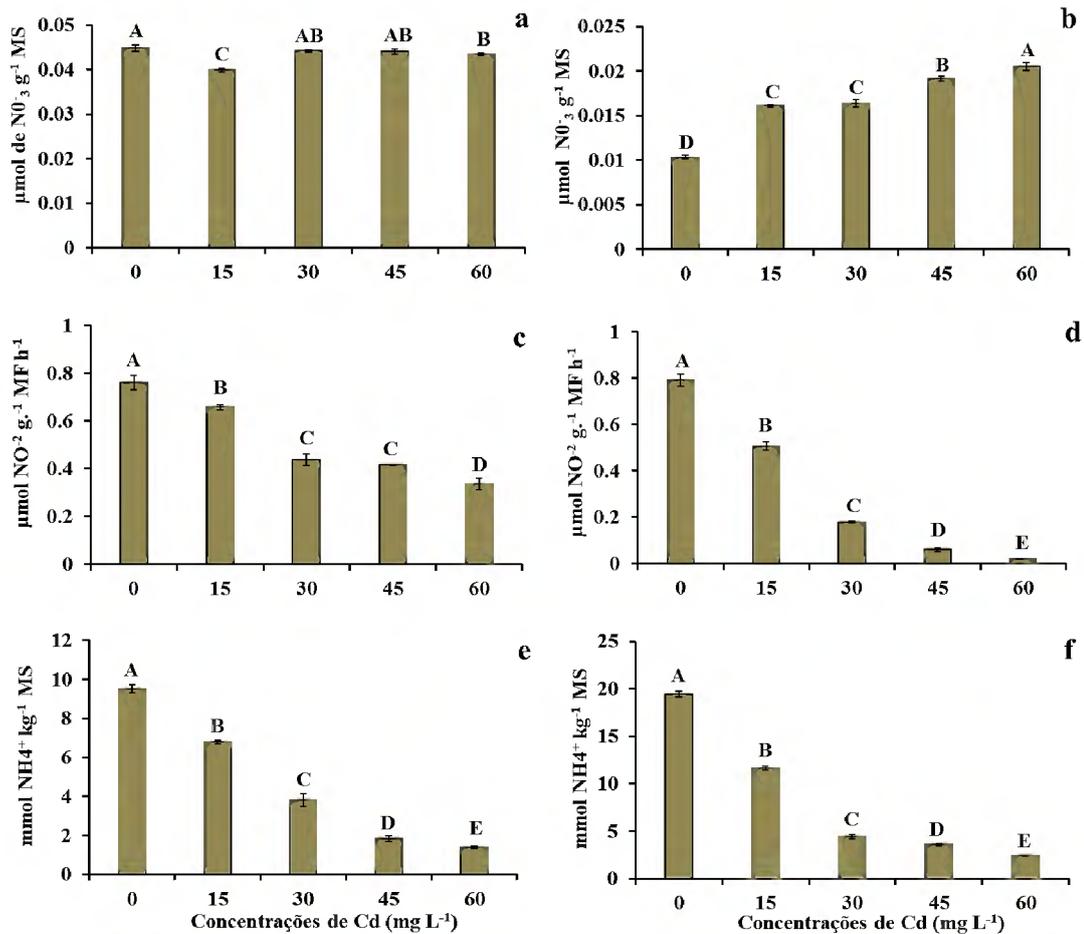


Fig. 1. a: Concentração de nitrato na raiz, b: concentração de nitrato na folha, c: concentração da redutase do nitrato na raiz, d: concentração da redutase do nitrato na folha, e: concentração de amônio na raiz, f: concentração de amônio na folha em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

### 3. 3. 2 Efeito do Cd na concentração de aminoácidos solúveis totais, proteínas solúveis totais e concentração de prolina

A concentração de aminoácidos solúveis totais nas raízes e folhas foi afetada significativamente pelo Cd (Fig. 2). Nas raízes, a concentração foi de 330 e 243  $\mu\text{mol}$  de AA  $\text{g}^{-1}$  de MS nos tratamentos controle (0  $\text{mg L}^{-1}$  Cd) e na dose de 60  $\text{mg L}^{-1}$  de Cd, respectivamente (Fig. 2a), correspondendo uma redução de 26,4%, na maior dose de Cd em comparação ao tratamento controle. Nas folhas, foram obtidos valores de 337 e 215  $\mu\text{mol}$  de AA  $\text{g}^{-1}$  de MS nas plantas controle (0  $\text{mg L}^{-1}$  de Cd) e na maior dose de Cd (60  $\text{mg L}^{-1}$  de Cd), respectivamente (Fig. 2b), caracterizando uma redução de 36,2% no tratamento de 60  $\text{mg L}^{-1}$  de Cd comparativamente ao tratamento controle.

As concentrações de proteínas solúveis totais nas plantas submetidas à presença de Cd reduziram significativamente, tanto nas raízes quanto nas folhas (Fig. 2c, d). A maior e menor

concentração de proteínas nas raízes ocorreram no tratamento controle (0,54 mg de proteína g<sup>-1</sup> de MS) e na dose de 60 mg L<sup>-1</sup> de Cd (0,35 mg de proteína g<sup>-1</sup> de MS), com redução de 35,18 % na maior dose de Cd em comparação ao tratamento controle (Fig. 2c). Nas folhas, os valores obtidos foram 0,37 mg de proteína g<sup>-1</sup> de MS (tratamento controle) e 0,15 mg de proteína g<sup>-1</sup> de MS (60 mg L<sup>-1</sup> de Cd), correspondendo ao decréscimo de 59,5% na menor dose de Cd em comparação ao tratamento controle (Fig. 2d).

As concentrações de prolina nas raízes e nas folhas das plantas submetidas às doses de Cd aumentaram significativamente (fig. 2). Valores de 0,60 μmol Pro g<sup>-1</sup> MS (0 mg L<sup>-1</sup> de Cd) e 0,76 μmol Pro g<sup>-1</sup> MS (60 mg L<sup>-1</sup> de Cd) foram obtidos nas raízes, representando um aumento de 26,7% na maior dosagem de Cd quando comparado ao tratamento controle (Fig. 2e). Nas folhas das plantas controle e na dose de 60 mg L<sup>-1</sup> de Cd, as concentrações de prolina foram de 0,81 e 1,06 μmol Pro g<sup>-1</sup> MS, respectivamente, demonstrando um aumento de 30,9% de prolina nas plantas com maior dose de Cd quando comparadas ao tratamento controle (fig. 2f).

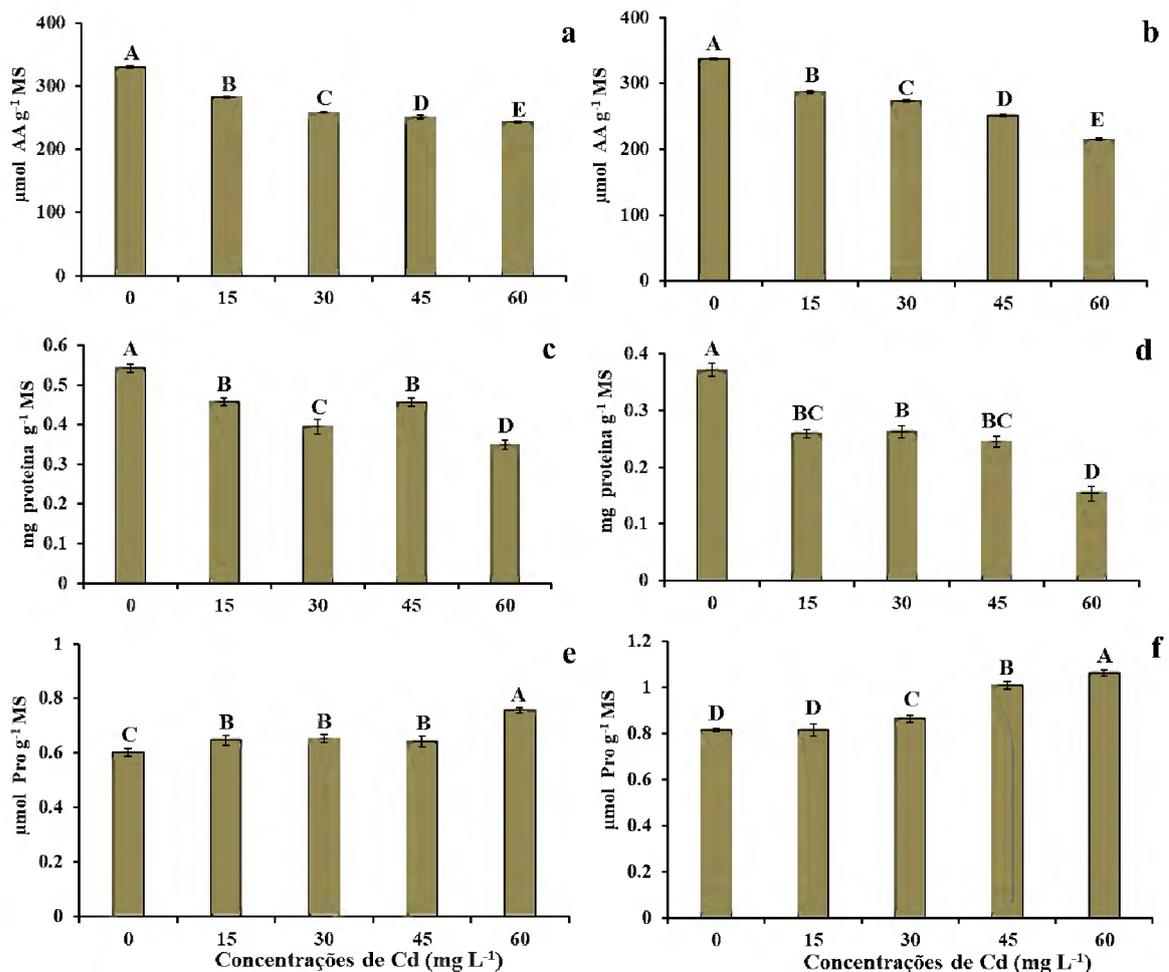


Fig 2. a: concentração de aminoácidos solúveis totais na raiz, b: concentração de aminoácidos solúveis totais na folha, c: concentração de proteínas solúveis totais na raiz, d: concentração de proteínas solúveis totais na folha, e: concentração de prolina na raiz, f: concentração de prolina na folha em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey (P < 0.05). Média ± DP, n = 7.

### 3. 3. 3 Concentração de carboidratos solúveis totais, concentração de sacarose e açúcares redutores na presença de Cd

As concentrações de carboidratos solúveis totais nas plantas tratadas com Cd aumentaram significativamente, tanto nas raízes quanto nas folhas (Fig. 3a, b). A menor e maior concentração de carboidratos nas raízes ocorreram no tratamento controle ( $0,06 \text{ mmol Glu g}^{-1}$ ) e na dose de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd ( $0,1 \text{ mmol Glu g}^{-1}$ ), com aumento de 83,3% na maior dose de Cd em comparação ao tratamento controle (Fig. 3a). Nas folhas, os valores obtidos foram  $0,09 \text{ mmol Glu g}^{-1}$  (tratamento controle) e  $0,1 \text{ mmol Glu g}^{-1}$  ( $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd), correspondendo ao acréscimo de 11,1% na menor dose de Cd, comparativamente ao tratamento controle (Fig. 3b).

As concentrações de sacarose nas plantas tratadas com Cd aumentaram significativamente, tanto nas raízes quanto nas folhas (Fig. c, d). Nas raízes, os valores foram  $1,16 \text{ mg sacarose g}^{-1}$  de MS ( $0 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd) e  $2,11 \text{ mg sacarose g}^{-1}$  de MS ( $60 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd), representando um aumento de 81,9% na maior dose de Cd em comparação ao tratamento controle (Fig. 3c). A menor e maior concentração de sacarose nas folhas, ocorreram no tratamento controle ( $0,57 \text{ mg sacarose g}^{-1}$  de MS) e na dose de  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd ( $2,38 \text{ mg sacarose g}^{-1}$  de MS), com aumento de 317,5% na maior dose de Cd, comparativamente ao tratamento controle (Fig. 3d).

As concentrações de açúcares redutores aumentaram nas raízes e reduziram significativamente nas folhas das plantas submetidas a presença de Cd (Fig. 3e, f). Nas raízes, foram obtidos valores de  $0,83 \text{ } \mu\text{mol carb g}^{-1}$  de MS ( $0 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd) e  $1,42 \text{ } \mu\text{mol carb g}^{-1}$  de MS ( $45 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd), representando um aumento de 71% na dose de  $45 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd em comparação ao tratamento controle (Fig. 3e). Nas folhas das plantas controle e na dose de  $15 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd as concentrações foram de 1,57 e  $1,27 \text{ } \mu\text{mol carb g}^{-1}$  de MS, respectivamente, demonstrando redução de 19,1% de açúcares redutores nas plantas com menor dose de Cd, comparativamente ao tratamento controle (Fig. 3f).

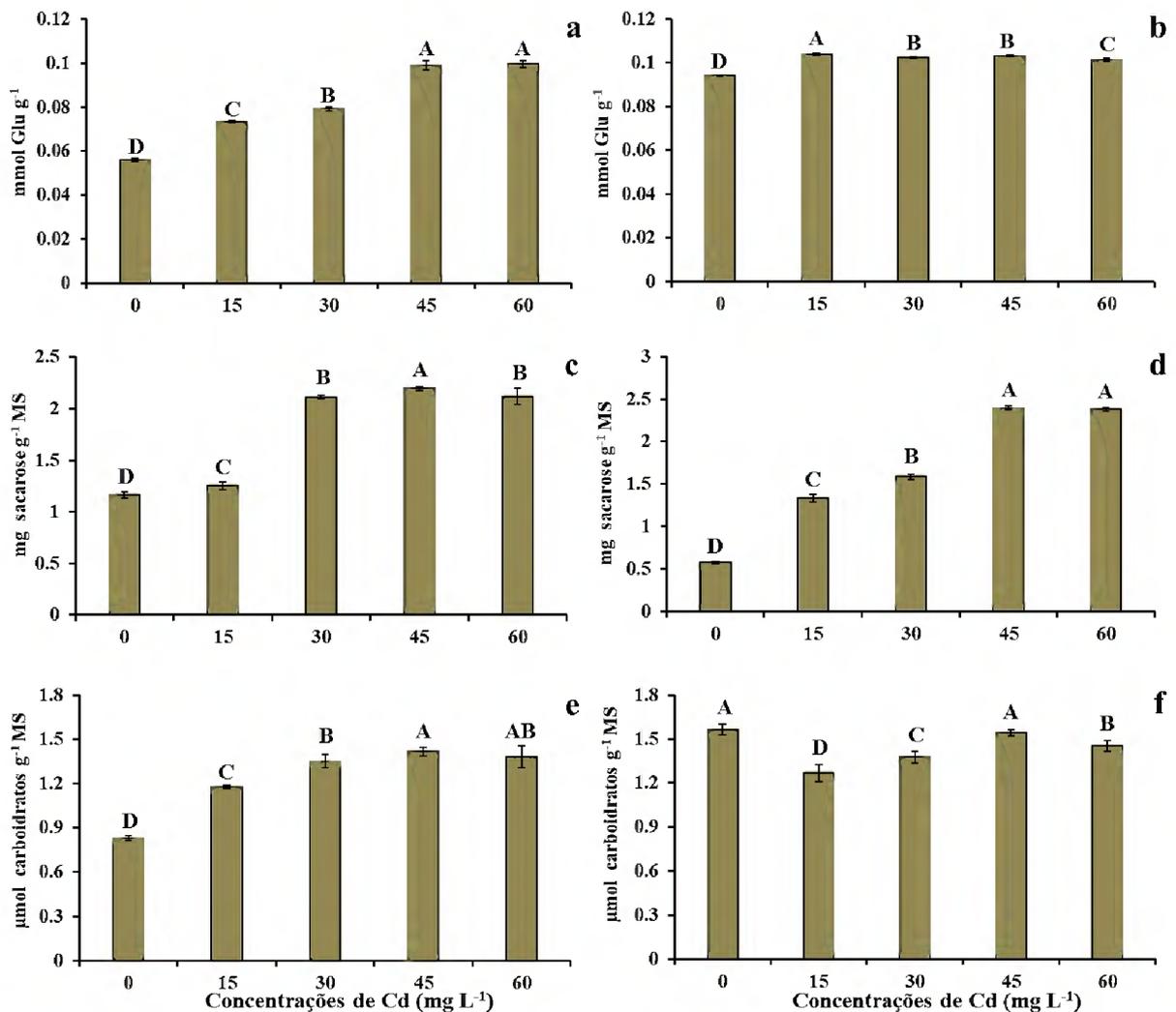


Fig. 3. a: Concentração de carboidratos solúveis totais na raiz, b: concentração de carboidratos solúveis totais na folha, c: concentração de sacarose raiz, d: concentração de sacarose na folha, e: concentração de açúcares redutores na raiz, f: concentração de açúcares redutores na folha em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

### 3. 4 Discussão

O  $\text{NO}_3^-$ , importante fonte de N, é absorvido ativamente pela membrana plasmática das células epidérmicas e corticais das raízes, por meio de proteínas transportadoras de nitrato, e, em plantas expostas ao Cd, ocorre inibição das atividades dessas proteínas (Dai et al. 2013), em decorrência do Cd danificar a função normal da bomba de prótons ( $\text{H}^+$  ATPase) no plasmalema (Mehes-Smith et al. 2013; Hasanuzzaman et al. 2017). No entanto, no geral, não houve redução do  $\text{NO}_3^-$  nas raízes de *V. surinamensis* (Figura 2 A), indicando que a presença de Cd, provavelmente, não afetou a atividade das proteínas transportadoras de  $\text{NO}_3^-$ , colaborando com

estudo recente, realizado por (Hernández et al. 2015), que apontou aumento de ATPase total na raiz e caule de *Cucumis sativus* na presença de Cd.

Em plantas saudias, uma vez absorvido pelas raízes, o  $\text{NO}_3^-$  é transportada para as folhas, sendo armazenada nos vacúolos ou reduzida a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela ARN citossólico dependente de NAD(P)H (Mao et al. 2014). Neste estudo, o aumento do  $\text{NO}_3^-$  nas folhas de *V. surinamensis* (Fig. 1b) sugere que o Cd não interferiu na translocação do composto nitrogenado para a parte aérea. Possivelmente, a assimilação do  $\text{NO}_3^-$  no citosol das células do mesofilo pode ter sido afetada por inativação da redutase do nitrato (RN) causada pelo Cd. A redução da ARN com o aumento das doses de Cd na solução nutritiva pode ser um mecanismo eficiente de economia de energia para reduzir o efeito do estresse e não para diminuir o  $\text{NO}_3^-$  na planta (Tran e Popova, 2013).

A RN é a enzima chave no processo de assimilação de  $\text{NO}_3^-$  (Nikolić et al. 2017) e é regulada pela presença do  $\text{NO}_3^-$  (Van der Ent et al. 2013), por sua degradação, ativação ou inativação (Liu et al. 2015). Tem sido relatado que, em plantas expostas ao Cd, a ARN é reduzida, levando à diminuição da assimilação  $\text{NO}_3^-$ , e isso ocorre, pelo menos em parte, porque o metal causa menor absorção de  $\text{NO}_3^-$  pelas raízes das plantas (Nasraoui-Hajaji et al. 2011; Nikolić et al. 2017). Neste estudo, a redução acentuada da ARN com o aumento da concentração de Cd (Fig. 1c) parece não ter sido causada pela disponibilidade do substrato ( $\text{NO}_3^-$ ), pois não ocorreu redução do composto nitrogenado nas raízes e parte aérea da planta, sugerindo efeito direto do Cd na ARN, ou seja, a interação do metal com o grupo tio (-SH) no sítio ativo da enzima resultaria na inativação. Além disso, a inativação ou ativação da RN é regulada por mecanismo de fosforilação e desfosforilação (Liu et al. 2015). A inativação da RN ocorre, inicialmente, por fosforilação do resíduo de serina presente na enzima, por meio de uma cinase dependente de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), e a inativação completa da RN ocorre pela associação da forma fosforilada com a proteína 14-3-3 e Magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Sun et al. 2016). Neste estudo, o Cd pode ter promovido aumento do fosfato inorgânico, devido à queda de ATP na fotossíntese, resultando na fosforilação da RN, favorecendo a ligação com a proteína 14-3-3 e a inativação da ARN. Assim, a redução da ARN afetou a assimilação de  $\text{NO}_3^-$  e influenciou no metabolismo do N, resultando na redução da amônia (Fig. 1e, f), aminoácidos (Fig. 2a, b) e PST (Fig. 2c, d), tanto nas raízes quanto na parte aérea da *V. surinamensis*. Redução da atividade da redutase do nitrato também foi observada em outras espécies de árvores expostas ao Cd (Nikolić et al. 2017).

A NR reduz o  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  e este, por sua vez, é reduzido a  $\text{NH}_4^+$  pela nitrito redutase (NiR) e, então, incorporado em aminoácidos por um conjunto de enzimas (Kavoosi et al. 2014). As vias de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  em glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos nas plantas, envolve a atividade da glutamina sintetase (GS), da glutamato sintase (GOGAT) e da glutamato desidrogenase (GDH) (Sarangthem et al. 2017). Alterações na atividade dessas enzimas, em plantas expostas ao Cd, tem sido relatada (Kavoosi et al. 2014; Song et al. 2016; Sarangthem et al. 2017). Neste estudo, a redução do íon  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 1e, f) pode ter sido causada pela inibição da ARN (Fig. 1c, d) ou pelo aumento das atividades de outras enzimas que regulam a assimilação da amônia (GS, GOGAT e GDH). Embora a GS, desempenhe o papel central no metabolismo do  $\text{NH}_4^+$  em plantas superiores (Sarangthem et al. 2017), na presença de Cd, a GDH é a principal via de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  quando a GS e GOGAT são inibidas (Kavoosi et al. 2014). A inibição dessas enzimas, especialmente da GS, ocorre pelo menos em parte, porque o Cd afeta o grupo tiol dos compostos, ocasionando o aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$ , que é tóxico (Sarangthem et al. 2017). Assim, sugere-se que na presença do Cd, a *V. surinamensis* pode inibir a atividade da GS e GOGAT e aumentar a atividade da GDH na incorporação do  $\text{NH}_4^+$  em GLU como forma de minimizar o efeito do estresse.

A redução de aminoácidos em plantas expostas ao Cd (Fig. 2a, b) pode estar associada a mudanças nos níveis transcricionais que codificam enzimas envolvidas no metabolismo (He et al. 2014). A GS é uma enzima precursora na formação dos aminoácidos em plantas superiores (Sarangthem et al. 2017). Sendo assim, o Cd pode ter reduzido o nível de transcrição da GS e contribuiu para reduções na concentração de AST em *V. surinamensis*. Além disso, a glutathiona (GSH) é um composto tiol, quelante de metal, constituída pelos aminoácidos glutamina, cysteína, e glicina, e, em plantas submetidas ao Cd, tem sido relatado um aumento em sua síntese à custa de duas moléculas de ATP (Frunghillo et al. 2014; Nogueirol et al. 2018). Portanto, sugere-se que a estimulação da biossíntese da GSH e a ativação de defesas energéticas podem ter contribuído para a utilização e, conseqüentemente, a redução de AST em *V. surinamensis* na presença de Cd, o que seria um importante mecanismo na quelação do metal para minimizar os danos do Cd aos tecidos da planta. Ademais, em plantas expostas ao Cd, ocorrem alterações na atividade das transaminases (Reyes et al. 2018) e mobilização de açúcares solúveis (Haouari et al. 2012). Assim, em *V. surinamensis*, o processo de síntese de aminoácidos, por meio das enzimas envolvidas nas reações de transaminações e com uso do esqueleto de carbono, altamente dependentes de energia e de carboidratos, pode ter sido afetada pelo Cd, causando redução dos AST.

Metais pesados causam o declínio no teor de proteína e o aumento correspondente na atividade de enzimas hidrolíticas como as proteases (Haouari et al. 2012; Wu et al. 2015), associado à degradação protéica em plantas expostas ao Cd, pode resultar na interconversão de aminoácidos (Haouari et al. 2012). Assim, o Cd pode ter causado ativação de enzimas proteolíticas que degradaram as PST de *V. surinamensis*, liberando aminoácidos utilizados na biossíntese de aminoácidos específicos como a prolina (Fig. 2e, f). Redução na concentração de proteína solúvel associada com proteases também foi observada em *Moringa oleifera* estressada por Cd (Yadav e Srivastava 2017). Além disso, o Cd afetou negativamente a ARN em *V. surinamensis* (Fig. 1c, d), o que pode ter influenciado no balanço do N total e de aminoácidos, resultando na diminuição da síntese protéica. Outra possível explicação seria que o Cd causou a desnaturação de enzimas envolvidas na síntese protéica (Singh et al. 2016) e induziu a fragmentação de proteínas devido aos efeitos tóxicos de espécies reativas de oxigênio (EROS), ocasionando na redução do conteúdo de proteína (Anand et al. 2017).

O maior teor de prolina em plantas exposta ao Cd ocorre pela síntese de novo ou degradação proteica e/ou ambos os processos (Singh et al. 2016). Neste estudo, o acréscimo na concentração de prolina livre com o aumento das doses de Cd (Fig. 2e, f) pode estar relacionado ao seu papel de osmoprotetor para ajustamento osmótico, o que ajudaria a diminuir o potencial hídrico dos tecidos, evitando a desidratação. Além disso, a menor concentração de Cd na parte aérea de *V. surinamensis* (Andrade Júnior et al. (2019) sugere que a prolina tenha atuado no fechamento estomático para restringir a absorção e a translocação do Cd através da transpiração, minimizando os danos causados pelo metal. O acúmulo de prolina também pode ter contribuído para estabilizar e proteger estruturas subcelulares contra danos oxidativos causados pelos radicais livres (Wang et al. 2016; Singh et al. 2016; Solti et al. 2016). Tem sido sugerido que o aumento da prolina em plantas na presença de Cd seria devido à degradação de proteínas por enzimas proteolíticas (Raldugina et al. 2016) e o acúmulo desse aminoácido e a formação de complexo Cd-prolina não tóxico nos tecidos seria uma resposta da planta para reduzir a fitotoxicidade do metal (Chen et al. 2001; Aslam et al. 2014). O aumento da prolina, em plantas submetidas ao Cd, foi evidenciada em outras espécies florestais (He et al. 2013; Wang et al. 2016; Yadav e Srivastava 2017).

O estresse por Cd ativa nas plantas mecanismos de defesas bioquímicas (Gubrelay et al. 2013) como o acúmulo de açúcares, que, através do ciclo das pentoses-fosfato, ativam as reações geradoras de NADPH para eliminar ou manter os níveis de EROS sob controle e, reparar os efeitos fitotóxicos dos oxidantes (El-Beltagi e Mohamed, 2013). Assim, o aumento

dos CST em *V. surinamensis* exposta ao Cd (Fig. 3a, b) pode ter sido um mecanismo de proteção para reduzir a toxicidade do metal pela desintoxicação da EROs, por meio da quelação do Cd, possibilitando, pelo menos em parte, a manutenção dos centros de reação do PSII e a atividade fotossintética da planta (Shah et al. 2017). Além disso, em alta concentração de açúcares, a mobilização de ácidos graxos é reduzida e o acúmulo de EROs é menos intenso (Yan et al. 2015). Portanto, alteração nos CST pode ser considerada como um importante indicador do estresse oxidativo nas plantas. O aumento de CST pode ter funcionado como soluto compatível, que ajudaria a planta no ajustamento osmótico contra o estresse por Cd (Gubrelay et al. 2013; Singh et al. 2016), ou seja, o acúmulo de CST deve ter contribuído para a manutenção do estado hídrico da planta, favorecendo a proteção dos tecidos e os processos fisiológicos, importante mecanismo na tolerância de *V. surinamensis* à presença de Cd, pelo menos, durante o período experimental.

A sacarose é um dissacarídeo constituído de glicose e frutose e, por meio da atividade da invertase, desempenha um importante papel metabólico como doador de glicosil e frutossil para a síntese de polissacarídeos (Sharma et al. 2006) e aminoácidos nas plantas (Todd et al. 2016). Sendo assim, o aumento na concentração de sacarose (Fig. 3c, d) em *V. surinamensis* exposta ao Cd pode ser devido à inibição da atividade da invertase, interferindo no metabolismo de carbono e nitrogênio, especialmente no acúmulo da prolina (Fig. 2e, f). Outra explicação para o acúmulo de sacarose, seria porque o metal afeta positivamente a atividade da sacarose fosfato sintase (SPS) e negativamente a sacarose sintase (SuSy) (Fryzova et al. 2017). Adicionalmente, o aumento da concentração de sacarose em *V. surinamensis* exposta ao Cd, pode estar relacionada a degradação do amido pela atividade das enzimas hidrolases  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase, embora tenha sido relatado que metais pesados têm efeito inibitório sobre essas enzimas (Reyes et al. 2018). A maior concentração de sacarose na planta exposta ao Cd poderia estar relacionada a redução do metabolismo celular deste carboidrato (Badr et al. 2015) como forma de economia de energia, uma vez que o acúmulo de sacarose em plantas submetidas a presença de Cd seria uma forma de tolerância ao metal (Rahoui et al. 2015), atribuída a quelação do Cd pela sacarose, a ativação de sistemas específicos de eliminação de EROs, com a subsequente redução do dano oxidativo causado pelo metal e/ou, então, a sacarose atuaria no ajustamento osmótico para a conservação do fluxo interno de água da planta, mantendo assim o potencial hídrico em condições suficientes. Assim, altas concentrações de sacarose em *V. surinamensis* sugerem um bom estado metabólico regulador da planta na presença do Cd.

A maior concentração de açúcares redutores nas plantas sob estresse por Cd (Fig. 3e, f) indica economia de energia pela planta, ou, então, a presença do Cd afetando negativamente a respiração celular da raiz e parte aérea. O maior acúmulo de açúcar redutor na raiz (Fig. 3e) sugere o aumento do transporte desses carboidratos da parte aérea para as células em crescimento do sistema radicular, indicando que o Cd pode não ter afetado o sistema de transporte de assimilados de *V. surinamensis*. Adicionalmente, tem sido proposto que o açúcar transportado para as raízes, resultado da degradação do amido, seria substrato energético essencial para a retomada da respiração, conferindo um mecanismo de tolerância da planta contra o efeito fitotóxico do Cd (Rahoui et al. 2015). Resultados semelhantes na concentração de açúcares redutores foram encontrados em outras espécies (Kinay, 2018).

### **3. 5 Conclusão**

Em geral, o tratamento com Cd afetou a assimilação e o metabolismo do nitrogênio em maior extensão nas folhas de *V. surinamensis*.

*V. surinamensis* apresentou maior capacidade de autoproteção na forma de bioacumulação de carboidratos solúveis totais, sacarose e prolina, importante por sua tolerância à presença de Cd.

### **Fontes de financiamento**

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior no Brasil (CAPES), Código Financeiro 001, e, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil).

### **Conflito de interesses**

Nenhum declarado.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Grupo de Estudos sobre Biodiversidade em Plantas Superiores da Universidade Federal Rural da Amazônia pelas colaborações de pesquisadores.

## Referências

- Anand M, Kumar B, Sheel R (2017) Effect of Heavy Metals on Biochemical Profile of *Azolla filiculoides*. IJCMAS 6: 3629-3653. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.610.428>
- Andrade Júnior WV, Oliveira Neto CF, Santos Filho BG, Amarante CB, Cruz ED, Okumura RS, Barbosa AVC, Sousa DJP, Teixeira JSS, Botelho AS (2019) Effect of cadmium on young plants of *Virola surinamensis*. AoB Plants 11: 1-11. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plz022>
- Aslam R, Ansari MYK, Choudhary S, Bhat TM, Jahan N (2014) Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annum* L. An important spice crop of India. Saudi J Bio Sci 21: 465-472. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.07.005>
- Badr A, Angers P, Desjardins P (2015) Comprehensive analysis of in vitro to ex vitro transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. Plant Cell Tissue Organ Cult 122: 491-508. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0786-3>
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. Short Communication. Plant Soil 39: 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brasil (2009) Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília 249: 81-84.
- Chen CT, Chen LM, Lin CC, Kao CH (2001) Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. Plant Sci 160: 283-290. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00393-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00393-9)
- Ci D, Jiang D, Dai T, Jing Q, Cao W (2009) Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. Chemosphere 77: 1620-1625. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.062>
- Dai H, Shan C, Jia G, Lu C, Yang T, Wei A (2013) Cadmium detoxification in *Populus x canescens*. Turk J Bot 37: 950-955. <https://doi.org/10.3906/bot-1110-9>
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem 28: 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

- El-Beltagi HS, Mohamed HI (2013) Alleviation of Cadmium Toxicity in *Pisum sativum* L. Seedlings by Calcium Chloride. *Not Bot Horti Agrobo* 41: 157-168. <https://doi.org/10.15835/nbha4118910>
- Eloumi N, Zouari M, Chaari L, Jomni C, Rouina BB, Abdallah FB (2014) Ecophysiological responses of almond (*Prunus dulcis*) seedlings to cadmium stress. *Biologia* 69: 604-609. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0348-x>
- Frunghillo L, Skelly MJ, Gary JL, Steven HS, Salgado I (2014) S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nat commun* 5: 1-10. <https://doi:10.1038/ncomms6401>
- Fryzova R, Pohanka M, Martinkova P, Cihlarova H, Brtnicky M, Hladky J, Kynicky J (2017) Oxidative Stress and Heavy Metals in Plants. In: de Voogt P. (ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology (Continuation of Residue Reviews)*. Springer, Madrid, Spain 245: 129-156.
- Gubrelay U, Agnihotri RK, Singh G, Kaur R, Sharma R (2013) Effect of heavy metal Cd on some physiological and biochemical parameters of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Int J Agri Crop Sci* 5: 2743-2751.
- Hageman RHG, Hucklesby DP (1971). Nitrate Reductase from Higher Plants. *Methods Enzimol* 17: 491-503. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(80\)69026-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(80)69026-0)
- Haouari CC, Nasraoui AH, Carrayol L, Lelendais M, Ghorbel MH, Gouia H (2012) Foliar nitrogen and changes in free amino acid composition of *Solanum lycopersicum* under cadmium toxicity: kinetics of  $^{15}\text{NH}_4^+$ . *Braz J Plant Physiol* 24: 19-27. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202012000100004>
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M (2017) Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol Biol Plants* 23: 249-268. <http://dx.doi.org/10.1007/s12298-017-0422-2>. Epub 2017 Mar 10
- He J, Li H, Luo J, Ma C, Li S, Qu L, Gai, Y, Jiang X, Janz D, Polle A, Tyree M, Luo ZB (2013) A Transcriptomic Network Underlies Microstructural and Physiological Responses to Cadmium in *Populus x canescens*. *Plant Physiol* 162: 424-439. <https://doi.org/10.1104/pp.113.215681>
- Hernández LE, Sobrino-plata J, Montero-Palmero MB, Carrasco-Gil S, Flores-Cáceres ML, Ortega-Villasante C, Escobar C (2015) Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. *J Exp Bot* 66: 2901-2911. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv063>

- Kavoosi G, Balotf S, Eshghi H, Hasani H (2014) Analysis of nitrate reductase mRNA expression and nitrate reductase activity in response to nitrogen supply. *Mol Biol Res Commun* 3: 75-84. <https://doi.org/10.22099/MBRC.2014.1960>
- Khan MA, Khan S, Khan A, Alam M (2017) Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Sci Total Environ* 601-602: 1591-1605. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.030>.
- Kinay A (2018) Effects of Cadmium on Nicotine, Reducing Sugars and Phenolic Contents of Basma Tobacco Variety. *Fresenius Environmental Bulletin* 12: 9195-9202
- Liu SL, Yang RJ, Ma MD, Dan F, Zhao Y, Jiang P, Wang MH (2015) Effects of exogenous NO on the growth, mineral nutrient content, antioxidant system, and ATPase activities of *Trifolium repens* L. plants under cadmium stress. *Acta Physiol Plant* 37: 1721. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1721-7>
- Lux A, Šottníková A, Opatrná J, Greger M (2004) Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiol Plant* 120: 537-545. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.0275.x>
- Malik N, Biswas AK (2012) Role of higher plants in remediation of metal contaminated sites. *Sci Revs Chem Commun* 2: 141-146.
- Mao QQ, Guan MY, Lu KX, Du ST, Fan SK, Ye YQ, Lin XY, Jin CW (2014) Inhibition of Nitrate Transporter 1.1-Controlled Nitrate Uptake Reduces Cadmium Uptake in Arabidopsis. *Plant Physiol* 166: 934-944. <https://doi.org/10.1104/pp.114.243766>
- Mehes-Smith M, Nkongolo K, Cholewa E (2013) Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil. In: *Environmental Change and Sustainability*, Steven, S., Young, S. (eds). InTech, Rijeka, Croatia 53-90.
- Nasraoui-Hajaji A, Chaffei-Haouari C, Ghorbel MH, Gouia H (2011) Growth and nitrate assimilation in tomato (*Solanum lycopersicon*) grown with different nitrogen source and treated with cadmium. *Acta Bot Gall* 158: 3-11. <https://doi.org/10.1080/12538078.2011.10516249>
- Nikolić N, Zorić L, Cvetković I, Pajević S, Borišev M, Orlović S, Pilipović A (2017) Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus x euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. *iForest* 10: 635-644. <https://doi.org/10.3832/ifor2165-010>
- Nogueirol RC, Monteiro FA, de Souza Junior JC, Azevedo RA (2018) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> proportions affect cadmium bioaccumulation and tolerance of tomato. *Environ Sci Pollut Res Int* 25: 13916-13928. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1588-z>

- Peoples MB, Faizah AW, Reakasem BE, Herridge DF (1989) Methods for Evaluating Nitrogen Fixation by Nodulated Legumes in the Field. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra 1: 1-76.
- Rahoui S, Chaoui A, Bem C, Rickauer M, Gentzbittel L, Ferjani E (2015) Effect of cadmium pollution on mobilization of embryo reserves in seedlings of six contrasted *Medicago truncatula* lines. *Phytochem* 111: 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.002>
- Raldugina GN, Krasavina MS, Lunkova NF, Burmistrova NA (2016) Resistance of Plants to Cu Stress. *Transgenesis. Plant Metal Interaction* 69-114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00004-7>
- Ramos AM, Santos LAR, Fortes LTG (2009) Normais climatológicas do Brasil 1961-1990. rev. e ampl. Brasília: INMET.
- Reyes TH, Sartazza A, Pompeiano A, Ciurli A, Lu Y, Guglielminetti L, Yamaguchi J (2018). Nitrate Reductase Modulation in Response to Changes in C/N Balance and Nitrogen Source in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 59: 1248-1254. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy065>
- Rinner KT, Saurer M, Streit K, Siegwolf RTW (2012) Evaluation of a liquid chromatography method for compound specific  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of plant carbohydrates in alkaline media. *Rapid Commun in Mass Spectrom* 26: 2173-2185. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy065>
- Rstudio Team (2015). RStudio: Integrated development environment for R. RStudio Inc., Boston, MA.
- Sharma SS, Dietz KJ (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57: 711-726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>
- Sarangthem J, Dhamgaye S, Gadre R (2017) Cadmium Effects on Enzymes of Ammonia Assimilation in Excised Etiolated Maize Leaf Segments during Greening: A Mechanistic Approach. *Am J Plant Sci* 8: 1399-1410. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.86095>
- Sarruge JR (1975) Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica, Botucatu (Nota técnica)* 1: 231-233.
- Shah K, Mankad AU, Reddy MN (2017) Cadmium accumulation and its effects on growth and biochemical parameters in *Tagetes erecta* L. *J Pharmacogn Phytochem* 6: 111-115.
- Singh S, Parihar P, Singh R, Singh VP, Prasad SM (2016) Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Front Plant Sci* 6: 1-36. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01143>

- Solti Á, Sárvári É, Szöllösi E, Tóth B, Mészáros, I, Fodor F, Szigeti Z (2016) Stress hardening under long-term cadmium treatment is correlated with the activation of antioxidative defence and iron acquisition of chloroplasts in *Populus*. *Z Naturforsch C* 71: 323-334. <https://doi.org/10.1515/znc-2016-0092>
- Song Y, Jin L, Wang X (2016) Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *Int J Phytoremediation* 19: 133-141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>.
- Statistical Analysis System Institute – SAS (2007) SAS® 9.1.3 (TS1M3) for Windows Microsoft. Cary: SAS Institute Inc.
- Sun HY, Wang XY, Wang YN, Wei YY, Wang GH (2016) Alleviation of cadmium toxicity in cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings by the application of selenium. *Span J Agric Res* 14: 1-12. <https://doi.org/10.5424/sjar/2016144-10008>
- Todd CD (2016) Allantoin Increases Cadmium Tolerance in *Arabidopsis* via Activation of Antioxidant Mechanisms. *Plant Cell Physiol* 57: 2485-2496. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw162>
- Tran TA, Popova LP (2013) Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turk J Bot* 37: 1-13. <https://doi.org/10.3906/bot-1112-16>
- Van Handel E (1968) Direct Microdetermination of Sucrose. *Anal Biochem* 22: 280-283. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90317-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90317-5)
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* 362: 319-334. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Xie Y, Hu L, Du Z, Sun X, Amombo E, Fan J, Fu J (2014) Effects of Cadmium Exposure on Growth and Metabolic Profile of Bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. *PLoS ONE* 9: e115279. <https://doi:10.1371/journal.pone.0115279>
- Wang Y, Gu C, Bai S, Sun Z, Zhu T, Zhu X, Grit DH, Tembrock LR (2016) Cadmium accumulation and tolerance of *Lagerstroemia indica* and *Lagerstroemia fauriei* (Lythraceae) seedlings for phytoremediation applications. *Int J Phytoremediation* 18: 1104-1112. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1183581>
- Weatherburn MW (1967) Phenol Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Anal Chem* 39: 971-974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>
- Wu Z, Zhao X, Sun X, Tan Q, Tang Y, Nie Z, Qu C, Chen Z, Hu C (2015) Antioxidant enzyme systems and the ascorbate-glutathione cycle as contributing factors to cadmium accumulation

and tolerance in two oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) under moderate cadmium stress. Chemosphere 138: 526-536. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.080>

Yadav S, Srivastava J (2017) Cadmium phytoextraction and induced antioxidant gene response in *Moringa oleifera* Lam. Am J plant Physiol 12: 58-70. <https://doi.org/10.3923/aipp.2017.58.70>

Yan H, Filardo F, Hu X, Zhao X, Fu DH (2015) Cadmium stress alters the redox reaction and hormone balance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. Environ Sci Pollut Res 23: 58-69. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5640-y>

Zayneb C, Bassem K, Zeineb K, Grubb CD, Nouredine D, Hafedh M, Amine E (2015) Physiological responses of fenugreek seedlings and plants treated with cadmium. Environ Sci Pollut Res 22: 10679-89. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4270-8>

#### 4 Crescimento e distribuição de nutrientes em plantas jovens de *Viola surinamensis* expostas ao Cádmio<sup>3</sup>

**Resumo:** Entre os metais pesados, o Cd é considerado como um dos mais tóxicos. Assim, tem crescido a demanda por soluções para a recuperação de solos e aquíferos contaminados com altas concentrações desse metal. O objetivo do estudo foi avaliar o crescimento e a concentração de macro e micronutrientes nos diferentes órgãos das plantas jovens de *Viola surinamensis* exposta ao Cd. O experimento foi inteiramente casualizado, com cinco concentrações de Cd (0, 15, 30, 45 e 60 mg L<sup>-1</sup>) por 60 dias. O Cd afetou significativamente o crescimento de *V. surinamensis*, reduzindo a altura, o diâmetro do caule e a produção de biomassa. O Cd influenciou negativamente na concentração do Fe, Mg, Ca, N, P e K, especialmente na raiz. O Zn aumentou nas raízes e folhas, enquanto o Mn reduziu na raiz e aumentou nas folhas das plantas com Cd. Todas as plantas sobreviveram até o final do experimento. O aumento do Zn e Mn nas folhas pode ter sido uma estratégia para manter a estabilidade e a proteção do aparato fotossintético da planta.

**Palavras-chave:** Biomassa, NPK, Zinco, Manganês.

---

<sup>3</sup> Artigo de acordo com as normas da revista Journal of Agricultural Science

**Abstract:** Among heavy metals, Cd is considered to be one of the most toxic. Thus, the demand for solutions for the recovery of soils and aquifers contaminated with high concentrations of this metal has grown. The objective of the study was to evaluate the growth and concentration of macro and micronutrients in the different organs of young plants of *Virola surinamensis* exposed to Cd. The experiment was completely randomized, with five concentrations of Cd (0, 15, 30, 45 and 60 mg L<sup>-1</sup>) for 60 days. The Cd significantly affected the growth of *V. surinamensis*, reducing the height, stem diameter and biomass production. The Cd influenced negatively in Fe, Mg, Ca, N, P and K, especially in the root. The Zn increased in the roots and leaves, while the Mn reduced in the root and increased in the leaves of the plants with Cd. All plants survived until the end of the experiment. The increase of Zn and Mn in the leaves may have been a strategy to maintain the stability and protection of the photosynthetic apparatus of the plant.

**Keywords:** Biomass, NPK, Zinc, Manganese.

## 4.1 Introdução

O aumento dos níveis de Cádmio (Cd) e a sua persistência nos ecossistemas tem despertado uma grande preocupação (Liu et al., 2015). Isto porque, mesmo em baixa concentração, o Cd pode ter efeitos tóxicos nos organismos aquáticos e do solo, incluindo plantas e animais, e, finalmente, sobre a saúde humana (Khan et al., 2017).

O Cd é um metal pesado não essencial que é prontamente absorvido pela raiz da planta por meios de transportadores de nutrientes essenciais (Bashir et al., 2015), e, dependendo da concentração, pode interferir na captação, transporte e utilização de macro e micronutrientes pelas plantas (Di Baccio et al., 2014). Redução de magnésio ( $Mg^{2+}$ ) (Di Baccio et al., 2014; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016; Zouari et al., 2016), cálcio ( $Ca^{2+}$ ), Ferro ( $Fe^{2+}$ ), manganês ( $Mn^{2+}$ ), zinco ( $Zn^{2+}$ ) (He et al., 2013), nitrogênio (N), fósforo (P) (He et al., 2013) e potássio (K) (Gomes et al., 2013) em plantas tratadas com Cd podem causar redução da fotossíntese e resultar em sintomas de fitotoxicidade, como a clorose foliar, especialmente em folhas jovens (Fernández et al., 2013; Elloumi et al., 2014; Yan et al., 2015), baixa produção de biomassa, menor crescimento de raízes, diâmetro e altura de caule, redução do número de folhas e, eventualmente, a morte da planta (Yan et al., 2015; Solti et al., 2016; Nikolić et al., 2017).

No entanto, tolerância ao Cd tem sido observada em várias espécies de plantas, devido desenvolverem diferentes mecanismos eficientes para restringir ou neutralizar o efeito inibitório do excesso do metal (Gallego et al., 2012; Hernández et al., 2015; Wang et al., 2016). Algumas plantas, incluindo *V. surinamensis*, possuem capacidade maior para extrair e acumular o metal na raiz, restringindo o transporte para a parte aérea (Lux et al., 2011; Andrade Júnior et al., 2019). Enquanto outras, denominadas hiperacumuladoras, acumulam grandes quantidades de metais, especialmente nas folhas, sem apresentar sintomas de fitotoxicidade (Singh et al., 2016).

O Cd, por ser um dos metais pesados mais tóxicos e com alta capacidade de bioacumulação, tem estimulado a procura por soluções para remediar ambientes contaminados por ele (Andrade Júnior et al., 2019). Neste sentido, a fitorremediação tem sido proposta como uma das principais técnicas promissoras de descontaminação de solos e água (Zhao et al., 2015). Identificar espécies florestais com ciclo de vida longo, grande produção de biomassa (Caires et al., 2011), tolerantes e com capacidade de fitoextração do Cd podem servir para direcionar estudos e programas de fitorremediação à preservação de áreas naturais e à recomposição de ambientes contaminados por esse metal.

Na Amazônia, estudos envolvendo o efeito do Cd em espécies lenhosas são escassos (Fan et al., 2011; Silva et al., 2017; Pereira et al., 2017). *Virola surinamensis* (Ucuúba) uma espécie florestal, amplamente distribuída e adaptada aos ecossistemas de várzea e igapó na Amazônia, especialmente nos estuários, ambientes potencialmente suscetíveis a presença de metais pesados, apresentou alta acumulação de Cd na raiz e média e alta tolerância ao metal (Andrade Júnior et al., 2019). Espécies com essas características são importantes para fitorremediação de metais. Portanto, embora a *V. surinamensis* tenha apresentado certa tolerância ao Cd, é importante analisar os possíveis danos no crescimento, biomassa e alterações nutricionais da planta ao serem expostas a altas concentrações de Cd.

Neste estudo, testamos a hipótese de que plantas jovens de *V. surinamensis* desencadeiam diferentes mecanismos para tolerar ambientes contaminados por Cd. Sendo assim, objetivou-se avaliar (1) o crescimento da planta em diferentes concentrações de Cd e (2) a concentração de micro e macronutrientes na raízes e folhas das plantas jovens de *V. surinamensis* submetidas as diferentes concentrações de Cd.

## 4. 2 Material e métodos

### 4. 2. 1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) em Belém, estado do Pará, Brasil (01 ° 27'21 " S, 48 ° 30'16 " W) no período de 15 de setembro de 2017 a 14 de novembro de 2017. De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima é do tipo Af (Floresta tropical), com precipitação média anual de 2921,7 mm, temperatura média de 25,9 °C, umidade relativa média de 86,8% e velocidade do vento de 1,35 m s<sup>-1</sup>. (Ramos et al., 2009).

### 4. 2. 2 Material da planta e condição de crescimento

Sementes de *V. surinamensis* foram coletadas na área da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental), localizada em Belém, Estado do Pará, Brasil (01° 26'44.2 " S, 48° 25'03.8 " W). Essas sementes foram semeadas em bandejas de polietileno de 5-L contendo areia e serragem esterilizada (1:1, v/v), sendo mantidas sob temperatura média do ar ( $T_{air}$ ) e umidade relativa do ar (UR) de 28 °C e 90%. Após a

emergência, as plântulas contendo o primeiro par de eófilos foram transplantadas para vasos de polietileno de 10-L contendo latossolo amarelo e cama aviário (3:1, v/v). As mudas foram cultivadas em casa de vegetação por 180 dias, sendo irrigadas diariamente para repor a água perdida pela evapotranspiração. Posteriormente, as plantas jovens foram removidas, as raízes lavadas com água desionizada e transferidas para vasos de Leonard de 5-L contendo areia esterilizada e lavada e 800mL de solução nutritiva de Sarruge (1975), substituídas semanalmente e constituídas de ( $\mu\text{M}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 400;  $\text{KNO}_3$ , 2000;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2000;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 800;  $\text{FeEDTA}$ , 400;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 400;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 400;  $\text{ZnCl}_2$ , 400;  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 400 e  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 400. O pH foi mantido a  $5,9 \pm 0,2$ , utilizando HCl e NaOH. A força iônica foi iniciada em 25% (10 dias) e aumentada para 50% (35 dias), permanecendo por um período de aclimatização de 45 dias.

#### 4. 2. 3 Delineamento Experimental e avaliação dos tratamentos

Após 45 dias de cultivo, as plântulas mais uniformes considerando a altura, o diâmetro do caule e o número de folhas, foram submetidas a cinco concentrações de Cd (tratamentos) da seguinte maneira:  $0 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$  (controle), 15, 30, 45, e  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CdCl}_2$ . As doses de Cd foram determinadas com base na Resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA (Brasil, 2009), que estabelece critérios e valores norteadores da qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete repetições, por tratamento, totalizando 35 unidades experimentais. Uma única planta por vaso foi considerada uma réplica. Todas as variáveis para comparações de tratamento foram avaliadas 60 dias após a diferenciação do tratamento com Cd.

#### 4. 2. 4 Parâmetros de Crescimento

Foram mensuradas a altura da planta, medida da base do coleto até a gema apical da planta (cm), diâmetro do caule, medido a 4 cm em relação ao colo, utilizando um paquímetro digital (cm) modelo ZAAS precision, o número de folhas foi obtido através da contagem; para a detreminação da matéria seca, as plantas de cada tratamento, foram levadas ao Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), localizado na UFRA, onde foram separadas em raiz e parte aérea e acondicionadas, separadamente, em sacos de papel de massa conhecida para posterior secagem em estufa de ventilação forçada à  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  até obtenção da

massa constante. Cada parte da planta foi pesada em uma balança analítica para determinação da massa seca da raiz (MSR), massa seca do caule (MSC), massa seca da folha (MSF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca total (MST), determinada pela soma da MSR e MSPA. Com os valores dos pesos das MSR e da MSPA, foi calculada a razão entre MSR e MSPA (R/PA). Após a pesagem, a matéria seca foi moída e armazenada em tubos de Falcon para, posteriormente, serem utilizadas nas análises bioquímicas. Parte do material seco foi levado para o Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) para análise da concentração de micro e macronutrientes nas raízes e folhas das plantas.

#### 4. 2. 5 Análise de macro e micronutrientes

As análises de macro e micronutrientes foram processadas em triplicata. Magnésio (Mg), Cálcio (Ca), Ferro (Fe), Zinco (Zn) e Manganês (Mn) foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Miyazawa et al. (2009), com adaptações. A matéria seca (0,5 g) de cada amostra foi digerida em tubo digestor com 8 mL de solução de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) + ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (3: 1). Após o arrefecimento, a solução no tubo foi filtrada e diluída com água desionizada até um volume final de 50 mL. Os teores de Mg, Ca, Fe, Zn e Mn foram determinados nesta solução por espectrometria de absorção atômica (Thermo Scientific ICE 3000). Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) foram analisados segundo a metodologia proposta por Tedesco et al., (1995). Amostras de 0,2 g de matéria seca foram submetidas à digestão com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). O N foi determinado por titulação com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,0025 N, após destilação. O P foi determinado por espectrofotometria e o K por fotometria de chama.

#### 4. 2. 6 Análise dos dados

Os dados experimentais foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para as variáveis paramétricas, as médias dos tratamentos foram submetidas ao PROC GLM, teste HSH post hoc de Tukey e correlação entre variáveis pelo PROC CORR linear de Pearson utilizando o software SAS 9.1.3 (SAS, 2007). Para as variáveis não paramétricas, os dados foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni pelo software RStudio versão 1.1.383. Os dados experimentais de todas as análises foram avaliados a 5% de significância.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Efeito do Cd nos parâmetros de crescimento

Durante o experimento, foram observados sintomas de fitotoxicidade do metal como raízes menores e necrosadas, independentemente da concentração do metal (Figura.1 *A, B*). Além disso, exibiram folhas menores e sintomas de clorose interveinal (Figura 1 *A, B*).

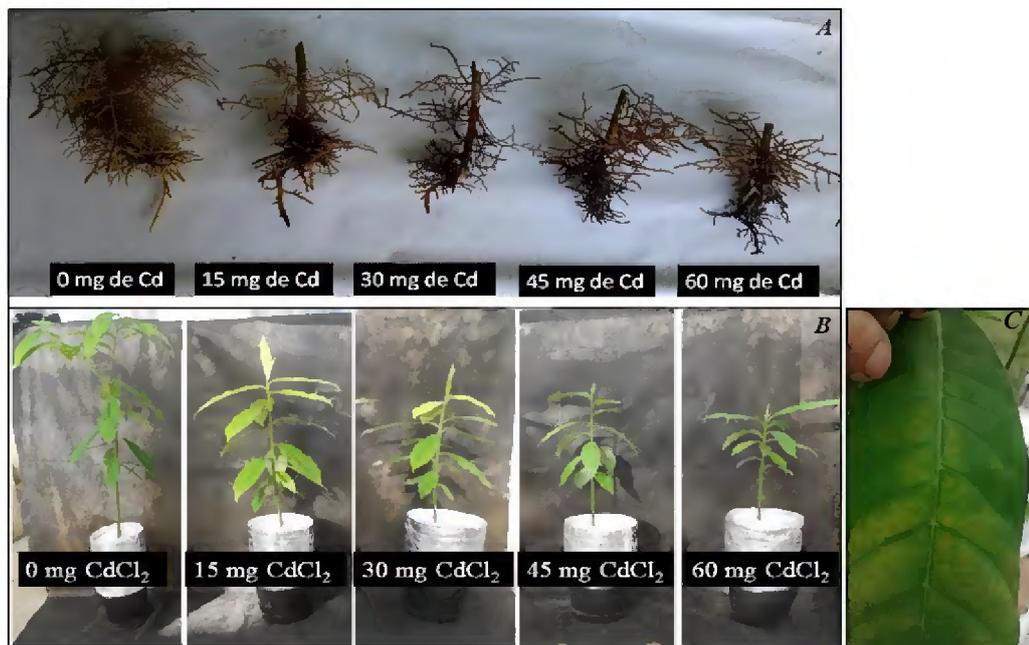


Figura 1. *A*: Raízes menores e necrosadas, *B*: folhas menores e cloróticas, *C*: detalhe da clorose interveinal em *V. surinamensis* após 60 dias de exposição ao cádmio.

A altura, o diâmetro, o número de folhas e a biomassa de todas as plantas expostas ao Cd durante 60 dias foram significativamente menores do que as do grupo controle (Figuras 2, 3). O crescimento em altura nas plantas tratadas com Cd (60 mg Cd) foi 56,8% menor em relação ao controle (Figura 2 *A*). No mesmo tratamento (60 mg Cd), o diâmetro do caule e o número de folhas foram 53,6 e 62,6% menores em relação ao controle, respectivamente (Figura 2 *B, C*).

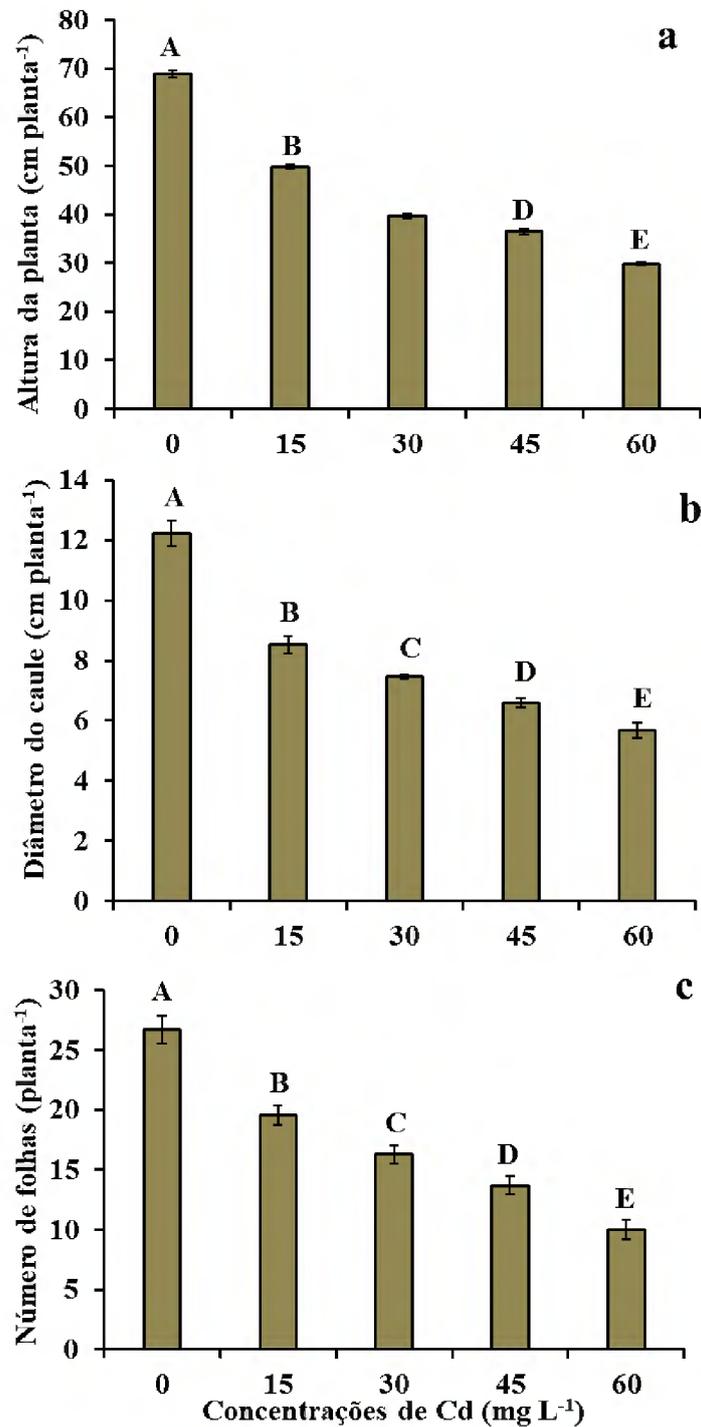


Figura 2. A: Altura, B: diâmetro, C: número de folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

Em comparação ao tratamento controle (0 mg Cd), MSR, MSC, MSF e MST reduziram em 60,4, 57,5, 48,0 e 62,5%, respectivamente, nas concentrações de 60 mg Cd (Figura 3). A MSPA e R/PA foram reduzidas em 53,1 e 15,4%, respectivamente (Figura 3), na maior

concentração de Cd (60 mg) em comparação ao controle (0 mg Cd). Todas as plantas sobreviveram até o final do experimento.

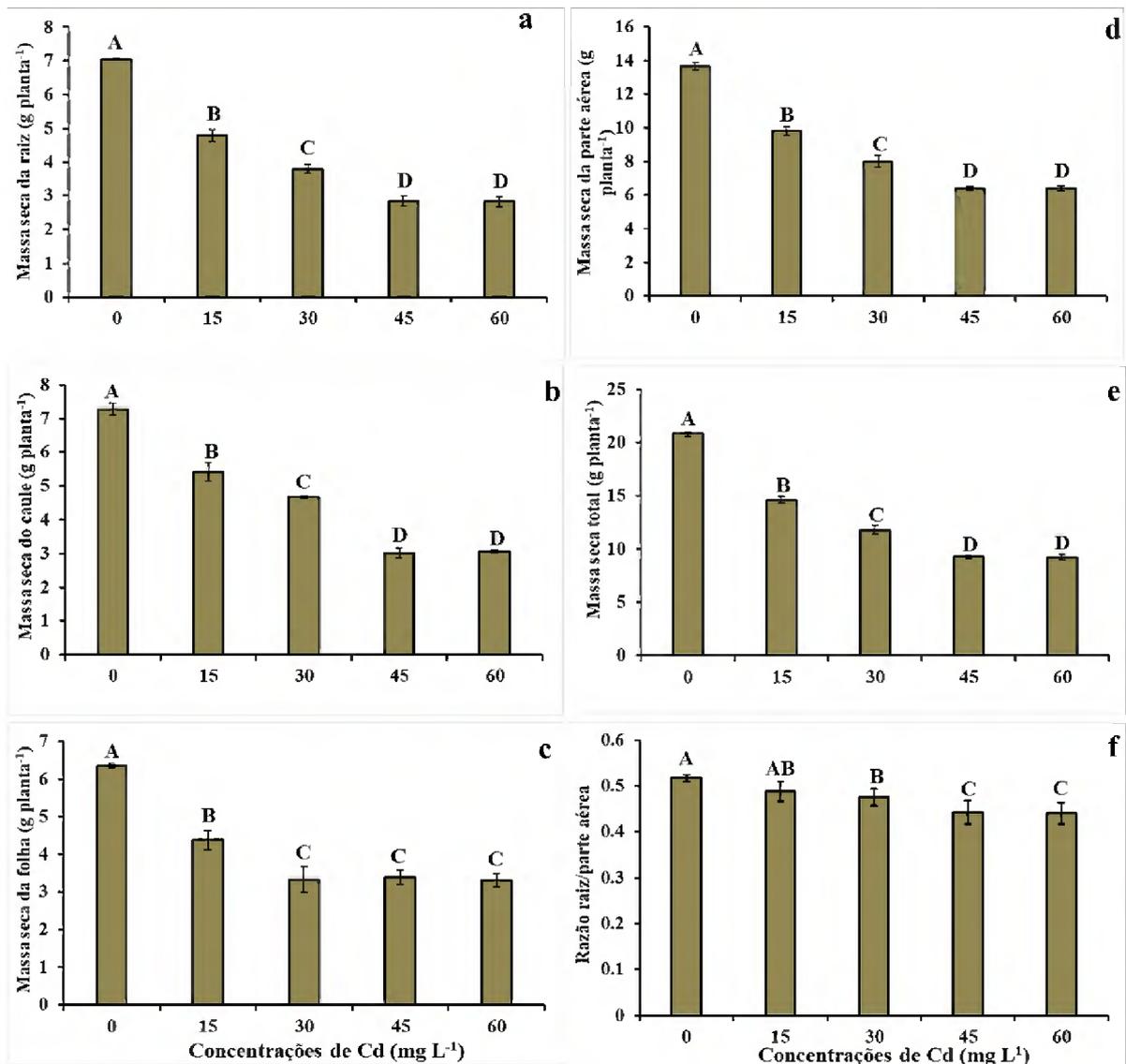


Figura 3. A: Massa seca da raiz, B: massa seca do caule, C: massa seca da folha, D: massa seca da parte aérea, E: massa seca total, F: razão raiz/parte aérea em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

#### 4. 3. 2 Efeito do Cd nas concentrações de macro e micronutrientes

As concentrações de Fe e Mg nas plantas submetidas ao estresse por Cd foram significativamente menores do que as do grupo controle (Figura 4), exceto para o Fe na dosagem de 45 mg de Cd nas folhas (Figura 4 B). Os menores valores de Fe foram 35,6 e 5,6% nas raízes (15 mg L<sup>-1</sup> Cd) e folhas (30 mg L<sup>-1</sup> Cd), respectivamente, em relação ao tratamento controle. O Mg reduziu, 38,1 e 21% nas raízes (45 mg L<sup>-1</sup> Cd) e folhas (60 mg L<sup>-1</sup> Cd), respectivamente, em comparação ao controle. O Cd afetou significativamente as concentrações

de Ca nas plantas (Figura 4). As maiores reduções de Ca foram 36,3 e 20,7% nas raízes (60 mg L<sup>-1</sup> e folhas (45 mg L<sup>-1</sup> Cd), respectivamente, em comparação ao controle (Figura 4).

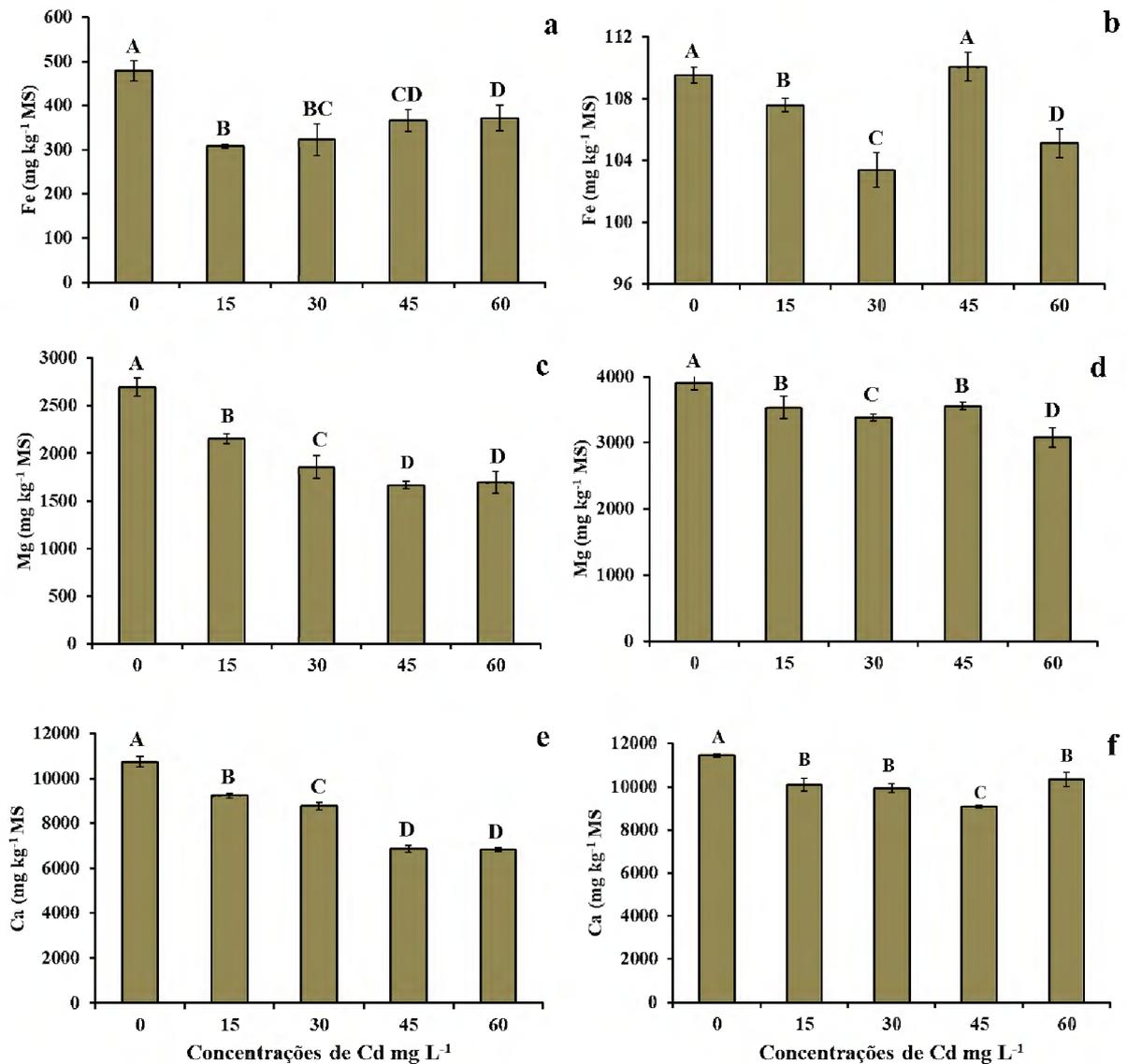


Figura 4. *A*: Concentração de Fe na raiz, *B*: concentração de Fe nas folhas, *C*: concentração de Mg na raiz, *D*: concentração de Mg nas folhas, *E*: concentração de Ca na raiz, *F*: concentração de Ca nas folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

Em comparação com o tratamento sem Cd, o Zn aumentou significativamente nas raízes (Figura 5 *D*), atingindo valores de 42,1% na dosagem de 30 mg L<sup>-1</sup> Cd. Nas folhas, o Zn aumentou significativamente nas dosagens de 45 e 60 mg L<sup>-1</sup> Cd (Figura 5 *B*), atingindo o valor de 17,5% (60 mg L<sup>-1</sup> Cd) menor em relação ao controle. O Mn reduziu significativamente na raiz e aumentou significativamente nas folhas, exceto para a dosagem de 30 mg L<sup>-1</sup> Cd (Figura 5). Na raiz o Mn reduziu 43,5% (60 mg L<sup>-1</sup> Cd) em relação ao controle. Nas folhas, a maior redução do Mn foi de 33% (40 mg L<sup>-1</sup> Cd) em comparação ao controle.

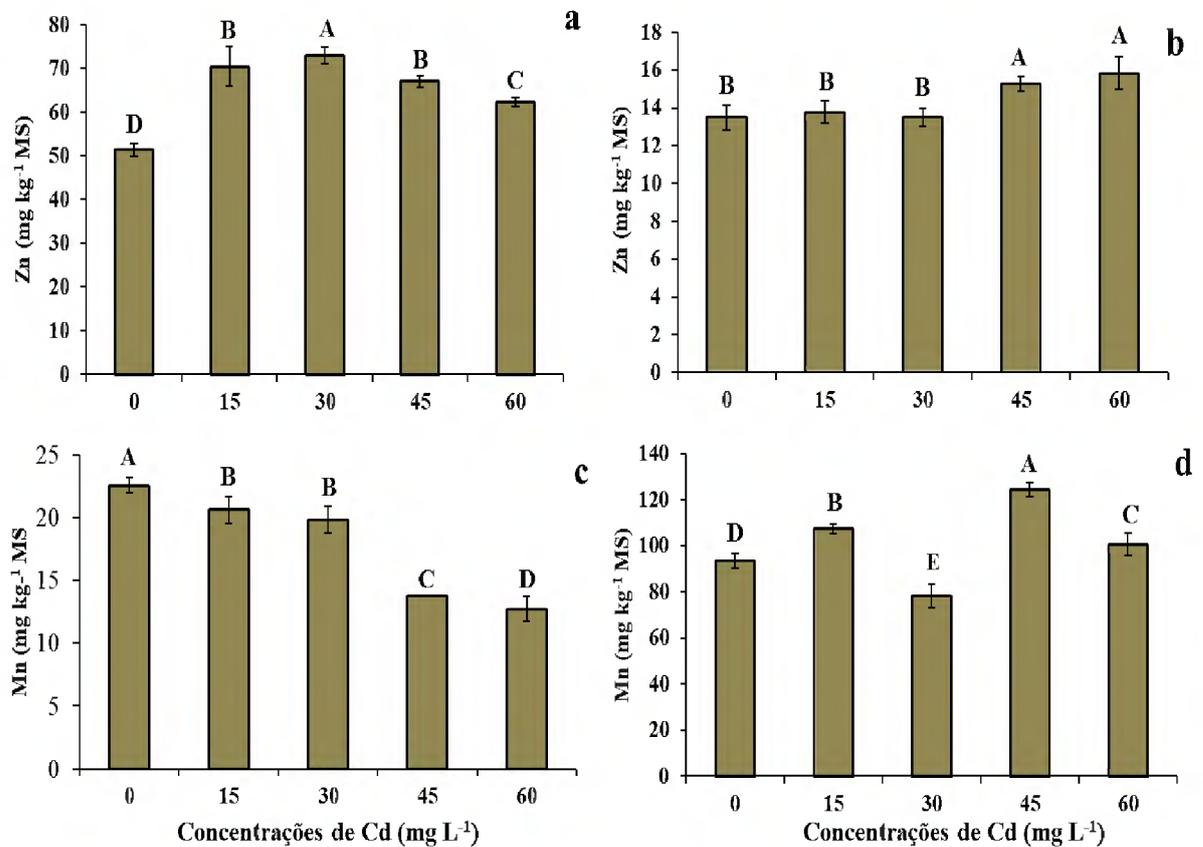


Figura 5. A: Concentração de Zn na raiz, B: concentração de Zn nas folhas, C: concentração de Mn na raiz, D: concentração de Mn nas folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Kruskal-Wallis ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

O Cd afetou significativamente o N, P e K, tanto nas raízes como nas folhas (Figura 6). Nas raízes, os menores valores de N, P e K, foram, respectivamente, 29,4 (60 mg L<sup>-1</sup> Cd), 46,1 (15 mg L<sup>-1</sup> Cd) e 7,8% (45 mg L<sup>-1</sup> Cd) em relação ao controle. Nas folhas, a maior redução do N, P e K foi de 39,6 (45 mg L<sup>-1</sup> Cd), 63,8 (60 mg L<sup>-1</sup> Cd) e 38% (45 mg L<sup>-1</sup> Cd), respectivamente.

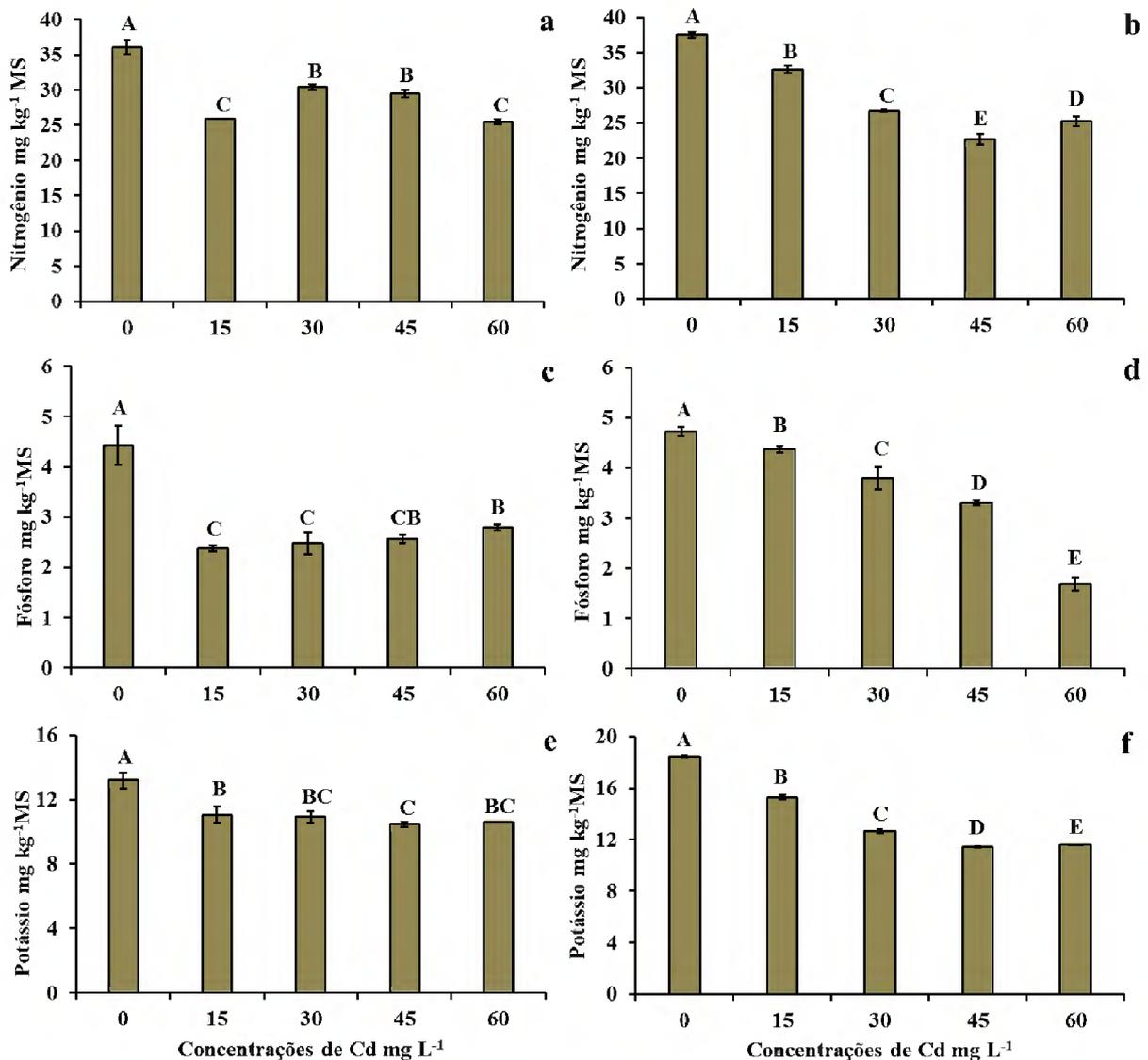


Figura 6. *A*: Concentração de N na raiz, *B*: concentração de N nas folhas, *C*: concentração de P na raiz, *D*: concentração de P nas folhas, *E*: concentração de K na raiz, *F*: concentração de K nas folhas em plantas jovens de *V. surinamensis* exposta a cinco concentrações de cádmio (0, 15, 30, 45 e 60 mg). Letras diferentes para concentrações de cádmio em solução indicam diferenças significativas no teste de Tukey ( $P < 0.05$ ). Média  $\pm$  DP,  $n = 7$ .

#### 4. 4 Discussão

O efeito negativo nos parâmetros de crescimento em *V. surinamensis* exposta ao Cd (Figuras 1, 2) estão de acordo com os obtidos em outras espécies arbóreas (Zouari et al., 2016; Pereira et al., 2017; Nikolić et al., 2017). A toxicidade do Cd em *V. surinamensis*, mais acentuada nas raízes, evidenciada pela inibição do seu crescimento, especialmente nas maiores concentrações do metal (Figura 1A), pode ser explicada pelo efeito direto do Cd e seu maior acúmulo nesse órgão da planta. De fato, em muitas espécies de plantas, incluindo a Ucuúba, o

Cd é acumulado principalmente nas raízes e, em menor concentração, na parte aérea (Pereira *et al.* 2017; Nikolić *et al.* 2017; Andrade Júnior *et al.*, 2019). Isso tem causado retardamento do crescimento das raízes, suberização, danos às estruturas das raízes internas e externas (Dai *et al.*, 2013). O maior efeito negativo do Cd na raiz também pode ser atribuída a alteração no equilíbrio redox celular pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Yan *et al.*, 2015, Singh *et al.*, 2016; Zouari *et al.*, 2016) que resultou na morte celular e defeitos no crescimento e desenvolvimento da raiz na zona de alongamento e meristemática (Abozeid *et al.*, 2017). No entanto, a redução do sistema de raiz para esta espécie não foi limitante para a sua sobrevivência durante o período de exposição ao Cd.

Por outro lado, o menor crescimento de raízes, caule e folhas (Figuras 1 e 2) em *V. surinamensis* sob Cd pode ser devido à redução da produção de biomassa (Figura 3) por alterações na fotossíntese e redução na absorção de nutrientes que resultou na baixa síntese de fotoassimilados. Reduções na biomassa relacionada à menor atividade fotossintética sob efeito do Cd foram observadas por Chaves & Souza (2014). Dependendo da concentração, o Cd pode interferir na captação, transporte e utilização de íons minerais pelas plantas (Di Baccio *et al.*, 2014). Sendo assim, sugere-se que o Cd, possivelmente, competiu com os íons pelo mesmo sistema de captação, afetando a absorção e assimilação dos macros e micronutrientes resultando na perda da atividade fotossintética e, conseqüentemente, na redução da massa seca (Tabela 1) em *V. surinamensis*. De outra forma, o Cd pode ter afetado as células meristemáticas da raiz e parte aérea, causando diminuição na massa seca desses órgãos (Abdul Qados, 2015). A biomassa é o principal indicador de acumulação de energia nas plantas (Zang *et al.*, 2014). Sendo assim, a sobrevivência da planta em condições de estresse por Cd é dependente de um balanço na distribuição de fotoassimilados entre as suas várias partes. A menor razão raiz parte aérea em *V. surinamensis* sob o efeito do Cd (Figura 3) indica que o crescimento do sistema de raiz foi mais fortemente reduzido do que a parte aérea. Isso pode ser explicado pelo maior acúmulo de Cd na raiz de *V. surinamensis* (Andrade Júnior *et al.*, 2019), fato que pode ter contribuído para a menor absorção e transporte de macro e micronutrientes (Figuras 4, 5 e 6). Por outro lado, a menor razão da biomassa raiz parte aérea pode ser uma estratégia de tolerância ao metal, reservando menos energia às raízes para reduzir a absorção de Cd e o maior investimento de energia nas folhas para a manutenção das funções vitais. Resultados similares foram evidenciados em outras espécies arbóreas submetidas ao Cd (Abdul Qados, 2015; Silva *et al.*, 2017; Nikolić *et al.*, 2017).

Redução de minerais como o  $Mg^{2+}$  (Di Baccio et al., 2014; Liu et al., 2015; Wang et al., 2016; Zouari et al., 2016),  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  em plantas tratadas com Cd, provavelmente, ocorre devido o  $Cd^{2+}$  competir com os transportadores de membrana daqueles minerais (He et al., 2013). Neste estudo, a menor concentração de Mg e Fe nas plantas expostas ao Cd (Figura 4) indica que o metal pesado interferiu na absorção desses nutrientes na raiz e no transporte para a parte aérea da planta. Provavelmente, o Cd competiu com esses minerais via transportadores de membrana (He et al., 2013), limitando a disponibilidade de Mg e Fe na planta. Além disso, o Cd pode ter inibido a ferro quelato redutase e interferido na absorção do Fe (Parmar et al., 2013). Assim, em *V. surinamensis* exposta ao Cd, a redução do Mg e do Fe podem ter afetado negativamente as moléculas de clorofila, resultando nos sintomas de clorose interveinal (Fig 1) e, possivelmente, na diminuição da fotossíntese. Isso porque o Mg e Fe, nutrientes essenciais para a biossíntese de clorofila (Di Baccio et al., 2014; He et al., 2013, Huang et al., 2015) podem ter sido substituído pelo Cd. De fato, o Cd pode substituir o Mg central da molécula de clorofila (Bashir et al., 2015) ou o Fe que seria usado na síntese do  $\delta$ -aminolevulínico (ALA-D) e na formação do protoclorofilídio (Parmar et al., 2013). Isto pode levar, a um efeito adverso no metabolismo da clorofila e, subsequentemente, a redução de fotoassimilados e ao menor crescimento da planta. Além disso, a deficiência de Fe nas plantas tratadas com Cd, afeta negativamente o complexo multiprotéico (MPCs), incluindo o fotossistema II e I, o LHC, o Cytb6f e ATPase, (Basa et al., 2014; Bashir et al., 2015), que mantém ligado muitos transportadores de elétrons. Isso ocorre, pelo menos em parte, devido o Cd substituir o Ferro (Fe) de sua interação com o enxofre S (S) (Fe-S) em proteínas de MPCs (Bashir et al., 2013), alterando, possivelmente, a atividade biológica das proteínas e afetando o transporte de elétrons até a ferredoxina, resultando na diminuição da fotossíntese. Por outro lado, o menor acúmulo de Fe nas plantas com Cd pode ter sido uma estratégia de proteção das biomembranas contra EROs. Isto porque tem sido relatado que o aumento do Fe em plantas submetidas ao Cd leva à desestabilização de membranas pela síntese de enzima lipoxigenase, pois está envolvido diretamente na produção de EROs através da reação de Fenton e Haber-Weiss (Kumar et al., 2018). Di Baccio et al. (2014) estudando espécies arbóreas submetidas ao Cd, observaram aumento do Fe e redução do Mg.

O Ca atua como mensageiro secundário que modula a atividade de uma variedade de proteínas (Eller & Brix, 2016). Sendo assim, o deslocamento do Ca da proteína calmodulina pelo Cd pode interferir na sua capacidade de funcionar corretamente na transdução de sinal e na regulação transcricional (Dal Corso, Manara, & Furini, 2013). O Ca também é um cofator

essencial do núcleo catalítico inorgânico ( $Mn_4CaO_xCl_y$ ) no fotossistema II (PSII) e desempenha papel importante na estabilidade da clorofila (Huang et al., 2017), no fluxo de elétrons dos fotossistemas e reações de metabolismo dependentes de luz (Hochmal et al., 2015). Ademais, o Ca é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Huang et al., 2017). Sendo assim, sugere-se que o Cd pode ter substituído o Ca durante a formação do núcleo catalítico e afetado a eficiência fotoquímica do PSII ou por competição, reduzindo absorção do Ca pelas raízes, resultando na diminuição da molécula de clorofila e afetado a atividade fotossintética da planta, o que influenciou negativamente na altura, no crescimento da raiz e na produção de biomassa de *V. surinamensis* (Figura 2 e 3). Redução do  $Ca^{2+}$  foi evidenciada em outras espécies arbóreas submetidas ao Cd (Di Baccio et al., 2014).

Tem sido relatado que o Cd pode danificar o DNA das plantas através da ativação de enzimas de restrição e/ou devido a produção de oxidantes como o radical hidróxila (OH) (Paunov et al., 2018). Além disso, O Cd pode deslocar co-fatores essenciais, como Mn e o Zn, e se ligar a grupos funcionais (sulfidril, -SH) das proteínas e enzimas e causar inativação ou desnaturação desses compostos orgânicos (Dal Corso et al., 2013), podendo levar a vários distúrbios metabólicos (Yan et al., 2015). Desta forma, sugere-se que o aumento do Zn (Figura 5) nas raízes e folhas de *V. surinamensis* submetidas ao estresse por Cd, seria uma resposta da planta para proteção do DNA por inibição de endonucleases e do radical OH, ou para proteção do grupo -SH, possivelmente para minimizar danos oxidativos causados pelo Cd ao material genético e proteínas da planta. O estresse por Cd induz alterações do equilíbrio redox celular resultando no aumento de EROs, como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Zouari et al., 2016) que pode causar oxidação de lipídios da membrana, proteínas e ácidos nucleicos, alterações na estrutura da parede celular, degeneração de cloroplastos, mitocôndrias (HE et al., 2013), pigmentos, enzimas (WANG et al., 2015) e vazamento de eletrólitos (ZOUARI et al., 2016). Assim, o aumento do Zn em *V. surinamensis* pode ter desempenhado um papel importante na síntese de enzima antioxidante, pois constitui o cofator da Zn-SOD associada ao cloroplasto (Nagajyoti et al. 2010). O que de certa forma, poderia, pelo menos em parte, regular o potencial redox celular e sustentar ou restaurar o centro de reação do PSII e a atividade fotossintética das plantas (Solti et al., 2016). Resultado contrastante em relação do Zn foi observado em outras espécies arbóreas submetidas ao Cd (Di Baccio et al., 2014).

Proteínas de transporte de membrana da família ZIP e Nramp estão envolvidos na absorção e translocação de Zn e Mn da raiz para a parte aérea da planta, em diferentes níveis, e o Cd pode inibir esses transportadores (Wu et al., 2016; Akhtar et al., 2017) ou o Cd pode

competir com o Zn e Mn via membrana celular pelos mesmos sítios de captação (Printz et al., 2013). Neste estudo, o aumento na concentração de Zn na raiz e a redução do Mn nesse órgão (Figura 5), sugere que o Cd não interferiu na absorção do Zn, mas afetou ou competiu com os transportadores de membrana para Mn resultando na menor absorção do micronutriente. Por outro lado, o aumento do Zn e Mn nas folhas (Figura 5) indica que o Cd, possivelmente, não inibiu os transportadores envolvido na translocação desses minerais. A menor concentração de Mn na raiz de *V. surinamensis* exposta ao Cd, pode ter afetado o crescimento e a funcionalidade do sistema de raiz. Entretanto, o Mn é necessário na reação de oxidação da água no PSII (Schmidt et al., 2016) e, o seu aumento nas folhas da planta com Cd (Figura 5 B) pode ter sido uma estratégia para manter a estabilidade e a atividade fotossintética do PSII, ainda que afetada pelo Cd (Andrade Júnior et al. 2019). Além disso, o Mn pelo seu papel como cofator, possivelmente, foi essencial na produção da enzima antioxidante Mn-SOD associada aos glioxissomos (Nagajyoti et al., 2010). Redução do Mn foi evidenciada em outras espécies arbóreas submetidas ao Cd (Printz et al., 2013).

Tem sido observada redução do nitrogênio (N), fósforo (P) (He et al., 2013) e potássio (K) em plantas expostas ao Cd (Gomes et al., 2013). O nitrogênio (N) é um macronutriente essencial, pois é o principal constituinte de muitos compostos estruturais, genéticos e metabólicos em plantas (Kulcheski et al., 2015), como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas e hormônios, que desempenham papel importante no crescimento geral das plantas (Singh et al., 2016). Pesquisas revelam, que o Cd afeta negativamente o metabolismo do nitrogênio, devido ativação ou inativação de proteínas e enzimas envolvidas na absorção, transporte e assimilação do N, resultando em reduções deste nutriente nos tecidos da planta (Nikolić et al., 2017; Liu et al., 2015). Sendo assim, sugere-se que a redução do N (Figura 6) em *V. surinamensis* submetidas as doses de Cd pode ter causado alterações no metabolismo do nitrogênio, com efeito negativo no crescimento (Figura 2) e na produção da biomassa vegetal (Figura 4). Por outro lado, a redução do N pode ter ocorrido pela sua utilização na síntese de aminoácidos, como a prolina, formando complexo Cd-prolina não tóxico nos tecidos da planta para reduzir a fitotoxicidade do metal (Chen et al., 2001; Aslam et al., 2014).

O P é constituinte dos ácidos nucleicos e dos fosfolipídios da membrana celular e indispensável para a reação de fosforilação (Singh et al., 2016). O P é importante em vários processos metabólicos e fisiológicos, como a síntese de pigmentos, proteínas e enzimas, metabolismo energético e fotossintética, crescimento e desenvolvimento da planta (Kumar et al. 2018). Estudos apontam efeito antagônico entre o Cd e o fosfato na solução (Cui et al., 2016).

Uma possível explicação, seria porque o Cd se associa aos íons fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) formando complexos insolúveis  $\text{Cd-H}_2\text{PO}_4$ , o que limitaria a mobilização e a biodisponibilidade do  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Siebers et al., 2013). Sendo assim, sugere-se que redução do P em *V. surinamensis* tratadas com Cd ocorreu devido à sorção do Cd ao P na solução ou nos compartimentos celulares e subcelulares da planta, o que limitou a disponibilidade do P (Figura 6), como relatado em outros estudos (Degola et al., 2014). E isso, possivelmente, pode ter interferido na síntese de ATP e conseqüentemente, nas vias de energia intracelular (Dal Corso et al., 2013) ou na formação da RubisCo, afetando a fotossíntese por limitações da capacidade de carboxilação da enzima, resultando na menor produção de fotoassimilados (Singh et al., 2016), causando assim menor crescimento da planta (Figura 2). Por outro lado, a redução do P pode estar relacionada a síntese de açúcares, através do ciclo das pentoses-fosfato, para eliminar ou manter os níveis de EROS sob controle e, assim, reparar os efeitos tóxicos dos oxidantes (El-Beltagi & Mohamed, 2013).

O K é um macronutriente essencial envolvido em várias vias de sinalização (Kulcheski et al., 2015), como no alongamento celular, na osmorregulação, ativa um complexo de várias enzimas que auxiliam no movimento estomático, fotossíntese, síntese de carboidratos solúveis, proteína e compostos contendo nitrogênio solúvel (Ahmad et al., 2016; Singh et al., 2016). Sugere-se que a redução do K em *V. surinamensis* sobre efeito do Cd, pode ter causado alterações no potencial osmótico e interferido no potencial hídrico, na translocação de íons minerais e aminoácidos ou inativando enzimas envolvidas na fotossíntese resultando em reduções nos parâmetros de crescimento vegetativo (Figura 2). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos por Kapoor et al. (2013).

#### 4. 5 Conclusão

O Cádmio afetou a absorção e a translocação de Fe, Mg, Ca, N, P e K, e interferiu negativamente no crescimento e na produção de biomassa de *V. surinamensis*.

O aumento do Zn e Mn nas folhas, sugere estratégia da planta para manter a estabilidade e a proteção do aparato fotossintético contra a toxicidade do Cd.

## Fontes de financiamento

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior no Brasil (CAPES), Código Financeiro 001, e, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil).

## Conflito de interesses

Nenhum declarado.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Grupo de Estudos sobre Biodiversidade em Plantas Superiores da Universidade Federal Rural da Amazônia pelas colaborações de pesquisadores.

## Referências

- Abdul Qados, A.M.S. (2015). Phytoremediation of PB and CD by native tree species grown in the Kingdom of Saudi Arabia. *India Journal Scientific Research and Technology*, 3, 22-34. doi:10.5251/abjna.2015.6.1.8.21
- Abozeid, A., Ying, Z., Lin, Y., Liu, J., Zhang, Z., Tang, Z. (2017). Ethylene Improves Root System Development under Cadmium Stress by Modulating Superoxide Anion Concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plants Science*, 8, 253. doi: 10.3389/fpls.2017.00253
- Akhtar, T., Zia-ur-Rehman, M., Naeem, A., Nawaz, R., Ali, S., Murtaza, G., ... Rizwan, M. (2017). Photosynthesis and growth response of maize (*Zea mays* L.) hybrids exposed to cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research international*, 24, 5521-5529. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8246-0>
- Andrade Júnior, W.V., Oliveira Neto, C.F., Santos Filho, B.G., Amarante, C.B., Cruz, E.D., Okumura, R.S., ... Botelho, A.S. (2019). Effect of cadmium on young plants of *Vriola surinamensis*. *AoB Plants*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plz022>
- Aslam, R., Ansari, M.Y.K., Choudhary, S., Bhat, T.M., Jahan, N. (2014) Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of

- DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annuum* L. An important spice crop of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21, 465-472. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.07.005>
- Basa, B., Lattanzio, G., Solti, Á., Tóth, B., Abadía, J., Fodor, F., Sárvári, É. (2014). Changes induced by cadmium stress and iron deficiency in the composition and organization of thylakoid complexes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 101, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.026>
- Bashir, H., Ahmad, J., Bagheri, R., Nauman, M., Qureshi, M.I. (2013). Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards nonsulfur tolerance under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.05.004>
- Bashir, H., Qureshi, M.I., Ibrahim, M.M., Iqbal, M. (2015). Chloroplast and photosystems: Impact of cadmium and iron deficiency. *Photosynthetica*, 53, 1-15. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0152-z>
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Resolução Conama n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 249, p. 81-84, 2009.
- Caires, S.M., Fontes, M.P.F., Fernandes, R.B.A., Neves, J.C.L., Fontes, RLF. (2011). Desenvolvimento de mudas de Cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. *Revista Árvore*, 35, 1181-1188. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-67622011000700004>
- Chaves, L.H.G, Souza, R.S. (2014). Crescimento, distribuição e acumulação de cádmio em plantas de *Jatropha curcas*. *Revista de Ciências Agrárias*, 37, 286-291.
- Chen, C.T., Chen, L.M., Lin, C.C., Kao, C.H. (2001). Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science*, 160, 283-290. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00393-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00393-9)
- Cui, X., Hao, H., Zhang, C., He, Z., Yang, X. (2016). Capacity and mechanisms of ammonium and cadmium sorption on different wetland-plant derived biochars. *Science of the Total Environment*, 539, 566-575. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.022>
- Dal Corso, G.; Manara, A.; Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics*, 5, 1117-1132. doi: 10.1039/c3mt00038a
- Degola, D.F., Benedictis, M., Petraglia, A., Massimi, A., Fattorini, L., Sorbo, S., Basile, A., Toppi, L. S. (2014). A Cd/Fe/Zn-Responsive Phytochelatin Synthase is Constitutively Present in the Ancient Liverwort *Lumularia cruciata* (L.). *Plant Cell Physiol*, 55, 1884-1891. doi:10.1093/pcp/pcu117

- Di Baccio, D., Castagna, A., Tognetti, R., Ranieri, A.; Sebastiani, L. (2014). Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. *Journal Plant Physiology*, *171*, 1693-1705. doi: 10.1016/j.jplph.2014.08.007
- El-Beltagi, H.S., Mohamed, H.I. (2013) Alleviation of Cadmium Toxicity in *Pisum sativum* L. Seedlings by Calcium Chloride. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *41*: 157-168. <https://doi.org/10.15835/nbha4118910>
- Elloumi, N., Zouari, M., Chaari, L., Jomni, C., Marzouk, B., Abdallah, F.B.E. (2014). cophysiological responses of almond (*Prunus dulcis*) seedlings to cadmium stress. *Biologia*, *69*, 604-609. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0348-x>
- Eller, F., & Brix, H. (2015). Influence of low calcium availability on cadmium uptake and translocation in a fast-growing shrub and a metal-accumulating herb. *AoB Plants*, *7*, 1-9. doi: 10.1093/aobpla/plv143
- Fan, K.C., His, H.C., Chen, C.W., Lee, H.L., Hseu, Z.Y. (2011). Cadmium accumulation and tolerance of mahogany (*Swietenia macrophylla*) seedlings for phytoextraction applications. *Journal Environmental Management*. *92*, 2818-2822. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.032>
- Gallego, A.S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Iannone, M.F., Rosales, E.P., ... Benavides, M.P. (2012). Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, *83*, 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>
- Gomes, M.P., Lanza Sá, T.C.L., Marques, M., Soares, A.M. (2013). Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. *Biologia*, *62*: 223-230, Section Botany. DOI: 10.2478/s11756-013-0005-9
- Fernández, R., Bertrand, A., Reis, R., Mourato, M.P., Martins, L.L., González, A. (2013). Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. *Journal of Hazardous Materials*, *15*, 555-562. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.10.044. Epub 2012 Oct 30.
- He, J., Li, H., Luo, J. Ma, C., Li, S., Qu, L., ... Luo, Z.B. (2013). Transcriptomic Network Underlies Microstructural and Physiological Responses to Cadmium in *Populus x canescens*. *Plant Physiology*, *162*, 424-439. DOI.org/10.1104/pp.113.215681
- Hernández, L.E., Sobrino-Plata J., Montero-Palmero M.B., Carrasco-gil, S.; Flores-Cáceres, M. L.; Ortega-Villasante, C.; Escobar, C. (2015). Contribution of glutathione to the control of

- cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2901-2911. doi: 10.1093/jxb/erv063
- Hochmal, A.K., Schulze, S., Trompelt, K., Hippler, M. (2015). Calcium dependent regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1847, 993-1003. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.02.010
- Huang, X., Jiang Y., Cheng, X., Deng, L., Liu, X. (2015). Photosynthetic Performance and Anti-Oxidative Response of *Cornus controversa* Seedlings Under Cadmium and Lead Stress. *Bangladesh Journal of Botany*, 44, 215-221. DOI: 10.3329/bjb.v44i2.38510
- Huang, D., Gong, X., Liu, Y., Zeng, G., Lai, C., Bashir, H., ... Wan, J. (2017). Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. *Planta*, 245, 863-873. DOI:10.1007/s00425-017-2664-1
- Kapoor, D., Rattan, A., Bhardwaj R., Kaur S. (2013). Photosynthetic efficiency, ion analysis and carbohydrate metabolism in *Brassica juncea* Plants under cadmium stress. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5, 279-286
- Khan, M.A., Khan, S., Khan, A., Alam, M. (2017). Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the Total Environment*, 601-602, 1591-1605. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.030
- Kulcheski, F.R., Côrrea, R., Gomes, I.A., Lima, J.C., Margis, R. (2015). NPK macronutrients and microRNA homeostasis. *Front Plant Sci.* 6, 451. doi: 10.3389/fpls.2015.00451
- Kumar, R., Gopal, R., Sharma, Y.K. (2018). Influence of cadmium and phosphorus enhance absorption and membrane damage in wheat seedlings grown in nutrient medium. *Journal of Plant Nutrition*, 41, 793-805. doi:10.1080/01904167.2018.1426015
- Liu, S.L., Yang, R.J., Ma, M.D., Dan, F., Zhao, Y., Jiang, P., Wang, M.H. (2015). Effects of exogenous NO on the growth, mineral nutrient content, antioxidant system, and ATPase activities of *Trifolium repens* L. plants under cadmium stress. *Acta Physiology Plantarum*. 37, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1721-7>
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M., White, P.J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, 62, 21-37. doi: 10.1093/jxb/erq281
- Miyazawa, M., Pavan, M.A., Muraoka, T., Carmo, C.A.F.S., Melo, W.J. (2009). Chemical Analysis of Plant Tissues. – In: Silva F.C, (ed): Manual of chemical analysis of soils, plants and fertilizers. Pp. 191-233. Embrapa Informação Tecnológica 2009.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216. DOI 10.1007/s10311-010-0297-8

- Nikolić, N., Zorić, L., Cvetković, I. Pajević, S., Borišev, M., Orlović, S., Pilipović, A. (2017). Assessment of cadmium tolerance and phytoextraction ability in young *Populus deltoides* L. and *Populus x euramericana* plants through morpho-anatomical and physiological responses to growth in cadmium enriched soil. *iForest Biogeosciences & Forestry*, 10, 635-644. DOI: 10.3832/ifor2165-010
- Parmar, P., Kumari, N., Sharma, V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botany Studies*, 54, 1-6. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-45>
- Paunov, M., Koleva, L., Vassilev, A., Vangronsveld, J., Goltsev, V. (2018). Effects of Different Metals on Photosynthesis: Cadmium and Zinc Affect Chlorophyll Fluorescence in Durum Wheat. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 1-13. doi: 10.3390/ijms19030787
- Pereira, A.S., Cortez, P.A., Almeida, A.A.F. Prasad, M.N.V., França, M.G.C., Cunha, M., ... Mangabeira, P.A.O. (2017). Morphology, ultrastructure, and element uptake in *Calophyllum brasiliense* Cambess. (*Calophyllaceae* J. Agardh) seedlings under cadmium exposure. *Environmental Science Pollution Research*, 24, 15576–15588. doi: 10.1007/s11356-017-9187-y
- Printz, B., Sergeant, K., Lutts, S., Guignard, C., Renaut, J., Hausman, J.F. (2013). From Tolerance to Acute Metabolic Deregulation: Contribution of Proteomics To Dig into the Molecular Response of Alder Species under a Polymetallic Exposure. *Agricultural and Environmental Proteomics*, 12, 5160-5179. [dx.doi.org/10.1021/pr400590d](https://doi.org/10.1021/pr400590d)
- Ramos, A.M., Santos, L.A.R., Fortes, L.T.G. (2009). Normais climatológicas do Brasil 1961-1990 (1ª edição). Brasília: INMET 2009.
- Sarruge, J.R: (1975). Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, Jaguariúna. 1: 231-233.
- Schmidt, S.B., Jensen P.E., Husted, S. (2016). Manganese Deficiency in plants: The impact on photosystem II. *Trends Plant Science*, 21, 622-632. doi: 10.1016/j.tplants.2016.03.001
- Siebers, N., Siangliw, M., Tongcumpou, C.H. (2013). Cadmium uptake and subcellular distribution in rice plants as affected by phosphorus: Soil and hydroponic experiments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 833-844. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000066>.
- Silva, J.R.R., Fernandes, A.R., Silva Junior, M.L., Santos, C.R.C., Lobato, A.K.S. (2017). Tolerance mechanisms in *Cassia alata* exposed to cadmium toxicity – potential use for phytoremediation. *Photosynthetica*, 55, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0698-z>

- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P.; Prasad, S. M. (2016). Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1143. doi: 10.3389/fpls.2015.01143
- Solti, Á., Sárvári, É., Szöllősi, E., Brigitta, T., Mészáros, I., Fodor, F., ... Szigeti, Z. (2016). Stress hardening under long-term cadmium treatment is correlated with the activation of antioxidative defence and iron acquisition of chloroplasts in *Populus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71, 323-334. doi: 10.1515/znc-2016-0092
- Song, Y., Jin, L., Wang, X. (2016). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19, 133-141. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
- Statistical Analysis System Institute – SAS. SAS® 9.1.3 (TS1M3) for Windows Microsoft. p. 212. Cary: SAS Institute Inc., 2007.
- Tedesco, MJ., Gianello C., Bissani, CA., Bohnen H., Volkweiss, SJ. (1995). Análise do solo, plantas e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos – UFRGS. 174 p.
- Zhang, X., Gao, B., Xia, H. (2014). Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of banana grass and vetiver grass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 102-108. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.025
- Zhao, S., Shang, X., Duo, L. (2015). Heavy metal uptake and leaching from polluted soil using permeable barrier in DTPA-assisted phytoextraction. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5263-5270. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3751-5>
- Zouari, M., Ahmed CB., Elloumi, N., Bellassoued, K., Delmail, D., Labrousse, P., ... Rouina, B.B. (2016). Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128, 195-205. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.024
- Yan, H., Filardo, F., HU, X., Zhao, X., Fu, D.H. (2015). Cadmium stress alters the redox reaction and hormone balance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 58-69. doi: 10.1007/s11356-015-5640-y.
- Wang, Y., GU, C., Bai, S., Sun, Z., Zhu, T., Zhu, X., ... Tembrock, L.R. (2016). Cadmium accumulation and tolerance of *Lagerstroemia indica* and *Lagerstroemia fauriei* (Lythraceae) seedlings for phytoremediation applications. *International Journal of Phytoremediation*, 18, 1-33. doi: 10.1080/15226514.2016.1183581.

Wu, D., Yamaji, N., Yamane, M., Kashino, M., Sato, K., Ma, J.F. (2016). The HvNramp5 transporter mediates uptake of cadmium and manganese, but not iron. *Plant Physiology Preview*, 172, 1899-1910. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.16.01189>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As respostas fisiológicas, bioquímicas, nutricional e de crescimento apresentadas pelas plantas jovens de *V. surinamensis*, sob dosagens de Cd durante 60 dias, revelaram tolerância e capacidade de fitoestabilização a esse tipo de estresse. No entanto, recomenda-se novos experimentos com a espécie sob condições de campo, em locais contaminados com Cd, como áreas de mineração, o que seria mais realista do que a exposição da planta em casa de vegetação. Além de ampliar o conhecimento das estratégias adaptativas dessa espécie e, conseqüentemente, seu uso em programa de recuperação de áreas impactadas por Cd na Amazônia.