



LUIZ CARLOS DE ALMEIDA RODRIGUES

ABSORÇÃO DE CÁDMIO E ZINCO POR
Alternanthera tenella Colla (AMARANTHACEAE)
E MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E
FISIOLÓGICAS

LAVRAS – MG
2017

LUIZ CARLOS DE ALMEIDA RODRIGUES

**ABSORÇÃO DE CÁDMIO E ZINCO POR *Alternanthera tenella* Colla
(AMARANTHACEAE) E MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E
FISIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

Prof. Dr. Fabricio José Pereira
Coorientador

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Rodrigues, Luiz Carlos de Almeida.

Absorção de cádmio e zinco por *Alternanthera tenella* Colla
(Amaranthaceae) e modificações anatômicas e fisiológicas / Luiz
Carlos de Almeida Rodrigues. - 2016.

89 p. : il.

Orientador(a): Evaristo Mauro de Castro.

Coorientador(a): Fabricio José Pereira, Luiz Roberto
Guimarães Guilherme

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Anatomia vegetal. 2. Fisiologia vegetal. 3. Fitorremediação.
I. Castro, Evaristo Mauro de. II. Pereira, Fabricio José. III.
Guilherme, Luiz Roberto Guimarães. IV. Título.

LUIZ CARLOS DE ALMEIDA RODRIGUES

**ABSORÇÃO DE CÁDMIO E ZINCO POR *Alternanthera tenella* Colla
(AMARANTHACEAE) E MODIFICAÇÕES ANATÔMICAS E
FISIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de Setembro de 2016

Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Ricardo Monteiro Corrêa	IFMG
Dr. Bruno Teixeira Ribeiro	UFLA
Dr. Moacir Pasqual	UFLA
Dra. Marinês Ferreira Pires Lira	UFLA

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro
Orientador

Prof. Dr. Fabricio José Pereira
Coorientador

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Coorientador

**LAVRAS – MG
2017**

Aos meus amados pais, Maria Odília e José Carlos.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade e estrutura concedida para a realização desse trabalho.

À Capes, pela concessão das bolsas de estudos. Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e VALE pelo fomento à pesquisa e apoio ao programa de pós-graduação.

Ao meu orientador e também coordenador de curso, Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro, pela orientação e paciência durante todos esses anos de doutorado, pela oportunidade e confiança.

Ao meus coorientadores Prof. Fabricio José Pereira e Prof. Luiz Roberto Guimarães Guilherme pela oportunidade, confiança e orientação. Também aos demais professores do programa de pós-graduação em Botânica Aplicada, por todo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada e do Departamento de Biologia.

A todos os amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFLA pelo convívio harmonioso, pelo apoio em todos os momentos dessa jornada.

Agradeço aos amigos Osmar, Gabriel, Ray, Ítalo, Marinês, Flávio, Quedes, Márcio, Kamila pela grande ajuda na condução dos experimentos e com contribuições importantíssimas de informações, bem como pela amizade.

Agradeço muito especialmente aos "salvadores da tese", Ana França e João Paulo, pelo apoio incondicional, pelas horas de trabalho despendidas, pela confiança e principalmente pela amizade e parceria, não seria possível sem vocês.

Aos membros da banca, professores Dr. Evaristo Mauro de Castro, Dr. Ricardo Monteiro Corrêa, Dr. Bruno Teixeira Ribeiro, Dr. Moacir Pasqual, Dr^a.

Marinês Ferreira Pires, Dr. Manuel Lousada Gavilanes (supl.) e à pesquisadora Dr^a. Cynthia de Oliveira (supl.), pelas valiosas contribuições.

Aos técnicos Geila e João Gualberto do Laboratório de Pedologia e Geoquímica Ambiental, ao Ítalo do Laboratório de Anatomia Vegetal e ao Claret e Vantuil do Laboratório de Cultura de Tecidos.

Aos meus amigos Nayara, Márcio, João Paulo, Marinês, Jean, Raquel, Diego e Adolfo, pela amizade, parceria e por tornarem os almoços e os finais de semana mais divertidos.

Aos meus pais José Carlos e Maria Odília e aos meus irmãos, Isabela e Eduardo, pela dedicação, pelos conselhos, pelo incentivo e pelo amor incondicional.

À minha companheira Laiane, por toda dedicação, apoio, paciência, otimismo, alegria, amizade e amor. Eu te amo muito!

E a todos que contribuíram de alguma forma, para a realização de mais uma etapa da minha vida. Enfim, agradeço à vida, pelos caminhos traçados pelo acaso, que me permitiram conhecer pessoas maravilhosas e também a lidar com as frustrações e os medos.

RESUMO

A mineração é uma das principais atividades relacionadas à contaminação do solo por cádmio (Cd) e zinco (Zn). A presença de Cd em concentrações não naturais no ambiente tem sido reconhecida como um grande risco em potencial, devido à sua não biodegradabilidade e alta toxicidade para biota. O Zn é um micronutriente essencial para o crescimento vegetal, mas em altas concentrações pode apresentar fitotoxicidade afetando o crescimento da planta. A fitorremediação se apresenta como técnica de recuperação de áreas degradadas com um bom custo-benefício e natureza ambientalmente correta, utilizando plantas tolerantes e acumuladoras de elementos-traço. O estudo foi realizado visando avaliar a tolerância e o potencial acumulador de *Alternanthera tenella* Colla, pertencente à família Amaranthaceae e encontrada em áreas degradadas como a área de mineração de Zn em Vazante-MG. Para isso foram utilizadas análises anatômicas e fisiológicas, em plantas cultivadas em solo em casa de vegetação e em meio de cultura no ambiente *in vitro*. Foi observado que, em solo em casa de vegetação, *A. tenella* é capaz de absorver e translocar quantidade suficiente de Cd e Zn para ser considerada como espécie hiperacumuladora e, portanto, com potencial para aplicação em processos de fitorremediação. Altas concentrações de Zn induziram a maior absorção de Cd, mas reduziram os efeitos tóxicos desse elemento por competir por sítios de ligação na planta. Devido à alta concentração de Zn em relação ao Cd, modificações anatômicas importantes foram induzidas principalmente pelo Zn, que chegou a demonstrar certa fitotoxicidade sobre as trocas gasosas da espécie. Na condição *in vitro*, por sua vez, ficou evidente a competição entre Cd e Zn pela absorção por *A. tenella*, que teve suas características anatômicas, o seu sistema antioxidante e o seu crescimento vegetal afetados por altas concentrações de Cd. Nessa condição, o aumento do teor de Cd reduziu a absorção de Zn por *A. tenella*. Tanto em casa de vegetação quanto no ambiente *in vitro*, as modificações anatômicas foram induzidas na planta no sentido de compartimentalizar e impedir a translocação dos elementos-traço avaliados.

Palavras-chave: Anatomia vegetal. Fisiologia vegetal. Fitorremediação. Anatomia ecológica. Trocas gasosas.

ABSTRACT

Mining is one of the main activities related to soil contamination by cadmium (Cd) and zinc (Zn). The presence of unnatural concentrations of Cd in the environment has been recognized as a potential risk due to its non-biodegradability and high toxicity. Zn is an essential nutrient for plant growth, but in high concentrations may exhibit phytotoxicity affecting plant development. Phytoremediation is presented as a good cost-effective and ecofriendly technique to recover degraded areas, which uses plants with tolerance and accumulation responses for trace elements. The study was performed to evaluate the tolerance and potential to accumulation of *Alternanthera tenella* Colla, which belongs to Amaranthaceae family and occurs in a degraded area of Zn mining in Vazante-MG. Anatomical and physiological analysis were performed on plants grown on Cd and Zn-contaminated soil in a green house and on a in vitro contaminated medium. We observed that *A. tenella* was able to uptake and translocate sufficient amount of Cd and Zn to be considered as hyperaccumulator species. Thus, the species have potential for application in phytoremediation processes. High Zn concentrations induced increased absorption of Cd, but reduced the toxic effects of this element by competition for binding sites on the plant. Due to the high Zn concentration compared to Cd, important anatomical changes were induced mainly by Zn, which promoted some phytotoxicity on gas exchange of the species. For the in vitro experiment, in turn, it became apparent competition between Cd and Zn absorption by *A. tenella*, which had its anatomical , antioxidant and growth features affected by high concentrations of Cd. In this condition, increased Cd content reduced Zn uptake by *A. tenella*. For both greenhouse and in vitro conditions, the anatomical changes were induced in order to promote the retention and prevent the translocation of the evaluated trace elements.

Keywords: Plant anatomy. Plant physiology. Phytoremediation. Ecological anatomy. Gas exchange.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 A contaminação do solo por elementos-traço	14
2.2 Modificações anatômicas e fisiológicas em espécies tolerantes	15
2.3 Fitorremediação de solos com elevados teores de elementos-traço	18
REFERÊNCIAS.....	21
SEGUNDA PARTE: ARTIGOS.....	28
ARTIGO 1: TOLERÂNCIA E POTENCIAL BIOACUMULADOR DE CÁDMIO E ZINCO DE <i>Alternanthera tenella</i> Colla (AMARANTHACEAE).....	28
RESUMO	29
ABSTRACT.....	30
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Desenho experimental.....	33
2.2. Teores, bioacumulação e translocação de Cd e Zn	34
2.3 Análises anatômicas	36
2.4 Trocas gasosas	37
2.5 Análise estatística	37
3 RESULTADOS	39
3.1 Teores, bioacumulação e translocação de Cd e Zn	39
3.2 Modificações anatômicas.....	42
3.3 Trocas gasosas	45
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ARTIGO 2: TOLERANCE AND POTENTIAL FOR BIOACCUMULATION OF <i>Alternanthera tenella</i> COLLA TO CD ON IN VITRO CONDITION	59

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação do solo por elementos-traço tem se tornado um assunto recorrente nas discussões sobre a qualidade do meio ambiente. Esses elementos ocorrem naturalmente no solo, mas a modificação do ambiente pelo homem por meio de atividades como a urbanização, a industrialização, a mineração e a agricultura tem elevado o teor desses elementos no solo a níveis preocupantes (WEI; ZHOU, 2008). Áreas adjacentes a complexos industriais e de refino de minérios geralmente apresentam solo com concentrações elevadas de elementos-traço, que são apontados como a causa de distúrbios ambientais como alterações na funcionalidade e diversidade de ecossistemas, por modificar as características químicas, físicas e biológicas do solo (MARIET et al., 2016).

É evidente a contribuição das atividades de mineração na fabricação de bens indispensáveis à qualidade de vida do homem. No entanto, a sua contribuição na contaminação do solo por níveis tóxicos de elementos-traço como o cádmio (Cd) e o zinco (Zn) nos compartimentos ambientais (MEMON; SCHRODER, 2009), tem aumentado cada vez mais a demanda por estratégias de remediação.

Nesse contexto, a fitorremediação apresenta-se como uma técnica promissora, pois visa minimizar os impactos antrópicos concomitantemente à reestruturação do ecossistema, uma vez que utiliza plantas hiperacumuladoras de elementos-traço para a descontaminação do ambiente. Por isso, é considerada como uma técnica segura, de baixo custo e ambientalmente correta (MITCH, 2002; CARNEIRO; GARIGLIO, 2010). Essa técnica promove ainda a recobertura vegetal do solo, trazendo, além da estabilidade física, um estímulo para a sucessão ecológica e o aumento da diversidade local. No entanto, um dos

grandes desafios do processo de fitorremediação consiste em encontrar espécies vegetais que toleram e acumulam grandes quantidades de elementos-traços em sua biomassa, bem como conhecer os seus mecanismos de tolerância e o seu papel ecológico. As plantas capazes de suportar essas condições de estresse podem utilizar estratégias de tolerância baseadas em modificações nas características anatômicas e fisiológicas (BARCELÓ; VÁSQUEZ; POSHENRIEDER, 1990; MONNI et al., 2001). O uso de espécies nativas de áreas de mineração em estudos de fitorremediação tem sido realizado no sentido de interferir cada vez menos na diversidade local, evitar episódios de invasão biológica e aumentar a probabilidade de sucesso, uma vez que essas plantas já ocorrem nesses locais contaminados e por isso são potencialmente tolerantes (BORIN, 2010; GOMES et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

Um exemplo de área de mineração com plantas potencialmente hiperacumuladoras se encontra próximo à cidade de Vazante, no estado de Minas Gerais, Brasil, onde grande parte da extração do Zn do Brasil é realizada (FILHO; VIANA, 2011, CARVALHO et al., 2013). Nessa região, algumas espécies com potencial fitoextrator de Cd e Zn foram recentemente descritas, por exemplo, *Alternanthera sp.*, *Gomphrena elegans* e *Gomphrena claussenii* (BORIN, 2010; CARVALHO et al., 2013), todas pertencentes à família Amaranthaceae e nativas do Brasil (MARCHIORETTO; SENNA; SIQUEIRA, 2010). Assim como as espécies citadas, *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) é amplamente encontrada nessa área de mineração e possui, portanto, uma potencial tolerância e capacidade de bioacumulação dos elevados teores de elementos-traço presentes no solo.

Entender as estratégias de tolerância utilizadas por *Alternanthera tenella* frente a contaminação por esses elementos pode, portanto, contribuir com o entendimento dos mecanismos adotados pelas plantas de uma forma geral nessas condições de estresse. Além disso, esse conhecimento pode ajudar a orientar

decisões para a recuperação da área de estudo ou em ambientes em condições semelhantes. No presente trabalho, *A. tenella* foi avaliada quanto à sua capacidade de tolerar e bioacumular Cd e Zn, com base na sua plasticidade anatômica e fisiológica, em condições controladas de casa de vegetação e no ambiente *in vitro*. Dessa forma, buscou-se também avaliar o seu potencial para o uso em processos de fitorremediação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A contaminação do solo por elementos-traço

Alguns metais ocorrem naturalmente no solo em pequenas quantidades (ou quantidades-traço), como o zinco (Zn), o ferro (Fe) e o cobre (Cu), que são considerados como essenciais para o desenvolvimento vegetal. Outros elementos-traço encontrados no solo são considerados como não essenciais ao desenvolvimento vegetal e podem apresentar fitotoxicidade, como o cádmio (Cd) e o chumbo (Pb). No entanto, em altas concentrações os elementos-traço essenciais também expõem as plantas ao estresse e induzem vários mecanismos de adaptação (DRESLER et al., 2014).

No Brasil, atividades antropogênicas como técnicas modernas de agricultura e de mineração estão associadas ao aumento da concentração de elementos-traço no ambiente (KABATA-PENDIAS, 2010), fazendo crescer a demanda por estratégias de remediação ambiental. A mineração e a indústria metalúrgica estão entre as atividades que mais contribuem para a contaminação do solo com elementos-traço. Essas atividades resultam em grande produção de rejeitos, que podem conter elevados teores de níquel (Ni), cromo (Cr), cobre (Cu), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e zinco (Zn), entre outros.

A presença de elevadas concentrações desses elementos no solo pode afetar o desenvolvimento da vegetação (BAKER et al., 1994). Por essa razão, poucas espécies vegetais conseguem se estabelecer em regiões contaminadas por elementos-traço, como as áreas de depósito de rejeito da mineração e metalurgia. A maior parte das plantas apresenta respostas ao estresse nesses ambientes (CHAVES FILHO; STACCIARINI-SERAPHIN, 2001), já que esses poluentes inorgânicos não podem ser degradados. Entretanto, algumas espécies vegetais conseguem se estabelecer em ambientes com elevados teores de elementos-traço

desenvolvendo estratégias para contornar a fitotoxicidade dessas substâncias (BOVET et al., 2006).

Dentre os elementos-traço não essenciais, o Cd se destaca por sua alta toxicidade mesmo em baixas concentrações (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997), além do seu potencial de ingressar na cadeia alimentar via absorção por plantas (GOMES et al., 2012). Esse potencial se deve, principalmente, à sua elevada mobilidade (BARCELÓ; VÁSQUEZ; POSHENRIEDER, 1990).

O Zn, por sua vez, é um micronutriente cuja deficiência resulta em diversos sintomas como a redução da área foliar, necrose no ápice radicular e clorose nas folhas, entre outros (BROADLEY et al., 2007). Essa essencialidade do Zn reside principalmente na sua participação como componente de várias proteínas nas plantas, como por exemplo a enzima superóxido dismutase. Contudo, em altas concentrações esse elemento pode apresentar toxidez afetando o metabolismo e o crescimento vegetal (BROADLEY et al., 2007; MARSCHNER, 2011).

2.2 Modificações anatômicas e fisiológicas em espécies tolerantes

O acúmulo de elementos-traço nas plantas se divide em três etapas principais: (i) o transporte do elemento da solução do solo para a raiz; (ii) o transporte radial desse elemento pelos tecidos radiculares até alcançar o xilema; e (iii) o transporte do elemento via xilema para as folhas, onde será armazenado nas células epidérmicas e do mesófilo foliar (PAPOYAN; PIÑEROS; KOCHIAN, 2007; KUMMEROVÁ et al., 2010). A plasticidade anatômica em plantas tolerantes permite que elas sofram alterações nos seus tecidos como uma estratégia para sobreviver à condição de estresse. Por exemplo, a presença de elementos-traço pode induzir um aumento do córtex radicular, como resposta ao

acúmulo de metais nas células corticais e, também, visando aumentar a resistência ao transporte radial pelo aumento da distância a ser percorrida pelos íons (MAKSIMOVIĆ et al., 2007; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

A endoderme radicular funciona como um filtro biológico, que age como uma barreira apoplástica controlando o transporte radial de água e íons, combatendo a entrada de contaminantes, parasitas e a perda de água excessiva pela planta (ENSTONE; PETERSON, 2002; ENSTONE; PETERSON, 2005; LÍŠKA et al., 2016; MARTINS et al., 2016). Sob efeito de estresse por Cd, por exemplo, a endoderme começa a se diferenciar mais proximamente ao ápice radicular em várias espécies (SCHREIBER et al., 1999; MARTINKA; LUX, 2004; ZELKO; LUX, 2004; VACULÍK et al., 2009).

O efeito do Cd sobre a proporção dos tecidos radiculares e modificações no desenvolvimento de barreiras apoplásticas como a epiderme, exoderme e endoderme é conhecido na literatura (REDJALA; STERCKEMAN; MOREL, 2009). Em baixas concentrações de elementos-traço, o espessamento dessas barreiras pode ser um importante bloqueio para que esses elementos não alcancem órgãos reprodutivos e tecidos meristemáticos na parte aérea da planta, evitando problemas na reprodução e crescimento dos indivíduos. As plantas podem, ainda, aumentar a espessura das folhas e a frequência de idioblastos, onde grande parte dos elementos são compartimentalizados na planta (CARVALHO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016)

O Cd também promove o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), elevando assim a taxa de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica, por sua vez, interfere na permeabilidade de membranas, afetando a sua fluidez e seletividade (KABATA-PENDIAS, 2010). O aumento de EROs por efeito do Cd pode, ainda, induzir a ocorrência de morte celular e danos estruturais no DNA (FILIPIC; HEI, 2004).

A atividade das enzimas do sistema antioxidante pode sofrer diversos efeitos em plantas contaminadas pelo Cd. Esse elemento pode induzir a oxidação de grupos sulfidril, destruindo ligações dissulfeto e resultando na desnaturação de enzimas e redução da atividade enzimática (MYŚLIWA-KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). No entanto, em resposta à formação de EROs induzida pelo Cd, a atividade de algumas enzimas pode ser elevada como forma de combater esses radicais e reduzir os seus efeitos nocivos (GUIMARÃES et al., 2008). A peroxidase do ascorbato, por exemplo, é uma enzima que possui alta afinidade ao H_2O_2 e está distribuída em diversos compartimentos celulares, possuindo uma ampla gama de atuação no combate às EROs.

O Cd é conhecido por afetar processo de biossíntese (STOBART et al., 1985) e reduzir o teor de clorofila em várias espécies (CHINMAYEE et al., 2013; DRESLER, et al. 2014; KUMMEROVÁ, et al., 2010). Por isso, o elemento está frequentemente associado à clorose e à queda no crescimento vegetal. Dentre as causas relatadas da clorose observada por efeito do Cd estão: a competição do Cd com o ferro por sítios de absorção na membrana plasmática, afetando a estabilidade das clorofilas; a redução do transporte de manganês pelo Cd; um decréscimo na replicação do cloroplasto (GUIMARÃES et al., 2008). Küpper et al. (2007), demonstraram que o Cd age principalmente sobre o fotossistema II em *Thlaspi caerulescens*, o que mais tarde foi confirmado por Basa et al. (2014) para *Beta vulgaris* L.. Myśliwa-Kurdziel, Prasad e Strzalka (2004) afirmaram que altas concentrações desse elemento causam a má formação dos cloroplastos e a dilatação da membrana do tilacoide. Algumas plantas podem, entretanto, aumentar a taxa fotossintética como resposta à contaminação por baixas concentrações de Cd como uma estratégia de tolerância ao estresse (PEREIRA et al., 2016).

No entanto, em concentrações excessivas, o Zn também pode inibir parcialmente reações no fotossistema I e induzir o bloqueio do transporte de

elétrons no fotossistema II, reduzindo a taxa fotossintética (TRIPATHY; MOHANTY, 1980). O Zn também pode induzir a clorose por afetar a biossíntese de clorofila e causar a degradação dos cloroplastos, bem como pela interferência na absorção de ferro (Fe), magnésio (Mg) e manganês (Mn) pela planta (CARROLL; LONERAGAN, 1968; BOAWN; RASMUSSEN, 1971; FOY; CHANEY; WHITE, 1978).

2.3 Fitorremediação de solos com elevados teores de elementos-traço

Elementos-traço não podem ser degradados, mas quando estão biodisponíveis no solo, eles podem ser absorvidos e estabilizados nos tecidos vegetais (PILON-SMITS, 2005), processo denominado fitorremediação. A fitorremediação é uma técnica de descontaminação ambiental com baixo custo e gera o mínimo de perturbação do ambiente (HENRY, 2000; LINDBLOM et al., 2006).

Fitorremediação é o uso de plantas para remover, imobilizar ou tornar os contaminantes inofensivos ao ecossistema (SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Além dos baixos custos de implantação e manutenção, a fitorremediação apresenta inúmeras vantagens, como a proteção contra a erosão, a melhoria estrutural e aumento da fertilidade do solo e além da melhoria estética das áreas afetadas (RASKIN; ENSLEY, 2000).

O sucesso da fitorremediação depende da seleção natural ou artificial que as plantas apresentam em resposta ao estresse causado pelos poluentes (PIRES et al., 2003). A escolha da estratégia utilizada deve considerar fatores, como as características do local contaminado, a mobilidade e concentração do contaminante, além da vegetação presente na área (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007) e do destino a ser dado ao material biológico contaminado.

Os mecanismos de fitorremediação são classificados de acordo com o destino dado aos contaminantes. Assim, o poluente pode ser contido através da fitoimobilização, estabilizado (fitoestabilização), degradado (fitodegradação ou rizodegradação), volatilizado (fitovolatilização), extraído (fitoextração) ou ainda filtrado, através da rizofiltração (CUNNINGHAM; BERTI, 1993; PILON-SMITS, 2005).

Os procedimentos mais indicados para recuperação de áreas com altos teores de elementos-traço são a fitoextração e a fitoestabilização. Na fitoextração, o contaminante absorvido é translocado para as partes aéreas da planta, que podem ser cortadas quando atingem a capacidade máxima de extração e posteriormente voltam a brotar, dando continuidade ao processo. Dessa forma, os metais absorvidos podem ser reaproveitados ou a planta seca pode ser utilizada na produção de biocombustíveis, produzindo energia através da utilização da sua biomassa (LIEVENS et al, 2008; SCHRÖDER et al., 2008).

Na fitoestabilização, o contaminante absorvido pela planta permanece retido nas raízes ou parte aérea, não sendo necessário realizar a coleta posterior. Esse processo tem seu custo ainda menor, visto que dispensa investimento em planos de manejo. A fitoestabilização é eficaz na reabilitação de áreas contaminadas, pois reduz o risco de erosão, lixiviação e contaminação do lençol freático, mesmo que os contaminantes permaneçam na área degradada (ZHAO; MCGRANTH, 2009). Esse método pode ser empregado em solos com elevado nível de contaminação, onde somente as espécies tolerantes conseguem se estabelecer acumulando os elementos-traço sem prejudicar seu desenvolvimento em longo prazo.

Muitas espécies já foram descritas com base na sua tolerância e potencial bioacumulador de elementos-traço, como o Cd e o Zn, entre elas *Alternanthera sp.*, *Gomphrena elegans* e *Gomphrena claussenii* (BORIN, 2010; CARVALHO et al., 2013, CARVALHO et al., 2015), e ainda a *Pfaffia*

glomerata (Spreng.) Pedersen e a *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (GOMES et al., 2012; ZHOU et al., 2003) e *Amaranthus dubius* Mart. ex Thell., tolerante ao cromo (Cr), mercúrio (Hg), arsênio (As), chumbo (Pb), cobre (Cu) e níquel (Ni) (MELLEM; BAIJNATH; ODHAV, 2009). Todas essas espécies pertencem à família Amaranthaceae e são nativas do Brasil (MARCHIORETTO; SENNA; SIQUEIRA, 2010).

De modo geral, a espécie vegetal utilizada em programas de fitorremediação deve possuir algumas características, como tolerância e capacidade de acumular o poluente, sem prejudicar suas atividades metabólicas e ainda de produzir grande quantidade de biomassa, e a reprodução, propagação e coleta devem ser facilitadas (OLIVEIRA et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- BAKER, A. J. M.; McGRATH, S. P.; SODOLI, C. M. D.; REEVES, R. D. The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, p. 41-49, Jun. 1994.
- BARCELÓ, J.; VÁSQUEZ, M.D.; POSHENRIEDER, C. H. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, Georgia, v. 13, p. 01-37, Nov. 1990.
- BASA, B.; LATTANZIO, G.; SOLTÍ, Á.; TÓTH, B.; ABADÍA, J.; FODOR, F.; SÁRVÁRI, É. 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**, Barcelona, v. 101, p. 1-11, Mai. 2014.
- BOAWN, L. C.; RASMUSSEN, P.E. Crop response to excessive zinc fertilization of alkaline soil. **Agronomy Journal**, Madison, v. 63, p. 874 – 876, Abr. 1971.
- BORIN, A. L. D. C. **Fitorremediação de cádmio e zinco por Amaranthaceae**. 2010. 181 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010. [accessed 24 March 2015].
- BOVET, L.; KAMMER, P. M.; MEYLAN-BETTEX, M.; GUADAGNUOLO, R.; MATERA, V. Cadmium accumulation capacities of *Arabis alpine* under environmental conditions. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 57, n. 1/2, p. 80-88, Aug. 2006.
- BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 173, p. 677-702, Fev. 2007.
- CARNEIRO, D. A.; GARIGLIO, L. P. A biorremediação como ferramenta para a descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. **Revista Tecer**, Belo Horizonte, v. 3, n. 4, p. 82, Mai. 2010.
- CARROLL, M.D.; LONERAGAN, J.F. Response of plant species to concentrations of zinc in solution. I. Growth and zinc content of plants. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 19, p. 859 – 868, Dez. 1968.

- CARVALHO, V.; TOMAZ, M.; AMARAL, D. C.; GUILHERME, L. R.; AARTS, M. G. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers In Plant Science**, Melbourne, v. 4, p.180-190, Jun. 2013.
- CARVALHO, M. T. V.; PONGRAC, P.; MUMM, R.; ARKEL, J.; AELST, A.; JEROMEL, L.; VAVPETIČ, P.; PELICON, P.; AARTS, M. G. *Gomphrena claussenii*, a novel metal-hypertolerant bioindicator species, sequesters cadmium, but not zinc, in vacuolar oxalate crystals. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 208(3), p. 763-775, Jun. 2015.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estruturas e funções de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009, 234p.
- CHAVES FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 199-204, Jun. 2001.
- CHINMAYEE, M. D.; STEPHAN, P.; ANU, M. S.; SHEEBA, A. M.; MINI, I.; SWAPNA, T. S. Cadmium stress on antioxidant activity of two *Alternanthera* sp. **Journal of Scientific & Industrial Research**, New Delhi ,v. 72, p. 558-562, Set. 2013.
- CUNNINGHAM, S., BERTI, W. R. The remediation of contaminated soils with green plants; an overview. **In vitro celular and development biology-plant**, Chesterfield, v. 29, p. 207-212, Out. 1993.
- DAS, D., SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Albany, v. 98, p. 29-36, Jun. 1997.
- DRESLER, S.; HANAKA, A.; BEDNAREK, W.; MAKSYMIEC, W. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 36(6), p.1565-1575, Jun. 2014.
- ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: structure, function and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 21, p. 335–351, Dez. 2002.
- ENSTONE DE; PETERSON CA. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 28, p. 444–455, Jan. 2005.

FILHO, S. R.; VIANA, M. B. **Gestão da água: o desafio do zinco em Vazante-MG**. In: FERNANDES, F. R. C.; ENRIQUEZ, M. R., ALAMINO, R. C. J. [eds]. Recursos Minerais & Sustentabilidade Territorial. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, p. 333–360, 2011.

FILIPIC, M.; HEI, T. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, New York, v. 546, p. 81–91, Fev. 2004.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Los Angeles, v. 29, p. 511–566, Jun. 1978.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. S.; MARTINS, G. A.; CARNEIRO, M. M. L. C.; SOARES, A. M. Cd-tolerance markers of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen plants: anatomical and physiological features. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 293-304, Dez. 2012.

GUIMARÃES, M. D. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, Viçosa, 2, 58-68, 2008.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury**, Washington: USEPA, 2000. p. 51. Disponível em: <<http://www.clu-in.org>>. Acesso em: 10 dez, 2016.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. Boca Raton: CRC press, 2010. 505 p.

KUMMEROVÁ, M.; ZEŽULKA, Š.; KRÁČOVÁ, K.; MASAROVÍČOVÁ, E. Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 54, p. 308-314, Jun. 2010.

KÜPPER, H.; PARAMESWARAN, A.; LEITENMAIER, B.; TRTÍLEK, M.; SETLÍK, I. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 175, p.1-20, Jun. 2007.

LIEVENS, C.; YPERMAN, J.; CORNELISSEN, T.; CARLEER, R. Study of the potential valorisation of heavy metal contaminated biomass via phytoremediation by fast pyrolysis: Part II: Characterisation of the liquid and

gaseous fraction as a function of the temperature, **Fuel**, Xi'an, v.87, p. 1906-1916, Aug. 2008.

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

LÍŠKA, D., MARTINKA, M., KOHANOVA, J., LUX, A. Asymmetrical development of root endodermis and exodermis in reaction to abiotic stresses. **Annals of botany**, Oxford, mcw047, Fev. 2016.

MAKSIMOVIĆ, I.; KASTORI, R.; KRSTIĆ, L.; LUKOVIĆ, J. Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. **Biologia Plantarum**, Prague, v.51, p.589-592, Mar. 2007.

MARCHIORETTO, M. S.; SENNA, L.; SIQUEIRA, J. C. “**Amaranthaceae**” *In*: Catálogo de plantas e fungos do Brasil, ed. A. J. Estúdio (Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro), 2010. 590–596p.

MARIET, A. L.; BÉGEOT, C.; GIMBERT, F.; GAUTHIER, J.; FLUCK, P.; WALTER-SIMONNET, A. V. Past mining activities in the Vosges Mountains (eastern France): Impact on vegetation and metal contamination over the past millennium. **The Holocene**, Swansea, v. 26, n. 8, p. 1225-1236, Mar. 2016.

MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed, Academic press, London, 2011. 650 p.

MARTINKA, M.; LUX, A. Response of roots of three populations of *Silene dioica* to cadmium treatment. **Biologia**, Bratislava, v. 59, suppl. 13, p. 1–189, 2004.

MARTINS, J. P. R.; MARTINS, A. D. ; PIRES, M. F. ; BRAGA Jr, R. A. ; REIS, R. O. ; DIAS, G.M.G. ; PASQUAL, M. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht , v. 126, p. 43-57, Jul. 2016.

MELLEM, JOHN J.; BAIJNATH, HIMANSU; ODHAV, BHARTI. Translocation and accumulation of Cr, Hg, As, Pb, Cu and Ni by *Amaranthus dubius* (Amaranthaceae) from contaminated sites. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, Edmonton, v. 44, p. 568-575, Out. 2009.

MEMON, A. R.; SCHODER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environment Science Polluted**, New York, v. 16, p. 162-175, Mar. 2009.

MITCH, M. L. Phytoextraction of toxic metals. A review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, Auburn, v. 31, p. 109–120, Jan. 2002.

MONNI, S.; UHLIG, C.; JUNTILA, O.; HANSEN, E.; HYNYNEN, J. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. **Environmental Pollution**, Albany, v. 112, p. 417-426, Mar. 2001.

MYŚLIWA-KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. **Photosynthesis in heavy metal stressed plants**. In: PRASAD, M.N.V. Heavy metal stress in plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004. p.146-181.

OLIVEIRA, D. B.; CARA, D. V. C.; XAVIER, P. G.; SOBRAL, L. G. S.; LIMA, R. B.; ALMEIDA, A. L. **Fitorremediação: o estado da arte**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2006. 32 p.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology : hyper-accumulation metals in plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 184, n. 1/4, p. 105-126, Set. 2007.

PAPOYAN, A.; PIÑEROS, N.; KOCHIAN, L.V. Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Oak Ridge. v.175, p.51–58, Abr. 2007.

PEREIRA, M. P.; RODRIGUES, L. C. A.; CORRÊA, F. F.; CASTRO, E. M.; RIBEIRO, V. E.; PEREIRA, F. J. Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. **Trees**, Heidelberg , v. 30, p. 807-814, Jun. 2016.

PILON- SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, June 2005.

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

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

REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; MOREL, J.L. Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. **Environmental and Experimental Botany**, Barcelona, v.67, 2p. 35–242, Nov. 2009.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-68, June 1998.

SCHREIBER, L.; HARTMANN, K.; SKRABS, M.; ZEIER, J. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. **Journal of Experimental Botany**, Barcelona, v. 50, p. 1267–1280, Abr. 1999.

SCHRÖDER, P.; HERZIG, R.; BOJINOV, B. RUTTENS, A.; NEHNEVAJOVA, E.; STAMATIADIS, S.; MEMON, A.; VASSILEV, A.; CAVIEZEL, M.; VANGRONVELD, J. Bioenergy to save the world - producing novel energy plants for growth on abandoned land. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsburg, v. 15, n. 3, p. 196-204, May 2008.

STOBART, A. K.; GRIFFITHS, W. T.; AMEEN-BUKHARI, I.; SHERWOOD, R. P. The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum**, Umeå, v. 63, p. 293-298, Mar. 1985.

TRIPATHY, B. C.; MOHANTY, P. Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 66, p. 1174-1178, Dez. 1980.

VACULÍK, M.; LUX, A.; LUXOVÁ, M.; TANIMOTO, E.; LICHTSCHEIDL, E. Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. **Environmental and Experimental Botany**, Barcelona, v. 67, p. 52–58, Nov. 2009.

WEI, S.; ZHOU, Q. **Trace elements in agro-ecosystems**. In: PRASAD, M. N. V. Trace elements as contaminants and nutrients consequences in ecosystems and human health. New Jersey: Wiley, 2008. p. 55-80.

ZELKO, I.; LUX, A. Effect of cadmium on *Karwinskia humboldtiana* roots. **Biologia**, Bratislava, v. 59, suppl. 13, p. 205–209, 2004.

ZHAO, F.; McGRATH, S.P. Biofortification and phytoremediation. **Current Opinion in Plant Biology**, Saint Louis, v. 12, p.373-380, Jun. 2009.

ZHOU, H.; SHI, G.; DU, K.; XU, Q.; XU, N. Toxic effects of Cd²⁺ pollution on the biochemical and physiological characters and ultrastructure of *Alternanthera philoxeroides*. **Ying yong sheng tai xue bao**, Beijing, v.14, p.1581-1584, Set. 2003.

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS

ARTIGO 1: TOLERÂNCIA E POTENCIAL BIOACUMULADOR DE CÁDMIO E ZINCO DE *Alternanthera tenella* Colla (AMARANTHACEAE)

RESUMO

A atividade de mineração é uma das principais atividades relacionadas à contaminação do solo por cádmio (Cd) e zinco (Zn). A presença desses elementos-traço em concentrações não naturais no ambiente tem sido reconhecida como um grande risco em potencial, devido ao seu efeito tóxico sobre a biota. A fitorremediação se apresenta como técnica de recuperação de áreas degradadas com um bom custo-benefício e natureza ambientalmente correta, utilizando plantas tolerantes e acumuladoras de elementos-traço. O estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a tolerância e o potencial acumulador de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). Foram avaliadas as modificações na anatomia e nas trocas gasosas da espécie cultivada em solo em casa de vegetação, sob a influência de diferentes combinações de concentrações de Cd e Zn. Observou-se que *A. tenella* é capaz de absorver e translocar quantidade suficiente de Cd e Zn para ser considerada como espécie hiperacumuladora e, portanto, com potencial para aplicação em processos de fitorremediação. Altas concentrações de Zn induziram a maior absorção de Cd, mas reduziram os efeitos tóxicos desse elemento por competir por sítios de ligação na planta. Devido à alta concentração de Zn em relação ao Cd, modificações anatômicas importantes foram induzidas principalmente pelo Zn, que apresentou fitotoxicidade sobre as trocas gasosas da espécie. As modificações anatômicas observadas foram induzidas no sentido de compartimentalizar e impedir a translocação dos elementos-traço avaliados.

Palavras-chave: Recuperação de áreas degradadas. Cádmio. Zinco. Mineração. Anatomia ecológica. Trocas gasosas.

ABSTRACT

Mining is one of the main activities related to soil contamination by cadmium (Cd) and zinc (Zn). The presence of these trace elements in the environment has been recognized as a potential risk due to its toxicity. Phytoremediation is presented as a good cost-effective and ecofriendly technique to recover degraded areas, which uses plants with tolerance and accumulation responses for trace elements. The study was performed to evaluate the tolerance and potential to accumulation of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae). Modifications on anatomical and gas exchange features were assessed on plants grown on soil in a green house, under different combination of Cd and Zn concentrations. We observed that *A. tenella* was able to uptake and translocate sufficient amount of Cd and Zn to be considered as hyperaccumulator species. Thus, the species have potential for application in phytoremediation processes. High Zn concentrations induced increased absorption of Cd, but reduced the toxic effects of this element by competition for binding sites on the plant. Due to the high Zn concentration compared to Cd, important anatomical changes were induced mainly by Zn, which promoted phytotoxicity on gas exchange of the species. The anatomical changes observed were induced in order to promote the retention and prevent the translocation of the evaluated trace elements.

Keywords: Recovery of degraded areas. Cadmium. Zinc. Lead. Mining. Ecological anatomy.

1 INTRODUÇÃO

Atividades antropogênicas, tais como as técnicas modernas de agricultura e de mineração, estão associadas ao aumento da concentração de elementos-traço no ambiente (KABATA-PENDIAS, 2010), fazendo crescer a demanda por estratégias de remediação. O cádmio (Cd) e o zinco (Zn) são exemplos de contaminantes associados à atividade de mineração.

Dentre os elementos-traço, o Cd se destaca pela sua alta toxicidade mesmo em baixas concentrações (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997), por seu potencial de ingressar na cadeia alimentar via absorção por plantas (CUI et al., 2005). Esse potencial se deve, principalmente, à sua elevada mobilidade no vegetal (BARCELÓ; VÁSQUEZ; POSHENRIEDER, 1990). Em altas concentrações, o cádmio (Cd) expõe as plantas ao estresse e induz vários mecanismos de adaptação (DRESLER et al., 2014, PEREIRA et al., 2016).

O Zn, por sua vez, é um micronutriente essencial para o crescimento vegetal, cuja deficiência promove a redução da área foliar, necrose no ápice radicular e clorose nas folhas, entre outros (BROADLEY et al., 2007). No entanto, em altas concentrações esse elemento pode apresentar toxidez afetando o metabolismo e o crescimento vegetal (BROADLEY et al., 2007; MARSCHNER, 2011).

A maioria das plantas é sensível às altas concentrações de elementos-traço no ambiente. Contudo, algumas espécies demonstram a capacidade de sobreviver e se reproduzir nessas condições. Tais espécies podem utilizar estratégias para manter os elementos-traço quelados externamente à planta, ou absorver e acumular esses poluentes na sua biomassa (BAKER, 1987). Para isso, essas plantas modificam características anatômicas e fisiológicas que as tornam capazes de suportar essas condições (BARCELÓ; VÁSQUEZ; POSHENRIEDER, 1990; MONNI et al., 2001). Estudos recentes têm

demonstrado grande interesse em espécies com essas habilidades, visto que seu caráter acumulador as elegeram como potencialmente aplicáveis em processos de fitorremediação (MARQUES; RANGEL; CASTRO, 2009).

A eficácia e o uso da fitorremediação como técnica para recuperar ambientes degradados tem crescido cada vez mais, principalmente pelo seu potencial econômico e ecológico (MITCH, 2002; GOMES et al., 2012). Tendo em vista que o Brasil possui grande atividade de extração de minérios metálicos, as plantas nativas encontradas em áreas de mineração são potencialmente tolerantes aos metais ali presentes. Um exemplo de área de mineração com plantas potencialmente hiperacumuladoras se encontra próximo à cidade de Vazante, no estado de Minas Gerais, Brasil, onde grande parte da extração do Zn do Brasil é realizada (FILHO; VIANA, 2011, CARVALHO et al., 2013). Nessa região, algumas espécies com potencial fitoextrator de Cd e Zn foram recentemente descritas, por exemplo *Alternanthera* sp., *Gomphrena elegans* e *Gomphrena claussenii* (BORIN, 2010; CARVALHO et al., 2013), todas pertencentes à família Amaranthaceae e nativas do Brasil (MARCHIORETTO; SENNA; SIQUEIRA, 2010). *Alternanthera tenella* Colla pertence à família Amaranthaceae sendo amplamente encontrada na área de mineração em Vazante e possui, portanto, potencial bioindicador dos elementos-traço presentes no solo.

Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar modificações na anatomia e nas trocas gasosas de *Alternanthera tenella* sob efeito do Cd e do Zn e discutir se ocorrem estratégias adaptativas ao estresse por esses elementos, bem como a capacidade de bioacumulação desses elementos-traço pela espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenho experimental

As plantas de *Alternanthera tenella* foram coletadas em três locais diferentes em uma área de rejeitos de uma cava de mineração de zinco desativada, localizada no município de Vazante (S 17°55'13,7" W 46°48'45"), no estado de Minas Gerais, Brasil. O solo dessa área apresenta elevados teores fitodisponíveis de Cd e Zn (10489 mg dm⁻³ de Zn e 158 mg dm⁻³ de Cd, conforme Lopes et al. 2015). As plantas foram transferidas para casa de vegetação do Departamento de Ciências do Solo, da Universidade Federal de Lavras (Lavras, Minas Gerais, Brasil), onde foram replantadas em vasos plásticos de 2 L, contendo substrato comercial Plantmax®, sendo irrigadas diariamente. Nesses vasos, as plantas foram propagadas por sementes até a obtenção de uma matriz homogênea, da qual foram obtidas as inflorescências contendo as sementes para a realização do experimento. Plantas coletadas no ambiente foram utilizadas para a elaboração de exsiccatas, que foram enviadas para identificação por especialista e depositadas no herbário ESAL da Universidade Federal de Lavras (n° de registro 28140).

Sementes de *Alternanthera tenella* foram distribuídas em vasos plásticos de 1 L contendo latossolo vermelho a ser utilizado no experimento, coletado no campus da Universidade Federal de Lavras. A calagem do solo foi realizada conforme Ramos et al. (2012) e a adubação seguiu o proposto por Malavolta (1994), tendo a cobertura da adubação sido realizada a cada 15 dias e a umidade mantida constante com água deionizada.

Após a germinação, as plantas foram cultivadas por 20 dias até atingirem cerca de 20 cm de altura, quando se deu início à fase de contaminação. O solo foi contaminando com soluções de nitrato de cádmio [Cd(NO₃)₂.4H₂O] e

sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), visando obter as combinações presentes da Tabela 1, totalizando nove tratamentos e oito repetições.

Tabela 1 - Combinações das concentrações de Cd e Zn utilizadas no experimento.

Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	5,0	300,0	2000,0
0,0	0,0 Cd x 5,0 Zn	0,0 Cd x 300,0 Zn	0,0 Cd x 2000,0 Zn
1,3	1,3 Cd x 5,0 Zn	1,3 Cd x 300,0 Zn	1,3 Cd x 2000,0 Zn
20,0	20,0 Cd x 5,0 Zn	20,0 Cd x 300,0 Zn	20,0 Cd x 2000,0 Zn

Fonte: do autor (2016).

As concentrações de Cd e Zn foram escolhidas com base na Resolução 420/2009 do CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2009). As menores concentrações consistiram no Valor de Prevenção - VP (concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais) e as maiores concentrações no Valor de Investigação - VI (concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, para áreas de atividade industrial). Após 15 dias de exposição aos tratamentos, foram analisadas as trocas gasosas, o teor de elementos-traço e as modificações na anatomia das plantas.

2.2. Teores, bioacumulação e translocação de Cd e Zn

Cinco plantas adultas de *Alternanthera tenella* foram coletadas em cada repetição, posteriormente lavadas com água deionizada e separadas em raiz e parte aérea. Em seguida, o material vegetal foi seco em estufa a 40 °C até atingir

massa constante, triturado em moinho de facas tipo Willye. Posteriormente, 500 mg de massa seca triturada foram levados para o processo de digestão nítrico perclórica conforme Sarruge e Haag (1974). Para isso, foram adicionados 10 mL de HNO₃ concentrado às amostras, deixando-as em repouso por 12 h. A digestão foi feita em bloco digestor a uma temperatura de 150 °C por minutos até a redução do volume de HNO₃ adicionado pela metade. Depois disso, adicionou-se 1,0 mL de HClO₄ P.A. e a temperatura aumentada para 210 °C por 20 minutos, até o clareamento da solução. Por fim, adicionaram-se 5 mL de água destilada às amostras que foram levadas para a quantificação de Cd e Zn.

Os teores de Cd e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com equipamento AAnalyst 800 Spectrometer® PerkinElmer, com atomizador tipo chama. O material de referência utilizado para garantia de qualidade foi o BCR[®] 482 Lichen, do IRMM (Institute for Reference Material and Measurements – European Commission) em cada bateria, além de uma amostra em branco (contendo apenas HNO₃).

As quantidades de Cd e Zn absorvido e translocado pelas plantas de *Alternanthera tenella* foram mensurados pelo Fator de Bioacumulação (FB) e pelo Índice de Translocação (IT), definidos pela concentração do elemento-traço na planta em relação à sua concentração no solo e a porcentagem do elemento na parte aérea em relação à quantidade total do elemento na planta, respectivamente. Os cálculos seguiram as equações abaixo:

$$FB = [ET]_{PA}/[ET]_S + [ET]_R/[ET]_S$$

$$IT = [ET]_{PA}/([ET]_{PA} + [ET]_R) \times 100$$

Em que: FB: fator de bioacumulação; IT: índice de translocação; $[ET]_{PA}$: concentração do elemento-traço na parte aérea; $[ET]_R$: concentração do elemento-traço na raiz; $[ET]_S$: concentração do elemento-traço na solução.

2.3 Análises anatômicas

Para as análises anatômicas, foram coletadas raízes e folhas completamente expandidas das plantas, após 15 dias de exposição aos tratamentos. As plantas foram fixadas em F.A.A._{70%} (formaldeído, ácido acético e etanol 70% na proporção de 0,5:0,5:9,0) por 72h sendo, posteriormente, armazenadas em etanol 70% até o momento das análises (KRAUS; ARDUIN, 1997). Para as secções transversais das folhas, fragmentos de 1 cm² da região central do limbo foliar foram desidratados em série etanólica (70, 80, 90 e 100%) sob vácuo e à temperatura ambiente, conforme protocolo adaptado de JOHANSEN (1940). Em seguida, o material foi emblocado em historesina, utilizando-se o Kit Historesina de hidroxietilmetacrilato (Leica®, Heidelberg, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Para as raízes, foram utilizados fragmentos da zona pilífera com 1 cm de comprimento, seguindo os mesmos processos de desidratação e emblocamento em historesina citados acima.

As secções transversais foram realizadas com o auxílio de um micrótomo rotativo semiautomático na espessura de 7 µm, em seguida corados em solução de Azul de Toluidina 1% (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964). Lâminas permanentes foram montadas utilizando-se Entellan® (Merck) e fotografadas com câmera AxioCam Erc 5s (Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio Axio Lab.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As análises de micromorfometria foram realizadas com o auxílio do software de

análise de imagens ImageJ[®] e a apresentação das imagens com o software CorelDRAW[®] (Corel Corporation).

Foram realizadas três repetições por tratamento e confeccionadas três lâminas por repetição, nas quais foram fotografados e analisados três campos. As variáveis avaliadas nas raízes foram: as espessuras do córtex radicular e da endoderme, o diâmetro dos elementos de vaso do metaxilema. Nas folhas, foram avaliados o diâmetro dos elementos de vaso na nervura central, as espessuras dos parênquimas paliçádico, do parênquima esponjoso, da face adaxial e abaxial da epiderme foliar.

2.4 Trocas gasosas

Os dados de trocas gasosas de *Alternanthera tenella* foram obtidos utilizando-se um analisador portátil de gases por infravermelho (modelo LI6400-XT, Li-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA), tomando-se por referência a primeira folha completamente expandida a partir do ápice caulinar. As medidas foram realizadas no período entre 8:30h-11:00h, com radiação fotossinteticamente ativa na câmara padronizada em $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em uma câmara foliar de 6 cm^2 . As variáveis avaliadas foram a taxa fotossintética (A), a condutância estomática (g_s) e a taxa transpiratória (E).

2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e posteriormente submetidos à análise de variância (ANAVA). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-knott a 5 % de probabilidade de

erro. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x3 e as análises foram realizadas no software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS

3.1 Teores, bioacumulação e translocação de Cd e Zn

Os teores de Cd e Zn encontrados nas plantas de *Alternanthera tenella* foram influenciados pela interação entre as concentrações de cada elemento aplicadas no solo (TABELA 2).

Tabela 2 - Interação entre as concentrações aplicadas de Cd e Zn sobre os teores observados nas raízes e parte aérea de *Alternanthera tenella*.

Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Teor de Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca)					
	Raiz			Parte aérea		
	0,0	1,3	20,0	0,0	1,3	20,0
5,0	0,5 Ba	2,6 Ba	170,6 Aa	0,7 Ba	7,8 Ba	136,3 Ab
300,0	1,0 Ba	5,0 Ba	152,1 Aa	1,0 Ba	13,9 Ba	82,8 Ac
2000,0	1,2 Ba	6,5 Ba	76,6 Ab	1,1 Ba	9,5 Ba	183,3 Aa
Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Teor de Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca)					
	Raiz			Folha		
	5,0	300,0	2000,0	5,0	300,0	2000,0
0,0	37,6 Ca	525,4 Ba	3839,3 Ab	62,6 Cb	734,7 Bb	1335,9 Ab
1,3	62,8 Ca	670,9 Ba	2856,1 Ac	89,7 Cb	1065,6 Ba	1342,9 Ab
20,0	116,9 Ca	800,5 Ba	4775,8 Aa	369,4 Ba	460,7 Bc	1976 Aa
		Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
BCR® 482 ⁽¹⁾		0,56	100,60	-	-	-
BCR® 482 ⁽²⁾		0,53	72,20	-	-	-
Recuperação (%)		93,99	71,77	-	-	-
LDM ⁽³⁾		0,16	0,66	-	-	-

(1) Valores certificados do padrão BCR® 482 *Lichen*; (2) Valores determinados nas análises para o padrão BCR® 482 *Lichen*; (3) LDM: Limite de detecção; Os valores são estimados para um grama de massa seca da planta. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância. Letras maiúsculas devem ser comparadas dentro das linhas e letras minúsculas devem ser comparadas dentro das colunas.

Fonte: Do autor (2016).

A absorção de Cd por *Alternanthera tenella* aumentou proporcionalmente à concentração de Cd aplicada no solo, tanto para as raízes quanto para a parte aérea e independentemente da concentração de Zn aplicada. Valores máximos de $170,6 \mu\text{g g}^{-1}$ e $183,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd foram observados para raízes e parte aérea, respectivamente. Para a concentração de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, a absorção de Cd pelas raízes foi reduzida na presença de $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn. Nas folhas, entretanto, o teor de Cd foi maior sob a aplicação de $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn (TABELA 2).

Da mesma forma como foi observada para o Cd, a absorção de Zn aumentou proporcionalmente à concentração de Zn aplicada no solo, tanto para as raízes quanto para a parte aérea, de forma independente do Cd aplicado. Os teores de Zn atingiram valores máximos de $4775,8 \mu\text{g g}^{-1}$ nas raízes e de $1976,1 \mu\text{g g}^{-1}$ na parte aérea. Nas raízes, a absorção do Cd não interferiu na absorção do Zn, com exceção de quando o Zn foi aplicado na concentração de $2000 \mu\text{g g}^{-1}$. Nesse caso, na concentração de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, a planta aumentou a absorção de Zn tanto nas raízes quanto nas folhas (TABELA 2).

Os valores de Fator de Bioacumulação (FB) e de Índice de Translocação (IT), assim como o observado para os teores do elemento, sofreram efeito da interação entre o Cd e o Zn. Os valores de FB do Cd acompanharam o aumento da concentração de Cd aplicado no solo. Na concentração aplicada de $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, o aumento da concentração de Zn induziu um aumento do FB do Cd, mas para $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd reduziu o FB do Cd. De uma forma geral, não foi observado efeito das concentrações crescentes de Cd sobre os valores de IT do Cd. Houve uma exceção apenas para a combinação entre $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd e $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, onde o Zn induziu uma maior translocação de Cd para a parte aérea (TABELA 3).

Tabela 3 - Efeito da interação entre as concentrações aplicadas de Cd e Zn sobre o fator de bioacumulação e o índice de translocação desses elementos em *Alternanthera tenella*.

Cultivo em solução nutritiva						
	Fator de bioacumulação			Índice de translocação (%)		
	Cd (µg g ⁻¹)					
Zn (µg g ⁻¹)	0,0	1,3	20,0	0,0	1,3	20,0
5,0	-	8,0 Bb	15,3 Aa	59,9 Aa	74,8 Aa	44,4 Ab
300,0	-	14,5 Ba	11,7 Ab	40,8 Ba	72,8 Aa	35,3 Bb
2000,0	-	12,3 Aa	13,0 Ab	48,0 Aa	59,2 Aa	70,4 Aa
	Zn (µg g ⁻¹)					
Cd (µg g ⁻¹)	5,0	300,0	2000,0	5,0	300,0	2000,0
0,0	20 Ac	4,2 Ba	2,6 Ba	62,6 Ab	58,3 Aa	25,9 Ba
1,3	30,5 Ab	5,8 Ba	2,1 Ca	58,8 Ab	61,3 Aa	32,0 Ba
20,0	97,2 Aa	4,2 Ba	3,4 Ba	75,9 Aa	36,5 Bb	29,3 Ba

Os valores são estimados para um grama de massa seca da planta. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância. Letras maiúsculas devem ser comparadas dentro das linhas e letras minúsculas devem ser comparadas dentro das colunas, relativas a cada tipo de cálculo (fator de bioacumulação e índice de translocação).

Fonte: Do autor (2016).

Ao contrário do observado para o Cd, os valores de FB do Zn foram inversamente proporcionais às concentrações de Zn aplicadas no solo. Esses valores foram influenciados pelo Cd apenas na combinação de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn e 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, onde a alta concentração de Cd induziu um aumento no FB do Zn. O aumento na concentração de Zn aplicada no solo induziu uma redução nos valores de IT do Zn. A concentração de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cd influenciou os valores de IT do Zn, aumentando e reduzindo a translocação para 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, respectivamente. Não houve efeito do Cd quando foi aplicado 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn (TABELA 3).

3.2 Modificações anatômicas

A anatomia radicular não foi afetada significativamente pelas concentrações de Cd aplicadas. A espessura do córtex radicular não foi afetada nem pelo Cd nem pelo Zn (FIGURA 1A; FIGURA 1B).

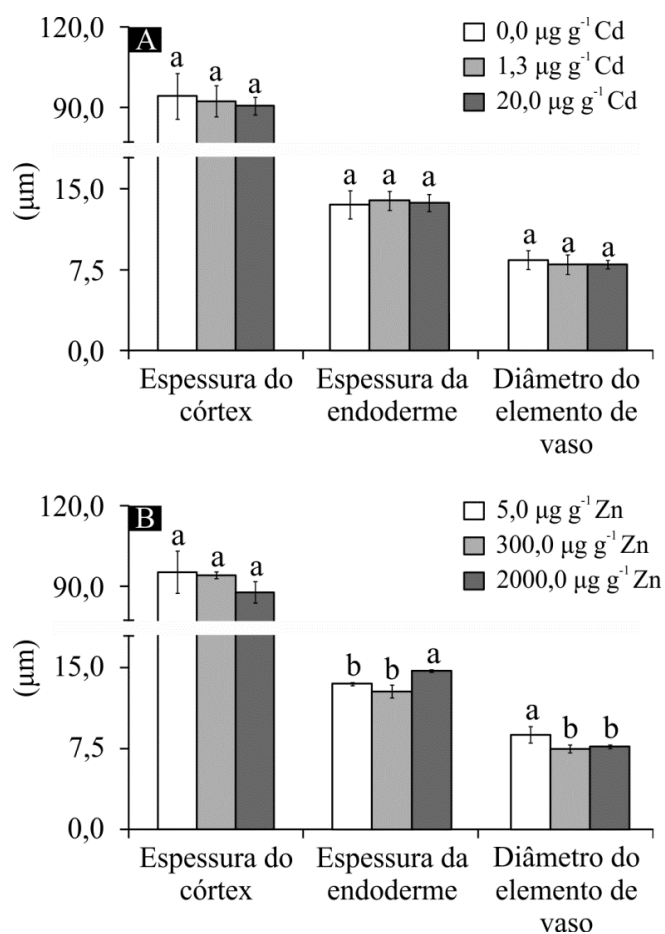


Figura 1 - Efeito do Cd (A) e do Zn (B) sobre a anatomia radicular de *Alternanthera tenella*. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância. Barra: desvio padrão. Fonte: do autor (2016)

A concentração de $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn induziu um espessamento da endoderme e, assim como a concentração intermediária ($300 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn), reduziu também o diâmetro dos elementos de vaso no cilindro vascular (FIGURA 1B). O Cd não afetou também as espessuras do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso e de ambas as faces da epiderme foliar. No entanto, as concentrações crescentes do Cd induziram a formação de elementos de vaso com maior diâmetro na nervura central da folha (FIGURA 2A).

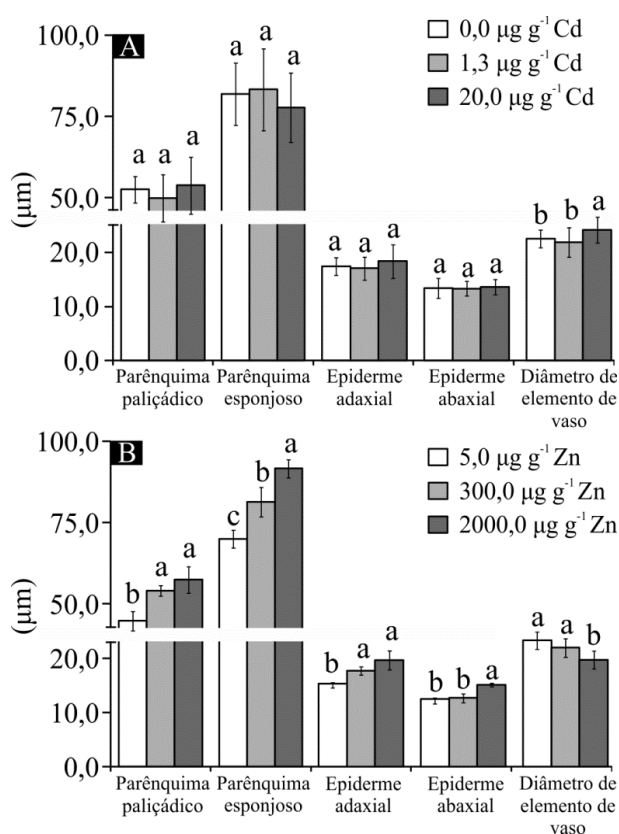


Figura 2 - Efeito do Cd (A) e do Zn (B) sobre a anatomia foliar de *Alternanthera tenella*. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância. Barra: desvio padrão. Fonte: do autor (2016)

O aumento das concentrações de Zn, por sua vez, induziu um aumento proporcional da espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso, bem como da epiderme nas faces adaxial e abaxial e, portanto, aumentou a espessura do limbo foliar como um todo (FIGURA 3). No entanto, o Zn reduziu o diâmetro dos elementos de vaso na nervura central da folha (FIGURA 2B).

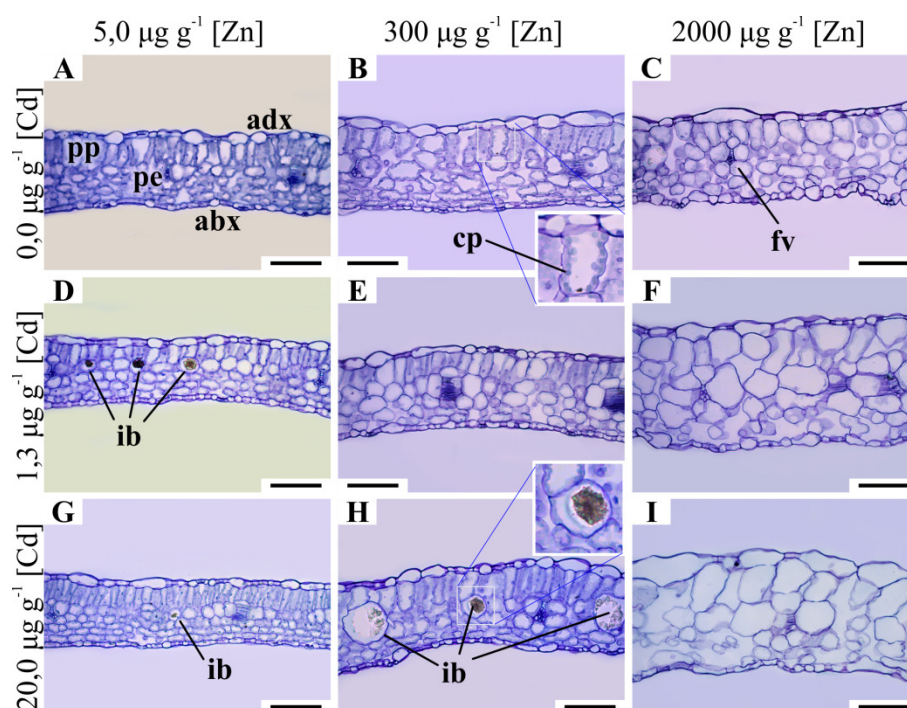


Figura 3 – Anatomia foliar de *Alternanthera tenella* exposta a diferentes combinações de concentrações de Cd e Zn. (pp) parênquima paliçádico; (pe) parênquima esponjoso; (adx) face adaxial da epiderme; (abx) face abaxial da epiderme; (cp) cloroplasto; (fv) feixe vascular; (ib) idioblasto contendo drusa (detalhe em H). Barra de escala: 100µm
Fonte: Do autor (2016).

Foi observado um aumento na frequência de idioblastos contendo drusas no limbo foliar de *Alternanthera tenella* exposta a concentrações crescentes de Cd (FIGURA 3G-H). Nas maiores concentrações de Zn foi observada uma aparente redução na quantidade de cloroplastos, principalmente nas células do parênquima paliçádico. Essa redução também foi verificada na quantidade de células do mesofilo, concomitantemente a um aumento no volume celular e na quantidade de espaços intercelulares (FIGURA 3F; FIGURA 3I).

3.3 Trocas gasosas

O Cd não induziu alterações na taxa fotossintética, na condutância estomática e na taxa transpiratória de *Alternanthera tenella* (FIGURA A). O Zn, de uma forma geral, induziu um decréscimo em todas essas variáveis, sendo as menores médias obtidas para 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn.

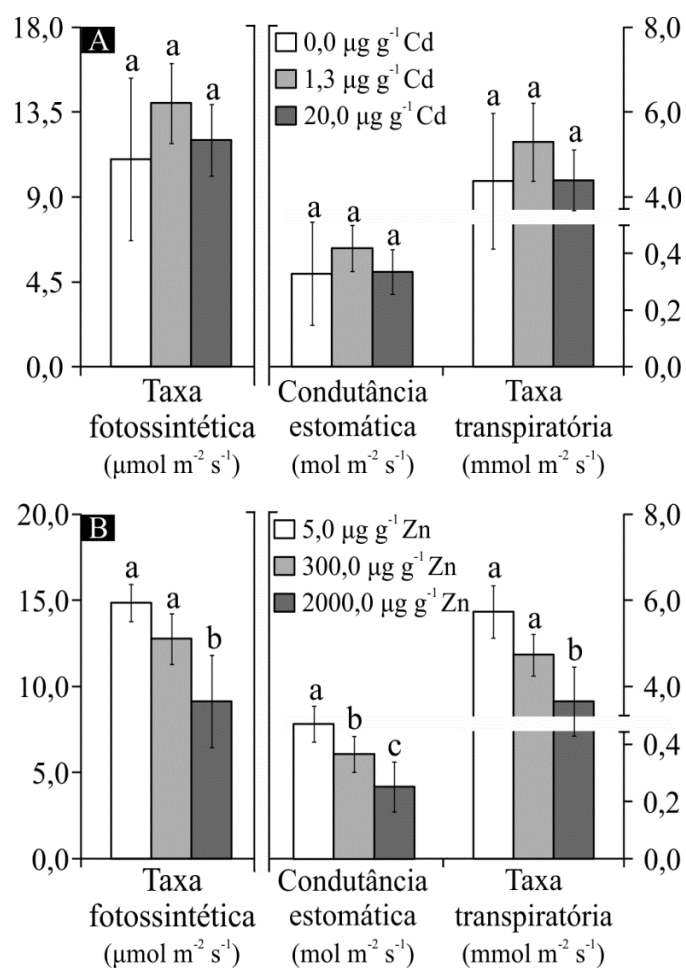


Figura - Efeito do Cd (A) e do Zn (B) sobre as trocas gasosas de *Alternanthera tenella*. Dados de taxa fotossintética no eixo vertical da esquerda; dados de condutância estomática e taxa transpiratória no eixo vertical da direita. Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância. Barra: desvio padrão. Fonte: do autor (2016)

4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados apontam *Alternanthera tenella* como uma espécie com um alto nível de tolerância e potencialmente acumuladora de Cd e Zn. A ampla ocorrência da espécie na área de mineração de Zn em Vazante-MG pode ser explicada em partes por essa tolerância. O cruzamento entre os níveis de exposição de Cd e de Zn em solo experimental trouxe uma análise interessante da interação entre esses metais em um substrato mais próximo da condição natural da espécie. Valores de 100 μg de Cd g^{-1} e de 3000 μg de Zn g^{-1} de massa seca de plantas têm sido considerados como valores mínimos para a classificação de espécies como hiperacumuladoras desses elementos (KRÄMER, 2010; van der ENT et al., 2012).

De uma forma geral, os teores de Cd e Zn em raízes e folhas de *Alternanthera tenella* aumentaram proporcionalmente aos níveis de exposição e foram maiores nas raízes do que na parte aérea da planta. Tais resultados estão de acordo com o observado para *Gomphrena claussenii* e *Gomphrena elegans* (CARVALHO et al., 2013; BORIN, 2010), ambas pertencentes à família Amaranthaceae e coletadas também na área de mineração de Zn em Vazante-MG. Essa relação direta com a concentração aplicada em *A. tenella* está de acordo com o movimento de íons por fluxo de massa, seguindo um gradiente químico da maior para a menor concentração do elemento (MARSCHNER, 2011). Assim, uma vez absorvidos pelas raízes, parte dos íons se movem principalmente pela via apoplástica, atingindo o sistema condutor e posteriormente a parte aérea da planta, enquanto a outra parte desses íons pode ser retida na raiz (ENSTONE; PETERSON, 2002; ENSTONE ; PETERSON, 2005).

Um aumento no influxo de Cd para a raiz também foi relatado para *Thlaspi caerulescens*, por efeito do aumento concomitante das concentrações de

Zn (PAPOYAN; PIÑEROS; KOCHIAN, 2007). De acordo com os autores, a intensidade do transporte via xilema foi estimulada pelas altas concentrações de Zn, fazendo com que o Cd também fosse mais absorvido e translocado. No entanto, o Cd e o Zn possuem algumas semelhanças nas suas características físico-químicas, que resultam em uma competição por sítios de ligação em proteínas e outras macromoléculas. Nesse sentido, embora altas concentrações de Zn possam estimular a absorção de Cd, elas também protegem a planta dos efeitos nocivos do metal (PAPOYAN; PIÑEROS; KOCHIAN, 2007; KUMMEROVÁ et al., 2010).

Na concentração de $1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, uma grande diferença de potencial químico foi criada quando combinada com $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, aumentando o movimento tanto de Cd quanto de Zn no sentido da raiz para a parte aérea, o que não foi observado sob $5 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn. Essa pode ter sido a causa do decréscimo no teor de Cd na raiz (em $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd e $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn), uma vez que grande parte do elemento foi translocado para a parte aérea de *Alternanthera tenella*, conforme mostram os valores de Índice de Translocação (IT) e de teor de Cd na parte aérea. Embora as altas concentrações de Zn tenham demonstrado exercer certa influência sobre a absorção e translocação de ambos os íons, a proporção entre os dois elementos deve ser considerada nos resultados de Fator de Bioacumulação (FB) e de IT. Por exemplo, o aumento progressivo da concentração de Zn diante da concentração fixa de $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, faz com que a proporção Cd:Zn diminua e, conseqüentemente, que o FB do Cd reduza.

O Cd e o Zn geralmente são sequestrados nas raízes de plantas não acumuladoras desses elementos. No entanto, a translocação desses elementos da solução do solo para as folhas tem sido considerada uma etapa chave em espécies hiperacumuladoras (MITCH, 2002; PAPOYAN; KOCHIAN, 2004). No presente trabalho, altos valores de IT foram observados tanto para o Cd quanto

para o Zn, atingindo cerca de 75% para ambos, denotando o potencial hiperacumulador de *Alternanthera tenella*.

Quando em maior concentração, o Cd contribuiu para a elevação dos teores de Zn tanto na raiz quanto na parte aérea da planta, provavelmente por ter contribuído para elevar ainda mais o movimento pelo fluxo de massa. O FB é a relação entre a quantidade do elemento na planta e a quantidade em que ele foi aplicado no meio (CARVALHO et al, 2013). Por isso, o aumento da concentração de Zn resultou na queda do FB e do IT desse elemento, uma vez que a planta poder ter atingido o seu limite de absorção. Essa provavelmente é também a causa da elevação do FB do Zn na combinação entre 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Zn e 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cd, onde a concentração mais elevada do Cd possivelmente elevou o potencial químico e consequentemente aumentou a absorção do Zn.

As características anatômicas de *Alternanthera tenella* estão de acordo com o observado por Rajendrudu, Prasad e Das (1986). A baixa expressividade do Cd sobre as modificações nas características anatômicas de *A. tenella* está provavelmente relacionada com a proteção pelas altas concentrações de Zn (PAPOYAN; PIÑEROS; KOCHIAN, 2007; KUMMEROVÁ et al., 2010). De acordo com Papoyan, Piñeros e Kochian (2007), o processo de acúmulo de elementos-traço nas plantas se divide em três etapas principais: o transporte do elemento da solução do solo para a raiz; o transporte radial desse elemento pelos tecidos radiculares até alcançar o xilema; e o transporte do elemento via xilema para as folhas, onde será armazenado nas células epidérmicas e do mesófilo foliar. A presença de elementos-traço pode induzir um aumento do córtex radicular, como resposta ao acúmulo de metais nas células corticais e, também, visando aumentar a resistência ao transporte radial pelo aumento da distância a ser percorrida pelos íons (MAKSIMOVIĆ et al., 2007; CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Portanto, a ausência de efeito do Cd e do Zn sobre a espessura

do córtex de *A. tenella* pode ser um indicativo de tolerância da espécie a esses elementos.

A função seletiva da endoderme radicular está bem esclarecida na literatura. Essa camada de células funciona como uma barreira apoplástica que controla o transporte radial de água e íons, reduzindo a entrada de contaminantes, parasitas e a perda radial de água pelas raízes (ENSTONE et al., 2002; ENSTONE ; PETERSON, 2005). O Zn é um elemento capaz de induzir o espessamento da endoderme como forma de reduzir seu influxo para o sistema condutor (BROADLEY et al., 2007). Outra estratégia que visa diminuir o fluxo de contaminantes para a parte aérea da planta é a redução no diâmetro dos elementos de vaso. Essa redução resulta em uma diminuição da condutância hidráulica (RODRÍGUEZ-GAMIR et al. 2010) e, portanto, reduz a absorção e translocação desses elementos. Dessa forma, o espessamento da endoderme e a redução do diâmetro dos vasos pela maior concentração de Zn ($2000 \mu\text{g g}^{-1}$) reduziram a translocação de Cd e Zn, conforme valores de FB e IT observados.

As plantas hiperacumuladoras possuem diversos mecanismos para reduzir a disponibilidade de metais na planta, como a quelatação, o sequestro em vacúolos ou a excreção de metais para o apoplasto (CLEMENS, 2006; ERNST, 2006). Portanto, o aumento observado no volume celular e, conseqüentemente, da espessura dos tecidos foliares pode estar relacionado com maiores volumes de vacúolos, onde o tanto o Cd como o Zn podem ter sido armazenados. Em análise da localização subcelular de Cd e Zn em *Thlaspi caerulescens*, Ma et al. (2005) encontraram que 65% do total de Zn na folha estava acumulado em vacúolos de células do mesófilo e 23% estavam imobilizados na parede celular. O Cd, por sua vez, estava localizado em até 35% do seu total na folha nos compartimentos apoplásticos. Um maior acúmulo de Cd no apoplasto também foi relatado para espécies tolerantes ao elemento, como *Sedum alfredii* e *Noccaea caerulescens* (VÁZQUEZ et al., 1992; NI; WEI, 2003; REDJALA et

al., 2009). Nesse sentido, uma vez que plantas tolerantes tendem a acumular mais Zn nos vacúolos e mais Cd na parede celular, espera-se que o espessamento do limbo foliar em *Alternanthera tenella* seja prioritariamente atribuído ao efeito do Zn, uma vez que mesofilo representa o maior volume do limbo foliar e que o Zn está em maior concentração do que o Cd.

Em seu trabalho sobre a localização subcelular de Cd e Zn nos tecidos de *Gomphrena clausenii*, CARVALHO et al. (2015) utilizaram plantas coletadas na mesma área de mineração de Zn (Vazante-MG), onde foram coletadas os espécimes de *Alternanthera tenella* utilizados no presente trabalho. Os autores demonstraram que *G. clausenii* sequestra o Cd em cristais de oxalato de cálcio presentes em vacúolos de células do caule e do parênquima esponjoso. O Zn, por sua vez, não foi encontrado nesses cristais e em altas concentrações induziu uma redução do sequestro de Cd nessas estruturas. A observação de idioblastos contendo cristais na forma de drusas no mesofilo de *A. tenella* concorda com os resultados obtidos para *G. clausenii* e, assim como propõem Carvalho et al. (2015), isso pode consistir em uma estratégia de tolerância e acúmulo de Cd na parte aérea da planta. Os resultados observados para as folhas de *A. tenella* trazem indícios, portanto, de que a planta pode utilizar modificações anatômicas como estratégias para tolerar altas concentrações de Zn. Essas modificações seriam, sobretudo, um provável reflexo de processos celulares como a compartimentalização do Zn em vacúolos de células do mesofilo e da epiderme foliar (KÜPPER; ZHAO; McGRATH, 1999). Mais tarde, Küpper et al. (2000) demonstraram que as células do mesofilo foliar em *Arabidopsis halleri* são o principal local de acúmulo de Cd e Zn, exercendo grande importância em sua hiperacumulação.

Os efeitos do Zn sobre as trocas gasosas de *Alternanthera tenella* estão relacionados com as modificações anatômicas induzidas pelo elemento como, por exemplo, a redução no diâmetro dos elementos de vaso nas raízes e nas

folhas. Essa redução interfere diretamente na condutividade hidráulica da planta que, por sua vez, afeta o potencial fotossintético e a taxa de transpiração (SPERRY, 2000). No entanto, na combinação entre $20 \mu\text{g g}^{-1}$ de Cd e $2000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Zn, a queda na taxa fotossintética pode estar relacionada também com uma queda no número de cloroplastos, observada principalmente nas células do parênquima paliçádico (FIGURA 3I). A retenção de elementos-traço nas raízes e o sequestro em locais de baixa atividade metabólica é uma forma de evitar seus efeitos sobre a fotossíntese, que é um processo altamente sensível a distúrbios ambientais (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011). No entanto, em concentrações excessivas, parte do Zn pode translocar e inibir parcialmente reações no fotossistema I e induzir o bloqueio do transporte de elétrons no fotossistema II (TRIPATHY; MOHANTY, 1980).

5 CONCLUSÃO

Alternanthera tenella apresenta-se como uma espécie eficiente na absorção de Cd e Zn de solos ricos nesses elementos-traço, podendo ser caracterizada como hipertolerante e hiperacumuladora desses elementos-traço. Nas condições do presente estudo, a espécie não sofre efeitos da toxicidade do Cd e altera a sua anatomia em resposta às altas concentrações de Zn, mas as trocas gasosas foram afetadas pelo excesso desse elemento. A sua elevada capacidade de translocação de Cd e Zn para as partes aéreas, a elege também como potencialmente aplicável na fitorremediação de solos com teores desses elementos-traço, no entanto mais estudos sobre a viabilidade dessa aplicação são necessários.

REFERÊNCIAS

- BAKER, A. J. M. Metal tolerance. **New Phytologist**, Oak Ridge, v.106, p. 93–111, Mai. 1987.
- BARCELÓ, J.; VÁSQUEZ, M.D.; POSHENRIEDER, C. H. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, Georgia, v.13, p.01-37, Nov. 1990.
- BORIN, A. L. D. C. **Fitorremediação de cádmio e zinco por Amaranthaceae**. 2010. 181 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 173, p. 677-702, Fev. 2007.
- CARVALHO, M. T. V.; PONGRAC, P.; MUMM, R.; ARKEL, J.; AELST, A.; JEROMEL, L.; VAVPETIČ, P.; PELICON, P.; AARTS, M. G. *Gomphrena claussenii*, a novel metal-hypertolerant bioindicator species, sequesters cadmium, but not zinc, in vacuolar oxalate crystals. **New Phytologist**, Oak Ridge, v. 208, n.3, p. 763-775, Jun. 2015.
- CARVALHO, V.; TOMAZ, M.; AMARAL, D. C.; GUILHERME, L. R.; AARTS, M. G. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers In Plant Science**, Melbourne, v. 4, p.180-190, Jun. 2013.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: Estruturas e funções de órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009, 234p.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v.88, p. 1707–1719, Nov. 2006.
- CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. **Resolução, N. 420**, de 28 de Dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 24 Set. 2016.
- DAS, D., SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Albany, v. 98, p. 29-36, Jun. 1997.

DRESLER, S.; HANAKA, A.; BEDNAREK, W.; MAKSYMIEC, W.
Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 36(6), p.1565-1575, Jun. 2014.

ENSTONE DE; PETERSON CA. Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 28, p. 444–455, Jan. 2005.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: structure, function and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 21, p. 335–351, Dez. 2002.

ERNST; W. H. O. Evolution of metal tolerance in higher plants. **Forest Snow and Landscape Research**, Birmensdorf, v.80, p.251–274, Jan. 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p.1039-1042, Nov. 2011.

FILHO, S. R.; VIANA, M. B. **Gestão da água: o desafio do zinco em Vazante-MG**. In: FERNANDES, F. R. C.; ENRIQUEZ, M. R., ALAMINO, R. C. J. [eds]. Recursos Minerais & Sustentabilidade Territorial. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, p. 333–360, 2011.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. S.; MARTINS, G. A.; CARNEIRO, M. M. L. C.; SOARES, A. M. Cd-tolerance markers of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen plants: anatomical and physiological features. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 293-304, Dez. 2012.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. Boca Raton: CRC press, 2010. 505 p.

KRÄMER, U. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual review of plant biology**, Palo Alto ,v.61, p. 517-534, Fev. 2010.

KRAUS, J.E., ARDUIN, M. **Manual Básico em Métodos em Morfologia Vegetal**. Seropédica: Editora Universidade Rural, 1997. 198 p.

KUMMEROVÁ, M.; ZEŽULKA, Š.; KRÁČOVÁ, K.; MASAROVÍČOVÁ, E. Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 54, p. 308-314, Jun. 2010.

- KÜPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; McGRATH, S. P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Planta**, v.212, n. 1, p.75-84, Dez. 2000.
- KÜPPER, H.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, Glasgow, v.119, p.305–312, Jan. 1999.
- LOPES, G.; COSTA, E. T. S.; PENIDO, E. S.; SPARKS, D. L.; GUILHERME, L. R. G. Binding intensity and metal partitioning in soils affected by mining and smelting activities in Minas Gerais, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsburg, v.22, p.13442–13452. Set. 2015.
- MA, J.F.; UENO, D; ZHAO, F-J; MCGRATH, S.P. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. **Planta**, Heidelberg, v. 220, p. 731–736, Mar. 2005.
- MAKSIMOVIĆ, I.; KASTORI, R.; KRSTIĆ, L.; LUKOVIĆ, J. Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. **Biologia Plantarum**, Prague, v.51, p.589-592, Mar. 2007.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos. São Paulo: ProduQuímica, 1994.153 p.
- MARCHIORETTO, M. S., SENNA, L., SIQUEIRA, J. C. “**Amaranthaceae**,” In: Catálogo de plantas e fungos do Brasil, Rio de Janeiro: A. J. Estúdio, 2010 p.590–596.
- MARQUES, A. P. G. C.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Remediation of heavy metal contaminated soils: phytoremediation as a potentially promising cleanup technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Columbus, v. 39, p. 622–654, Ago. 2009.
- MARSCHNER, H. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London: Academic press, 2011. 650 p.
- MITCH, M. L. Phytoextraction of toxic metals. A review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, Auburn, v. 31, p. 109–120, Jan. 2002.
- MONNI, S.; UHLIG, C.; JUNTILLA, O.; HANSEN, E.; HYNYNEN, J. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. **Environmental Pollution**, Albany, v 112, p. 417-426, Mar. 2001.

- NI, T.H.; WEI, Y.Z. Subcellular distribution of cadmium in mining ecotype *Sedum alfredii*. **Acta Botanica Sinica**, Toronto, v. 45, p. 925–928, Mai. 2003.
- O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue. **Protoplasma**, Sachsenplatz, v.59, p.368-373, Jun. 1964.
- PAPOYAN, A.; KOCHIAN, L. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 136, p. 3814 –3823, Out. 2004.
- PAPOYAN, A.; PIÑEROS, N.; KOCHIAN, L.V. Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Oak Ridge. v.175, p.51–58, Abr. 2007.
- PEREIRA, M. P.; RODRIGUES, L. C. A.; CORRÊA, F. F.; CASTRO, E. M.; RIBEIRO, V. E.; PEREIRA, F. J. Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. **Trees**, Heidelberg , v. 30, p. 807-814, Jun. 2016.
- RAJENDRUDU, G.; PRASAD, J. S. R.; DAS, V. S. R. C3-C4 intermediate species in *Alternanthera* (Amaranthaceae). Leaf anatomy, CO₂ compensation point, net CO₂ exchange and activities of photosynthetic enzymes. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 80, p. 409-414, Set.1986.
- RAMOS, S. J.; AVILA, F. W.; BOLDRIN, P. F.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; FAQUIN, V.; REIS, A. R.; GUILHERME, L. R. G. Response of brachiaria grass to selenium forms applied in a tropical soil. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 58, p. 521-527, Dec. 2012.
- RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant Science**, Amsterdam, v. 180, p. 169–181, Feb. 2011.
- REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; MOREL, J.L. Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. **Environmental and Experimental Botany**, Barcelona, v.67, p. 235–242, Nov. 2009.
- RODRÍGUEZ-GAMIR, J.; INTRIGLIOLO, D.S.; PRIMO-MILLO, E.; FORNER-GINER, M.A. Relationships between xylem anatomy, root hydraulic conductivity, leaf/root ratio and transpiration in citrus trees on different rootstocks. **Physiologia Plantarum**, Umeå, v. 139, p.159–169, Jan. 2010.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.

SPERRY, J. S. Hydraulic constraints on plant gas exchange. **Agricultural and forest meteorology**, New Haven, v. 104, p. 13-23, Jul. 2000.

TRIPATHY, B. C.; MOHANTY, P. Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. **Plant Physiology**, Glasgow, v. 66, p. 1174-1178, Dez. 1980.

van der ENT, A.; BAKER, A. J. M.; REEVES, R. D.; POLLARD, A. J.; AND SCHAT, H. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. **Plant and Soil**, Crawley, v. 362, p. 319–334, Jan. 2013.

VÁZQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. **The new Phytologist**, Oak Ridge, v. 120, p. 215–226, Fev.1992.

**ARTIGO 2: TOLERANCE AND POTENTIAL FOR
BIOACCUMULATION OF *Alternanthera tenella* COLLA TO CD ON *IN*
VITRO CONDITION**

(Artigo formatado conforme normas da revista
Plant Cell, Tissue and Organ Culture)

ABSTRACT

The presence of high concentrations of cadmium (Cd) in the environment can threaten to the local biota and one of its main sources are anthropic activities such as zinc (Zn) mining areas. Some plant species are able to tolerate high Cd concentrations, using anatomical and physiological strategies to avoid the absorption or accumulating this element in its biomass. The *in vitro* assessment of these strategies is an efficient way to control external variables to the experiment. We aimed to investigate the anatomical and physiological changes of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) exposed to Cd and its potential for accumulation in controlled microenvironmental conditions. We evaluated changes on leaf and root anatomy, antioxidant system and on the biomass of *A. tenella* grown in a contaminated culture medium with increasing Cd concentrations (0, 50, 100 and 150 μM), in the presence of 1500 μM Zn. *A. tenella* was able to absorbing and translocate Cd and Zn and these elements competed for the absorption by the species. The increase of Cd in the medium led to a thickening of the root tissue, which was observed to the leaves only bellow 100 μM Cd. The concentration of 150 μM Cd was toxic to the leaf tissue, stimulated the formation of hydrogen peroxide, interfering in the antioxidant system and reducing plant biomass and the chlorophyll content. Therefore, *A. tenella* is capable of tolerating high Cd concentrations, modifying its anatomy and physiology in order to compartmentalize and prevent the translocation of this element.

Keywords: plant anatomy; antioxidant system; bioaccumulation; tissue culture; phytoremediation

Introduction

Soil and water are often subject to contamination by trace elements, mainly arising from industrial activities, mining activities, surface runoff in urban areas and the application of phosphate fertilizers (Rogers et al. 2007). The mining activity is one of the main activities related to the soil contamination by cadmium (Cd) and zinc (Zn).

Cd is an element that can be easily absorbed by plant roots and be translocated to the aerial parts, what can inhibit their growth through the reduction of the photosynthetic rates and competition with the absorption of micro and macronutrients in the environment (Ahmad et al. 2015; Zadeh et al. 2008; Gonçalves et al. 2009). For this reason, unnatural Cd concentrations in the environment has been recognized as a major risk, due to its non-biodegradability and high toxicity for biota (Silva et al. 2012; Xie et al. 2013). In addition, Cd induces an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), which can damage cellular components, such as nucleic acids, proteins and polysaccharides, resulting in an increase of lipidic peroxidation. Consequently, plants can show severe stress symptoms, as chlorosis, necrosis, growth limitation and death (Monteiro et al. 2009; Pietrini et al. 2010).

Zn, in turn, is a known trace element by being an essential micronutrient for plant growth, whose deficiency results in several symptoms such as leaf area reduction, necrosis at the root apex and leaf chlorosis, among others (Broadley et al. 2007). However, at high concentrations, this trace element may be phytotoxic to the metabolism and to the plant growth (Broadley et al. 2007; Marschner 1995).

A technology recently used in the remediation of contaminated environments with trace elements is the phytoremediation process, which consists in the use of plants with the capacity of absorbing or immobilizing several types of pollutants. This technique has attracted the attention of

environmental agencies by its cost-benefit relation and its eco-friendly nature (Bharti and Banerjee 2012; Silva et al. 2015).

To improve the understanding of the potential for phytoremediation of some species, studies involving plant physiology and anatomy must be carried out (Monteiro et al. 2009; Stoláriková-Vaculíková et al. 2015; Pereira et al. 2016). Studies related to changes on the physiology and anatomy of plants under Cd exposure have already been conducted *in vitro* (Son et al. 2014; Anju et al. 2015; Manquian-Cerda et al. 2016), as well as for other metals (Khatun et al. 2008; Giampaoli et al. 2012; Martins et al. 2016). The *in vitro* cultivation technique has as its main advantage allowing the isolation of the effects of trace elements on plants metabolism from the effects of other types of stress (Giampaoli et al. 2012).

Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae) is a perennial herbaceous widely spreaded throughout the Brazilian territory and especially in degraded areas (Moreira and Bragança, 2011). The species has a wide occurrence in a Zn mining area at Vazante town, Minas Gerais, Brazil, that suggests its tolerance and potential for accumulation of trace elements from the soil. Therefore, based on the potential for phytoremediation of several species of the Amaranthaceae family, we aimed to investigate the modifications in the plant anatomy and physiology of *A. tenella* under Cd effect, as well as the ability for bioaccumulation of these elements by the species under controlled microenvironmental conditions.

Material and methods

Experimental design

Plants of *A. tenella* were collected from three sites in a waste of a zinc mining area, located in Vazante town (S 17°55'13,7" W 46°48'45"), in the state of Minas Gerais, Brazil. The soil of this area presents high phytoavailable levels

of Cd and Zn (10489 mg dm^{-3} Zn and 158 mg dm^{-3} Cd, according to Lopes et al. 2015). Plants were transferred to a greenhouse and replanted in 2 L plastic pots containing commercial substrate Plantmax® irrigated daily. In these pots, plants were propagated by seeds in order to reach an homogeneous matrix, from which the containing the seeds were obtained for the experiment execution. Plants collected in the environment were used for the establishment of the voucher specimen.

Seeds were extracted mechanically from the plants and properly disinfested with a 70% ethanol solution for a minute, and a 30% sodium hypochlorite solution (2.5% active chlorine) for 20 minutes. Subsequently, the seeds were washed with distilled water previously autoclaved for three times and in aseptic condition, then they were inoculated in test tubes containing 10 mL of MS medium (Murashige and Skoog 1962). At 60 days of cultivation, the obtained plants were pricked out and the nodal segments inoculated in 250 mL glass containers containing 50 mL MS medium. All the pricking procedure was carried out three times, at each 30 days, to obtain the necessary number of plants. The media were supplemented with 30 g L^{-1} sucrose, solidified with 6 g L^{-1} agar, pH adjusted to 5.8 before the autoclaving at 120°C , during 20 minutes. After the inoculation, the material was kept in a growth room at $27 \pm 2^\circ \text{C}$ with 16-h photoperiod under fluorescent lights Philips Master TL5 HO, 49 W/840, providing $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of photosynthetically active radiation.

Side sprouts of *A. tenella* obtained in the previous stage with approximately 3 cm of growth, were individualized using a scalpel, transferred to 250 mL glass containers containing 50 mL MS medium solidified with 6 g L^{-1} agar and supplemented with 0, 50, 100 and $150 \mu\text{M}$ Cd, reaching four treatments. All the media had the addition of 30 g L^{-1} sucrose and $1500 \mu\text{M}$ Zn. This Zn concentration was selected based on previous test and represents the "No Observed Effect Concentration" (NOEC) and the Cd concentrations were

adapted from Carvalho et al. (2013). Cd and Zn sources were, respectively, cadmium nitrate [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] and zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

In each glass container were inoculated five shoots and the pH of the media was adjusted to 5.8 before the autoclaving at 120 °C, during 20 minutes. After the inoculation, the material was kept in a growth room at 27 ± 2 °C with a 16-h photoperiod under fluorescent lights Philips Master TL5 HO, 49 W/840, providing $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of radiation photosynthetically active. After 30 days of exposure to Cd, were collected the data of fresh weight and chlorophyll content, as well as the material to be used in anatomical and enzymatic analysis.

Cd and Zn Levels and bioaccumulation

Plants of *A. tenella* exposed to different treatments were collected and washed with distilled water. Five replicates of each treatment were used and, due to its small size, there was not separation between roots and shoots to enable the quantification of metals. Then, plant material was dried at 40 °C until reach constant weight, triturated in a Willye-type knife mill. Subsequently, 500 mg of ground dry mass were taken to the perchloric nitric digestion process Sarruge e Haag (1974). For this, 10 mL of concentrated HNO_3 were added to the samples, leaving them resting for 12 h. The digestion process was done in digester block at a temperature of 150 °C per minute until the HNO_3 volume reduction, added by half. After this was added 1.0 mL HClO_4 P.A. and the temperature increased to 210 °C for 20 minutes, to the brightening of the solution. Finally, 5 mL distilled water was added to the samples that were taken for quantification of Cd and Zn.

Cd and Zn levels were determined by spectrophotometry of atomic absorption with AAnalyst 800 Spectrometer® PerkinElmer equipment, with atomizer type flame. The reference material used for quality assurance was the BCR® 482 Lichen, of the IRMM (Institute for Reference Materials and

Measurements - European Commission) on each battery, besides a blank sample (only HNO₃).

The Bioaccumulation Factor (BF) was calculated for both Cd and Zn based on the element concentration in the whole plant in relation to its concentration in the culture medium, according to the equation bellow:

$$BF = [TE]_p / [TE]_M$$

where BF: Bioaccumulation Factor; [TE]_p: concentration of the trace element in the whole plant; [TE]_M: trace element concentration in the culture medium (adapted from Rezvani and Zaefarian et al. 2011).

Anatomical analysis

Anatomical analyses were performed for roots and leaves formed under the influence of the contaminated medium, after 30 days of exposure to the treatments. Plants were fixed in F.A.A._{70%} (formaldehyde, acetic acid and ethanol 70% in the proportion of 0,5:0,5:9,0) by 72h, then transferred and stored in 70% ethanol until the moment of the analysis (Kraus and Arduin 1997). Leaves cross sections were obtained using fragments with approximately 1 cm² from the leaf middle region, which were dehydrated in ethanol series (70, 80, 90 and 100%) under vacuum at room temperature, according adapted from Johansen (1940). The material was infiltrated using the historesin Kit (hydroxyethyl methacrylate, Leica®, Heidelberg), following the manufacturer's instructions. Fragments from the root absorption zone (~1 cm) were used to the cross sections, following the same processes of dehydration and infiltration mentioned for the leaves.

Cross sections 7 µm thick were made for both roots and leaves with the aid of a semiautomatic rotating microtome and dyed with Toluidine Blue

solution of 1% (O'Brien et al. 1964). Permanent slides were mounted using Entellan® (Merck) as mounting medium and photographed with camera AxioCam Erc 5s (Zeiss, Göttingen, Germany) attached to an Axio Lab.A1 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Morphometric analysis were made with the aid of the ImageJ® Software and the Fig.s were handled using CorelDRAW® Software X7 Version (Corel Corporation).

Six replications were carried out per treatment and three slides were made for each replicate. Three fields by slide were photographed and analyzed. Variables evaluated in the roots were epidermis thickness, cortex thickness, endodermis thickness, vascular cylinder area, vascular cylinder to total area ratio (vascular cylinder area / total area $\times$ 100). Variables evaluated in the leaf midrib were xylem area, area phloem area and total vascular bundle area. In the limb of the leaf were evaluated the thickness of the palisade parenchyma, spongy parenchyma, adaxial and abaxial surface of the epidermis.

Antioxidant system enzyme

Fresh material from the root and shoot of *A. tenella* was conditioned in aluminum foil, immersed in liquid nitrogen and subsequently stored in a ultra-freezer at -80 °C until the analyses.

The enzymatic extract was obtained by maceration in liquid nitrogen from 100 mg fresh plant material. They were added to the sample 1500 μ L of extraction buffer, containing 375 μ L of potassium phosphate 400Mm, pH 7.8, 15 μ L EDTA 10mM, 75 μ L of ascorbic acid 200mM and 1035 μ L of water. The extract was centrifuged at 13,000 g for 10 minutes at 4 °C and the supernatant collected and stored at -20 °C. The supernatant collected was used in the quantification analysis of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) activity, as described by Biemelt et al. (1998).

SOD activity was evaluated by the enzyme's capacity in inhibiting the photoreduction of nitroblue tetrazolium (NBT). One unit of the SOD corresponds to the capacity of the enzyme to reduce in 50% the photoreduction of the NBT, as described by (Giannopolitis and Ries 1977). APX activity was determined by the accompaniment of the oxidation of ascorbate at 290 nm for each 15 seconds along three minutes, at the molar extinction coefficient of 2.8 mm cm^{-1} (Nakano and Asada 1981).

For the quantification of the hydrogen peroxide (H_2O_2), the spectrophotometric readings were conducted at 390 nm according to Velikova et al. 2000. The quantification was carried out based on a standard curve with known concentrations of hydrogen peroxide. Lipid peroxidation activity were determined through the quantification of reactive species to the thiobarbituric acid according to Buege and Aust (1978).

Fresh weight and chlorophyll content

Fresh weight data were obtained from groups of five plants which composed each one of the six replicates, using an analytical balance. Chlorophyll content was obtained with the aid of a portable chlorophyll meter SPAD-502 (Konica Minolta, Osaka, Japan) from the first fully-expanded leaves from the shoot apex, using 16 replicates.

Statistical analyses

Data were evaluated for their normality by the Shapiro-Wilk test and then an one way analysis of variance (ANOVA) was performed. Averages were compared by Tukey test at 5% of probability of error. A completely randomized design was used and the analyses were carried out in SISVAR statistical software (Ferreira 2011).

Results

Cd and Zn levels and bioaccumulation

A. tenella plants absorbed more Cd following the increase in the applied concentration of the element in the medium, reaching a maximum value 1829.8 μM Cd. Zn absorption by plants, however, it was reduced according to the increase of the Cd applied concentration (Fig. 1), recording the minimum value of 257.6 μM when exposed to 150 μM Cd.

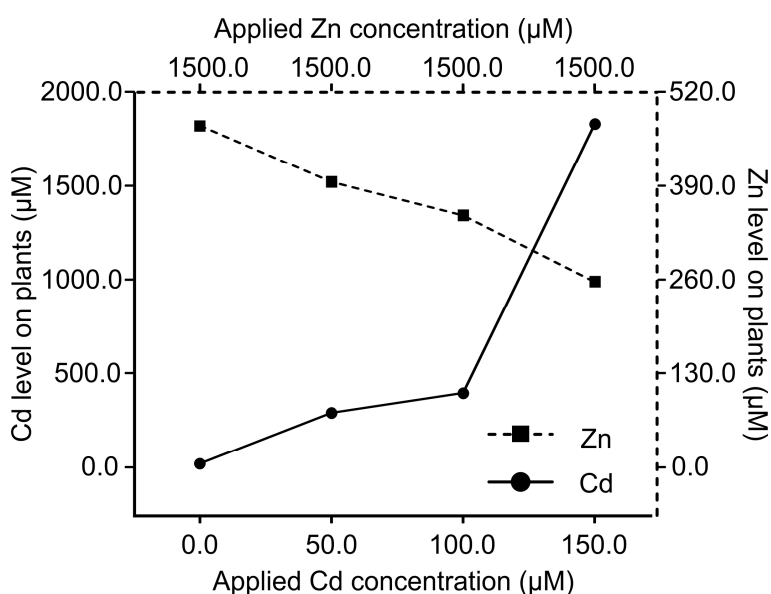


Fig. 1 - Applied *versus* obtained concentrations of Cd and Zn from *A. tenella* plants cultivated *in vitro*

The same was observed for the Cd to Zn ratio (Cd:Zn), which ranged from 0.73:1 at 50 μM Cd up to 7.10:1 at highest Cd concentration (150 μM). The Bioaccumulation Factor (BF) followed the same trend of the element levels, increasing to Cd and decreasing to Zn (Table 1).

Table 1 - Levels of trace elements and bioaccumulation of Cd and Zn in the dry mass of *A. tenella* plants *in vitro* cultivated

Applied concentration (μM)		Level (μM) by kg of dry mass		
Cd	Zn	Cd	Zn	Cd:Zn
0	1500	17.4 c	473.2 a	0.04:1
50	1500	289.4 b	395.6 ab	0.73:1
100	1500	394.5 b	349.2 b	1.12:1
150	1500	1829.8 a	257.6 c	7.10:1
		BF [Cd]	BF [Zn]	-
0	1500	-	0.3 a	-
50	1500	5.8 c	0.3 ab	-
100	1500	3.9 b	0.2 b	-
150	1500	12.2 a	0.2 c	-
BCR [®] 482 ⁽¹⁾		1.82	349.84	-
BCR [®] 482 ⁽²⁾		1.71	251.09	-
Recovering (%)		93.99	71.77	-
DLM		0.51	2.28	-

(Cd:Zn) Cd to Zn ratio; (BF) bioaccumulation factor; (1) standard certified values BCR[®] 482 *Lichen*; (2) Values obtained in BCR[®] 482 *Lichen* analysis; (3) DLM: Detection limit. Averages with the same letters within the columns do not differ among them by Tukey test at 5% of significance

Anatomical modifications

The increase in Cd concentration induced a thickening of epidermis, cortex and endodermis of *A. tenella* roots (Figs. 2, 3).

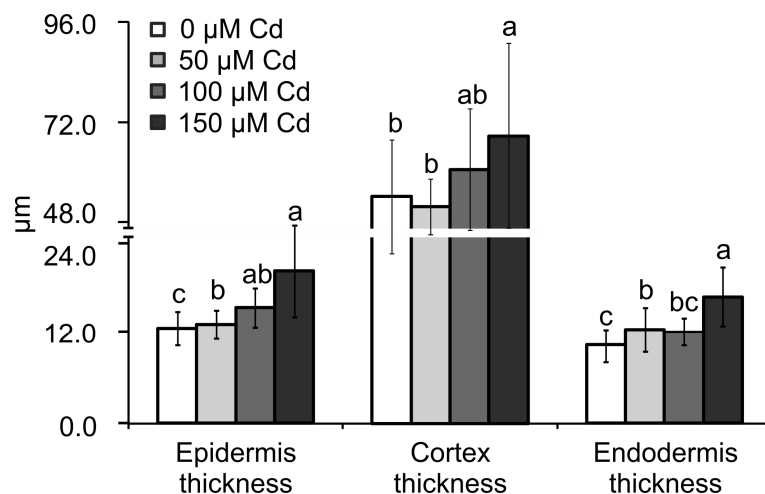


Fig. 2 - Cd effects on the thickness of epidermis, cortex and endodermis of *A. tenella* roots. Averages followed by the same letter do not differ between them by Tukey test at 5% of significance. Bar: standard deviation

This effect of 150 μM Cd was also observed for the vascular cylinder area and for the total root area, which were higher under the influence of this concentration (Figs. 3, 4).

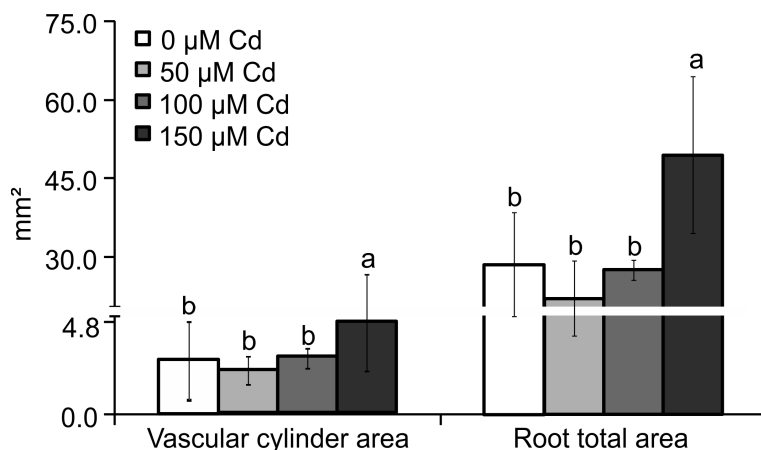


Fig. 3 - Cd effects on the vascular cylinder and root total areas of *A. tenella* plants. Averages followed by the same letter do not differ between them by Tukey test at 5% of significance. Bar: standard deviation

Root epidermis and cortex of *A. tenella* showed greater thickness when exposed to 150 μM Cd, differing significantly from treatments with 0 and 50 μM Cd. However, endodermis thickness at 150 μM Cd was higher than all the other treatments.

Although at high Cd concentrations had occurred a larger root area in *A. tenella*, the structure of the tissues in the cross-section presented distortions, with apparently degraded and irregular cells, which was not observed for other treatments, especially in the closest region to the vascular cylinder (Fig. 4d).

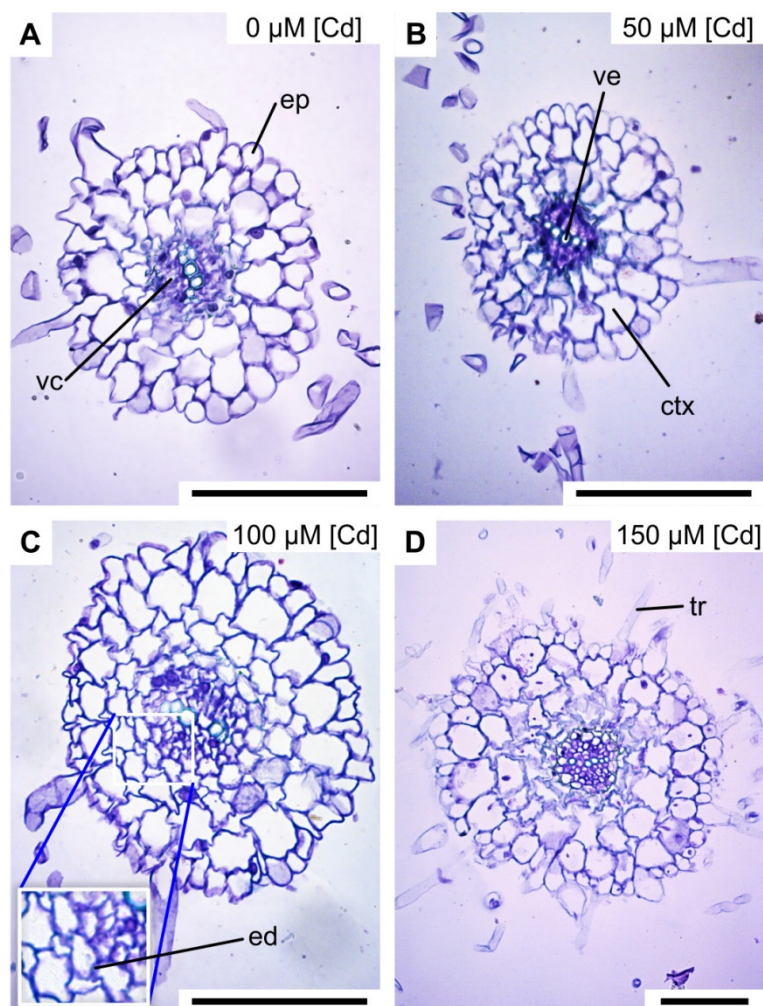


Fig. 4 - Root anatomy of *A. tenella* exposed to Cd. ep - root epidermis; vc - vascular cylinder; ve - vessel element; ctx - root cortex; ed - endodermis; tr - root trichomes. Detail in C: wall thickening in the endodermis cells. Scale bar: 100μm

Leaves of *A. tenella* present leaf blade with uniseriate epidermis and a dorsiventral mesophyll (Fig. 5). The presence of Cd in the leaves reduced the epidermis thickness for both adaxial and abaxial faces. Therefore, this reduction

was more evident at the highest Cd concentration (150 μ M), while under 50 μ M Cd the epidermis thickness was not different from the control (Fig. 5b2).

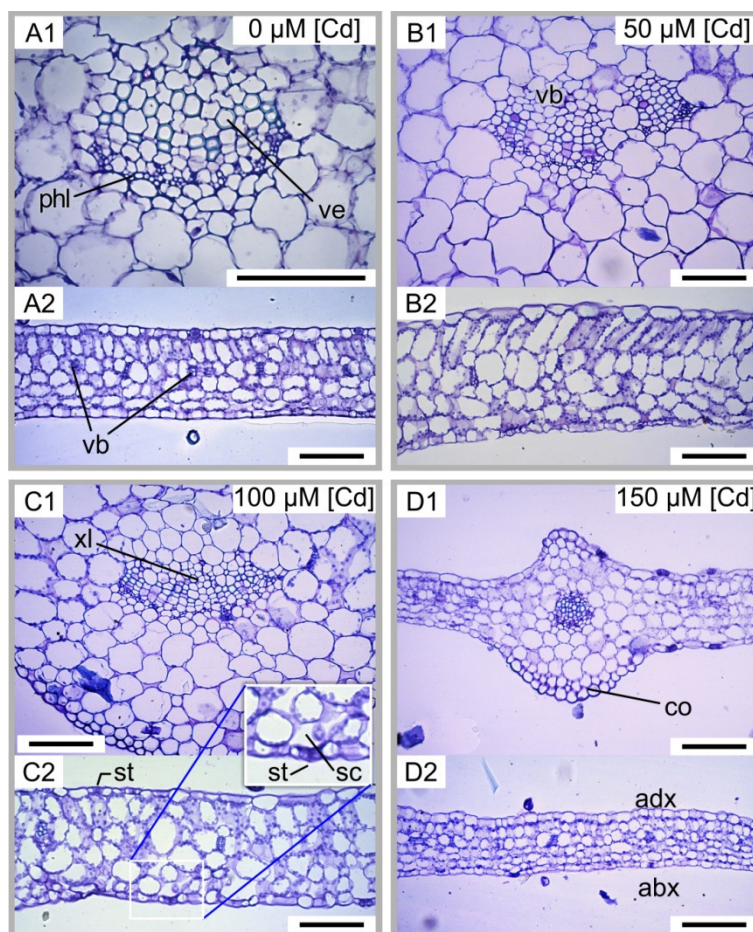


Fig. 5 - Leaf anatomy of *A. tenella* exposed to Cd. (A1-D1) cross sections of the leaf in the midrib region - (phl) phloem.; (ve) vessel element; (vb) vascular bundle; (xl) xylem; (co) collenchyma; (A2-D2) - cross sections of the leaf limb; (pp) palisade parenchyma; (sp) spongy parenchyma; (st) stomata; (sc) substomatic chamber; (adx) adaxial epidermis; (abx) abaxial epidermis. Detail in C2: zoom of the abaxial face of the leaf epidermis showing stomata and substomatic camera. Scale bar: 100 μ m

We also observed a decrease in relation to the control for the thickness of the palisade and spongy parenchyma (Figs. 5a2-d2, 6a). However, this decrease occurred only in leaves exposed to 150 μM Cd, while for 50 and 100 μM Cd we observed an increase in the thickness of these tissues.

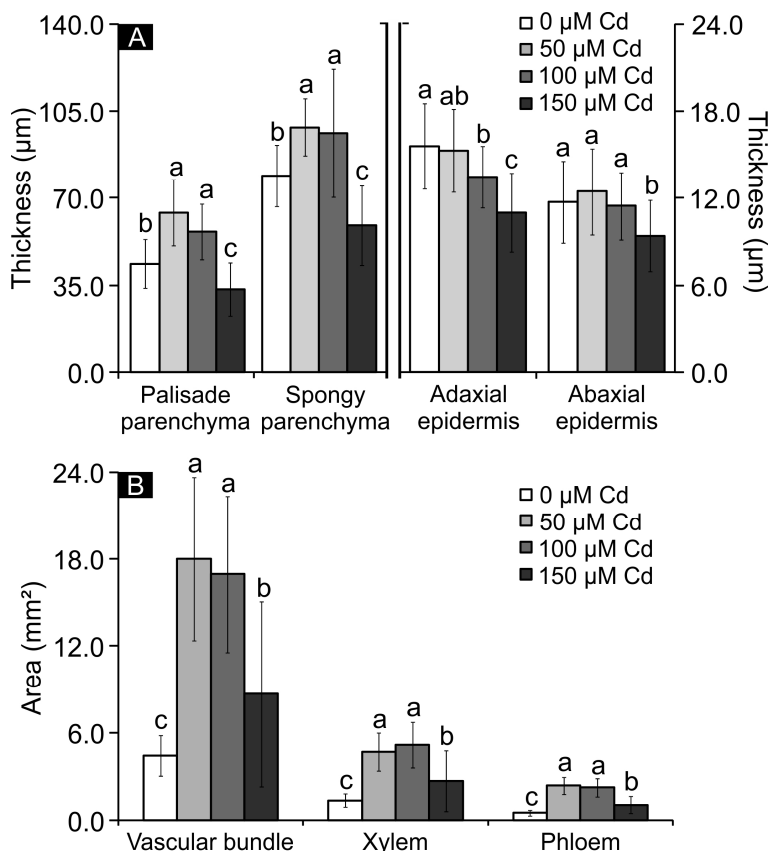


Fig. 6 - Cd effects on the anatomical characteristics of the leaf blade (A) and of the leaf midrib (B). In A, thickness values of the palisade and spongy parenchyma are on the left vertical axis and the values of adaxial and abaxial faces of the leaf epidermis are on the right vertical axis. Averages followed by the same letter do not differ between them by Tukey test at 5% of significance. Bar: standard deviation

Both 50 and 100 μM Cd have also induced an increase of xylem and phloem areas, which directly influenced the total bundle area (Figs. 6b, 5a1-d1).

Despite the decrease in the tissues area under 150 μM Cd, they remained larger than the control. At 50 and 100 μM Cd we also observed that the cells throughout the leaf limb presented higher volumes and a slight increase in the intercellular spaces. Under 100 μM Cd, the palisade parenchyma presented cells with an irregular shape and it did not show a regular elongated cell form of the tissue, becoming difficult to differentiate the palisade and spongy parenchyma at 150 μM Cd (Fig. 5).

Antioxidant system enzymes

The increase in Cd concentrations stimulated the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2) only in the two highest concentrations (100 and 150 μM), which presented higher averages than the other treatments. The lipid peroxidation, however, was increased by the levels of H_2O_2 only for 150 μM Cd (Fig. 7).

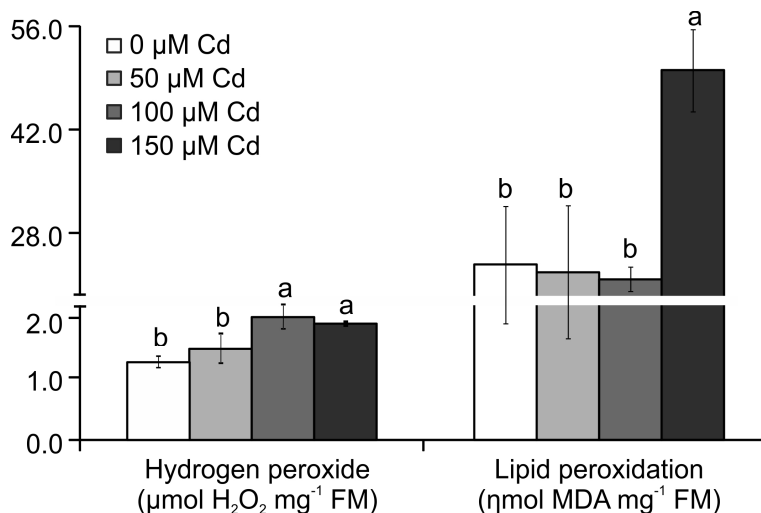


Fig. 7 - Hydrogen peroxide levels and lipidic peroxidation in *A. tenella* plants exposed to Cd. Averages followed by the same letter do not differ between them by Tukey test at 5% of significance. Bar: standard deviation

The activity of superoxide dismutase (SOD) remained the same as the control treatment for plants exposed to concentrations of 50 and 100 μM , decreasing under 150 μM Cd. The activity of ascorbate peroxidase (APX), however, was higher in the presence of all Cd concentrations and different of the control treatment (Fig. 8).

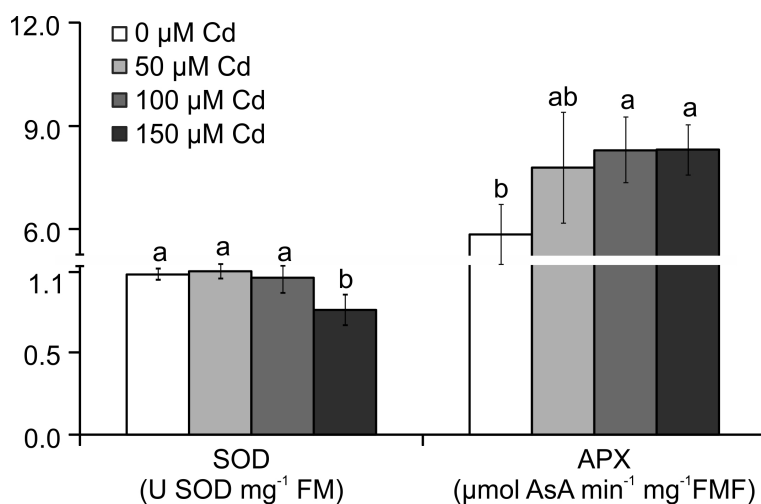


Fig. 8 - The superoxide dismutase activity (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in *A. tenella* plants exposed to increasing Cd concentrations. Averages followed by the same letter do not differ between them by Tukey test at 5% of significance. Bar: standard deviation.

Fresh weight and chlorophyll levels

The fresh weight of the plants was reduced by the increase of the Cd concentration in the medium. Under 150 μM Cd, the plants presented lower fresh weight than the other treatments, while the control treatment presented higher averages. The concentrations of 50 and 100 μM Cd did not differ between them (Fig. 9). The effect of Cd on the chlorophyll levels, however, it was only observed for 100 and 150 μM Cd, which differed statistically of 0 and 50 μM Cd. The concentration of 50 μM , in turn, caused no effect on this characteristic.

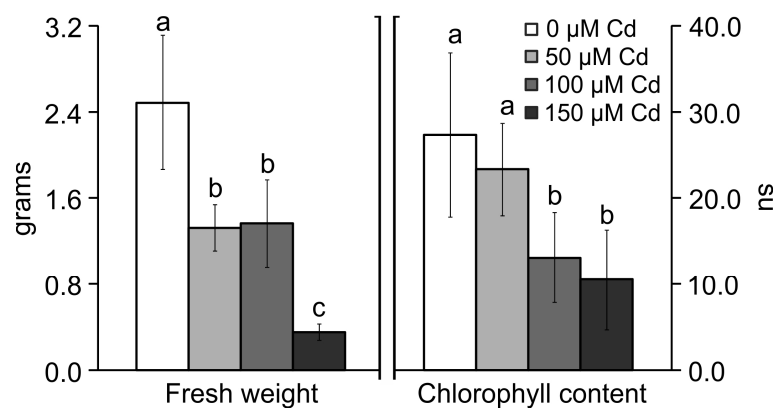


Fig. 9 - Fresh weight (values on the left vertical axis) and chlorophyll levels (values on the right vertical axis) of *A. tenella* plants exposed to increasing Cd concentrations. su- SPAD units. Averages followed by the same letter do not differ between them by Tukey test at 5% of significance. Bar: standard deviation

A qualitative analysis evidenced a gradual decrease in the plant production of *A. tenella* by the effect of increasing Cd concentrations, such for leaf as for root (Fig. 10). We observed less developed plants and with acute symptoms of chlorosis under 150 µM Cd.

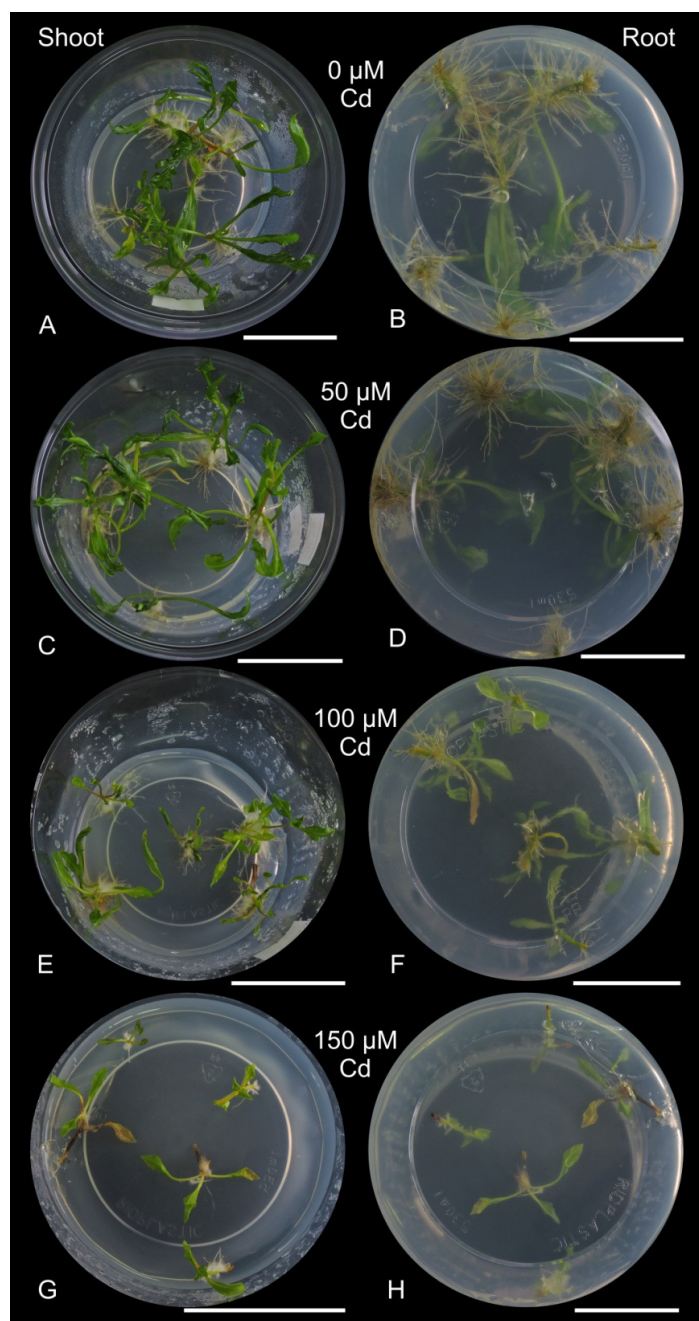


Fig. 10 - Comparison between the plant production of shoots and roots of *A. tenella* under Cd effect. Scale bar: 5 cm

Discussion

Cd level increase in *A. tenella* into *in vitro* conditions followed the observed for several species such as, for example, *Gomphrena claussenii* (Carvalho et al. 2013), *Pfaffia glomerata* (Gomes et al. 2012) and *Alternanthera philoxeroides* (Souza et al. 2009) in hydroponics system. This may be related to the high mobility of the Cd (Barceló et al. 1990) and that the movement of ions by mass flow, following a chemical gradient from the higher to a lower concentration (Marschner 1995). Besides, in conditions of high water availability the absorption of minerals elements may be optimized (Gonçalves et al. 2009).

Cd absorption demonstrated to compete with Zn absorption (Fig. 1), once that Zn levels decreased as far as that the increased Cd concentrations in the medium. Some similarities in Cd and Zn physical-chemical characteristics may result in competition for attachment sites on proteins and other macromolecules (Papoyan et al. 2007; Kummerová et al. 2010). Thus, although high Zn concentrations may stimulate Cd absorption, they can also protect the plant from the harmful Cd effects (Papoyan et al. 2007; Kummerová et al. 2010). Thus, the results obtained in the present study suggest that when Cd:Zn is maintained, the Cd tends to present less toxicity to the plant (Accioly and Siqueira 2000).

The great elevation of Cd bioaccumulation factor (BF) by the 150 μ M Cd effect may be related to the abrupt inversion of the Cd:Zn on the plant (Table 1). This inversion may, above all, had been the major factor for the effects of toxicity observed for high Cd concentrations.

The anatomical features of *A. tenella* presented in this work are in accordance with the presented by Rajendrudu et al. (1986) for the species. The increased thickness observed for the root tissue is probably related to the thickening of the endodermis by the Cd effect. The protective function of the

endodermis are well described in the literature, which acts as an apoplastic barrier controlling the radial transport of water and ions, for avoiding the entrance of contaminants and parasites, as well as the excessive loss of water through the plant (Enstone and Peterson 2002; Enstone and Peterson 2005; Liška et al. 2016; Martins et al. 2016).

Under Cd stress, the endodermis begins to differentiate closer to the root apex in several species such as *Arabidopsis thaliana* (Schreiber et al. 1999), *Silene dioica* (Martinka and Lux 2004), *Karwinskia humboldtiana* (Zelko and Lux 2004) and *Zea mays* (Vaculík et al. 2009). In this context, the efficiency and the comparability of tests with trace elements into *in vitro* conditions were demonstrated by Lux et al. (2011) and more recently by Liška et al. (2016), which confirmed the Cd effect anticipating the maturation of endodermis in *Z. mays*.

The Cd effect on the proportion of the root tissue and changes on the development of apoplastic barriers such as epidermis, exodermis and endodermis are known in the literature (Redjala et al. 2009). Thus, the thickening of the endodermis in *A. tenella* may have progressively reduced the translocation of both Cd and Zn. However, with the Cd concentration increase for 100 and 150 μM , a greater part of the Cd in the roots may be translocated and reduced the Zn translocation by competition, causing toxic effects on the leaves.

According to Lux et al. (2011), most of the accumulated Cd in the roots is located mainly in the cell wall of cortical cells, while smaller quantities are kidnapped in the vacuole of these cells. However, a thickened endodermis strongly contributed to the large Zn accumulation in the root of *Thlaspi caerulescens*, increasing the biomass of this organ (Broadley et al. 2007). The accumulation of increasing concentrations of Cd as well as Zn in the root was also observed for *Lupinus uncinatus* Schldl. (Ehsan et al. 2015).

Pereira et al. (2016) also observed a thickening of the leaf mesophyll by the Cd effect in *Schinus molle* and a subsequent decrease in its highest evaluated concentration (250 μM). We observed a similar growth at low Cd concentrations for *A. tenella*, which occurred such in the mesophyll cells as in the vascular bundle located in the leaf midrib. It may be related to Zn accumulation in these cells as the reported by Ma et al. (2005) for *Thlaspi caerulescens*. Cd may inhibit the plant growth by reducing the photosynthetic rate and the competition with the absorption of micro and macronutrients present in the medium (Ahmad et al. 2015; Zadeh et al. 2008; Gonçalves et al. 2009). The mesophyll thickening observed in *A. tenella*, however, occurred simultaneously to a decrease in plant growth (Fig. 9), especially under the highest Cd concentration.

According to Romero-Puertas et al. (2006), the peroxidation of the membrane lipids may be associated with the presence of toxic Cd levels, because this element promotes increased levels of the reactive oxygen species (ROS). The increase of the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) observed for the two highest Cd concentrations over *A. tenella* may, therefore, explain the high lipid peroxidation rate for the concentration of 150 μM and the symptoms of toxicity observed in this concentration. The membranes lipid peroxidation may alter its permeability and its fluidity (Kabata-Pendias 2010), which may have allowed the entrance of more Cd in the symplast. The increase of ROS by the Cd effect may also induce the occurrence of apoptosis and damage in the DNA structure (Filipič and Hei 2004), which explains part of the degradation observed in the roots of the *A. tenella* (Fig. 4d).

Oxidative stress caused by ROS may be softened by the regulation of the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of the plants (Khan et al. 2009; Irfan et al. 2010). The negative Cd effect observed on the activity of superoxide dismutase (SOD), for example, it may be related to a decline in the glutathione levels, caused by an increase in the use of phytochelatins (Guimarães

et al. 2008), but also with direct interaction between glutathione and the Cd and its subsequent transport to vacuoles (Pietrini et al. 2003). Chinmayee et al. (2013) demonstrated that Cd induces modifications in several enzymes in *A. tenella*, such as catalase, SOD, APX, glutathione reductase (GR), polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POX), all related to the ROS detoxification.

The increase of the ascorbate peroxidase (APX) activity probably was due to the great affinity of this enzyme H_2O_2 (Gill and Tuteja 2010) and by an attempt to reduce the oxidative stress induced by the Cd. This answer of the APX is in agreement with the reported in the literature for *A. tenella* (Chinmayee et al. 2013). Besides its high affinity for H_2O_2 , APX is present in several cellular compartments such as chloroplasts, mitochondria, peroxisomes or in the cytosol, also presenting several isoenzymes with control functions in the formation of ROS and cellular H_2O_2 signaling (Willekens et al. 1995). Thus, the increasing levels of H_2O_2 induced by high Cd concentration may have directly determined the increase of APX activity.

The effects of the concentration of 150 μM Cd on *A. tenella*, point to a toxic level of the trace element, unlikely of the obtained for lower concentrations. This was observed for the responses of the enzymes of the antioxidant system and thickening or reduction of the cells and whole tissues by the Cd effect. Therefore, the deleterious result of this concentration of the vegetable growth and biomass accumulation (Fig. 10) was expected and has the features mentioned above as a basis for its explanation.

The decrease in chlorophyll and carotenoids levels by the Cd effect has already been observed for *A. tenella*, (Chinmayee et al. 2013). According to the authors, this reduction may be related to the inhibition of the enzymes related to the biosynthesis of chlorophyll by the effect of stress for the metal. Cd is known by affecting this biosynthesis process (Stobart et al. 1985) and by reducing the chlorophyll level in several species as *Alternanthera sessilis* (Chinmayee et al.

2013), *Zea mays* (Dresler, et al. 2014), *Matricaria recutita* (Kummerová, et al. 2010). Pereira et al. (2016) observed not only a decrease in chlorophyll level to *Schinus molle* under 250 μM Cd, but also the decrease in photosynthetic rate as a consequence. Among the reported causes of chlorosis observed by the Cd effect are: Cd competition with iron absorption sites in the plasma membrane, affecting the stability of chlorophylls; the reduction of manganese transport by Cd; and a decrease in the replication of the chloroplast (Guimarães et al. 2008). Küpper et al. (2007) had demonstrated that Cd acts mainly on the photosystem II in *Thlaspi caerulescens*, which later was confirmed by Basa et al (2014) for *Beta vulgaris* L.. Myśliwa-Kurdziel et al. (2004) had argued that high concentrations of this element cause malformation of chloroplasts and the dilatation of the membrane of the thylakoid.

Conclusion

Under the experiment conditions, *A. tenella* plants are tolerant to Cd until the concentration of 100 μM , but begins to suffer toxic effects caused by the element in the concentration of 150 μM . These effects are influenced by the competition between Cd and Zn absorption, increasing the Cd proportion in the plant as far as is applied in the medium.

A. tenella modifies its root and leaf anatomy in order to compartmentalize Cd and Zn to survive to the stress by these elements. Cd induces the formation of hydrogen peroxide, increasing the ascorbate peroxidase activity as a way of combat the effects of this radical in plants.

Therefore, the species has the potential to apply phytoremediation processes in areas where Cd occurs simultaneously to Zn, although, more studies about the viability of this application need.

References

- Accioly AMDA, Siqueira JO, Novais RD, Alvarez V, Schaefer CEGR (2000). Contaminação química e biorremediação do solo. In: Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1:299-351.
- Ahmad A, Hadi F, Ali N (2015) Effective phytoextraction of cadmium (Cd) with increasing concentration of total phenolics and free proline in *Cannabis sativa* (L) plant under various treatments of fertilizers, plant growth regulators and sodium salt. *Int J Phytorem* 17:56–65. doi: 10.1080/15226514.2013.828018
- Anju M, Sanskriti G, Suresh BS, Nidhi S (2015) *In vitro* accumulation of cadmium chloride in papaya seedling and its impact on plant protein. *Int J Ayurveda Pharma Res* 2:54-62.
- Barceló J, Poschenrieder C (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J Plant Nutr* 13:1-37. doi: 10.1080/01904169009364057
- 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.) *Env Exp Bot* 101:1-11. doi: 10.1016/j.envexpbot.2013.12.026
- Bharti S, Banerjee TK (2012) Phytoremediation of the coalmine effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 81:36-42. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.04.009
- Biemelt S, Keetman U, Albrecht G (1998) Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings *Plan Physiol* 116:651-658. doi: 10.1104/pp.116.2.651
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A (2007). Zinc in plants. *New Phytol* 173: 677-702. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymol* 52:302-310. doi: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- Carvalho MTV, Amaral DC, Guilherme LR, Aarts MG (2013) *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. *Front Plant Sci* 4:180. doi: 10.3389/fpls.2013.00180
- Chinmayee MD, Stephan P, Anu MS, Sheeba AM, Mini I, Swapna TS (2013) Cadmium stress on antioxidant activity of two *Alternanthera* sp. *J Sci Ind Res* 72:558.
- Dresler S, Hanaka A, Bednarek W, Maksymiec W (2014) Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants

treated with cadmium and copper. *Acta Physiol Plant* 36:1565-1575. doi: 10.1007/s11738-014-1532-x

Ehsan M, Viveros FL, Hernández VE, Barakat MA, Ortega AR, Maza AV, Monter JV (2015) Zinc and cadmium accumulation by *Lupinus uncinatus* Schldl. grown in nutrient solution. *Int J Environ Sci Te* 12:307-316. doi: 10.1007/s13762-013-0456-0

Enstone DE, Peterson CA (2005) Suberin lamella development in maize seedling roots grown in aerated and stagnant conditions. *Plant Cell Environ* 28:444-455. doi: 10.1111/j.1365-3040.2005.01286.x

Enstone DE, Peterson CA, Ma F (2002) Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J Plant Growth Regul* 21:335-351. doi:10.1007/s00344-003-0002-2

Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cienc Agrotec* 35:1039-1042. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001

Filipič M, Hei TK (2004) Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. *Mutat Res-Fund Mol M*, 546(1), 81-91.

Giampaoli P, Tresmondi F, Lima GPP, Kanashiro S, Alves ES, Domingos E, Tavares AR (2012) Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown *in vitro*. *Biol Plant* 56:83-88.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases. *Plant Physiol* 59:309-314. doi:10.1104/pp.59.2.309

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48:909-930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016

Gomes MP, Sa TCLL, Marques M, Martins GA, Carneiro MMLC, Soares AM (2012) Cd-tolerance markers of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen plants: anatomical and physiological features. *Braz J Plant Physiol* 24:293-304. doi:10.1590/S1677-04202012000400008

Gonçalves JF, Antes FG, Maldaner J, Pereira LB, Tabaldi LA et al. (2009) Cadmium and mineral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiol Bioch* 47:814-821. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.04.002

Guimarães MDA, Santana TA, Silva EV, Zenzen IL, Loureiro ME (2008) Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *R Tróp Ci Agr Biol* 2:58-68.

- Irfan M, Hayat S, Hayat Q, Afroz S, Ahmad A (2010) Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma*, 241:3-17. doi: 10.1007/s00709-009-0098-8
- Johansen D A (1940) Plant microtechnique. 2nd ed, New York, p 523
- Kabata-Pendias A (2010) Trace elements in soils and plants, 4th edn. CRC Press, London, p 520
- Khan I, Ahmad A, Iqbal M (2009) Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72:626-634. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.11.016
- Khatun S, Ali MB, Hahn EJ, Paek KY (2008) Copper toxicity in *Withania somnifera*: growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environ Exp Bot* 64:279–285. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.02.004
- Kraus JE, Arduin M (1997) Manual Básico em Métodos em Morfologia Vegetal. EDUR, Seropédica.
- Kummerová M, Zezulka Š, Kráľová K, Masarovičová E (2010) Effect of zinc and cadmium on physiological and production characteristics in *Matricaria recutita*. *Biol Plantarum* 54:308-314. doi: 10.1007/s10535-010-0053-8
- Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, Trtilek M, Šetlík I (2007) Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175:655-674. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x
- Líška D, Martinka M, Kohanová J, Lux A (2016) Asymmetrical development of root endodermis and exodermis in reaction to abiotic stresses. *Ann Bot* mcw047. doi: 10.1093/aob/mcw047
- Lopes G, Costa ETS, Penido ES, Sparks DL, Guilherme LRG (2015) Binding intensity and metal partitioning in soils affected by mining and smelting activities in Minas Gerais, Brazil. *Environ Sci Pollut R* 22:13442-13452. doi: 10.1007/s11356-015-4613-5
- Lux A, Martinka M, Vaculík M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J Exp Bot* 62:21–37. doi:10.1093/jxb/erq281
- Ma JF, Ueno D, Zhao FJ, McGrath SP (2005) Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220:731-736. doi: 10.1007/s00425-004-1392-5
- Manquían-Cerda K, Escudey M, Zúñiga G, Arancibia-Miranda N, Molina M, Cruces E (2016) Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant

enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown *in vitro*. *Ecotoxicol Environ Saf* 133:316-326. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.07.029

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. San Diego: Academic Press.

Martinka M, Lux A (2004) Response of roots of three populations of *Silene dioica* to cadmium treatment. *Biologia* 59:185-189.

Martins JPR, Martins AD, Pires MF, Junior RAB, Reis RO, Dias GDMG, Pasqual M (2016) Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. *Plant Cell Tiss Organ Cult (PCTOC)* 1-15. doi: 10.1007/s11240-016-0975-8

Monteiro MS, Santos C, Soares AMVM, Mann RM (2009) Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotox Environ Safe* 72:811-818. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.08.002

Moreira HJDC, Bragança HBN (2011) Manual de identificação de plantas infestantes. São Paulo: FMC Agricultural.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

Myśliwa- Kurdziel B, Prasad MNV, Strzalka K (2004) Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: *Heavy Metal Stress in Plants*. Springer Berlin Heidelberg pp 146-181

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368-373. doi: 10.1007/BF01248568

Papoyan A, Piñeros M, Kochian LV (2007) Plant Cd²⁺ and Zn²⁺ status effects on root and shoot heavy metal accumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175:51-58. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02073.x

Pereira MP, Rodrigues LCA, Corrêa FF, Castro EM, Ribeiro VE, Pereira FJ (2016). Cadmium tolerance in *Schinus molle* trees is modulated by enhanced leaf anatomy and photosynthesis. *Trees* 30:807-814. doi: 10.1007/s00468-015-1322-0

Pietrini F, Iannelli MA, Pasqualini S, Massacci A (2003) Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of

Phragmites australis (Cav.) Trin. ex Steudel. Plant physiol 133:829-837. doi: 10.1104/pp.103.026518

Pietrini F, Zacchini M, Iori V, Pietrosanti L, Ferretti M, Massacci A (2010) Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. Plant Biol 12:355-363. doi: 10.1111/j.1438-8677.2009.00258.x

Rajendrudu G, Prasad JS, Das VR (1986) C₃-C₄ intermediate species in *Alternanthera* (Amaranthaceae): leaf anatomy, CO₂ compensation point, net CO₂ exchange and activities of photosynthetic enzymes. Plant Physiol 80:409-414. doi: 10.1104/pp.80.2.409

Redjala T, Sterckeman T, Morel JL (2009) Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high-and low-affinity membrane transport systems. Env Exp Bot 67:235-242.

Rezvani M, Zaefarian F (2011) Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in '*Aeluropus littoralis*'. AJAE 2:114.

Rogers NJ, Franklin NM, Apte SC, Batley GE (2007) The importance of physical and chemical characterization in nanoparticle toxicity studies. Integr Environ Assess Manag 3:303-304. doi: 10.1002/ieam.5630030219

Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, Del Río LA, Palma JM (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. New phytol 170:43-52. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01643.x

Sarruge JR, Haag HP (1974) Análises químicas em plantas. Piracicaba: ESALQ p 56.

Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J (1999) Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. J Exp Bot 50:1267-1280. doi: 10.1093/jxb/50.337.1267

Silva EAB, Costa CA, Vilar VJ, Botelho CM, Larosi MB, Saracho JM, Boaventura RA (2012) Water remediation using calcium phosphate derived from marine residues. Water Air Soil Pollut 223:989-1003. doi: 10.1007/s11270-011-0918-2

Silva MN, Mucha AP, Rocha AC, Gomes CR, Almeida CMR (2015) Response of two salt marsh plants to short-and long-term contamination of sediment with cadmium. J Soil Sediment 15:722-731. doi: 10.1007/s11368-014-1041-y

- Son JA, Narayanankutty DP, Roh KS (2014) Influence of exogenous application of glutathione on rubisco and rubisco activase in heavy metal-stressed tobacco plant grown *in vitro*. Saudi J Biol Sci 21:89-97. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.06.002
- Souza VL, Silva DDC, Santana KB, Mielke MS, Almeida AF, Mangabeira PAO, Rocha EA (2009) Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. Acta Bot Bras 23:343-354.
- Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-Bukhari I, Sherwood RP (1985) The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiol Plant, 63:293-298. doi: 10.1111/j.1399-3054.1985.tb04268.x
- Stoláriková-Vaculíková M, Romeo S, Minnocci A, Luxová M, Vaculík M, Lux A, Sebastiani L (2015) Anatomical, biochemical and morphological responses of poplar *Populus deltoides* clone Lux to Zn excess. Env Exp Bot 109:235-243. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.07.001
- Vaculík M, Lux A, Luxová M, Tanimoto E, Lichtscheidl I (2009) Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. Env Exp Bot 67:52-58. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.06.012
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Sci 151:59-66. doi: 10.1016/S0168-9452(99)00197-1
- Willekens H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. Mol Breeding, 1:207-228. doi: 10.1007/BF02277422
- Xie WY, Huang Q, Li G, Rensing C, Zhu YG (2013) Cadmium accumulation in the rootless macrophyte *Wolffia globosa* and its potential for phytoremediation. Int J Phytoremediat 15:385-397. doi: 10.1080/15226514.2012.702809
- Zadeh BM, Savaghebi-Firozabadi GR, AliKhani HA, Hosseini HM (2008) Effect of sunflower and *Amaranthus* culture and application of inoculants on phytoremediation of the soils contaminated with cadmium. American-Eurasian J Agric Environ Sci 4:93-103.
- Zelko I, Lux A (2004) Effect of cadmium on *Karwinskia humboldtiana* roots. Biologia 59:205-209.