

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Guilherme José Gonçalves Pereira

“ANÁLISE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM RESPOSTA A ESTRESSE
POR Cd E ESTUDO DE FILOGENIA EM PLÂNTULAS DE *CROTALARIA*”

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Campinas
2004

Campinas, 17 de maio de 2004.

Banca Examinadora

Prof . Dr. Ricardo Antunes de Azevedo (Orientador)

Assinatura

Prof. Dr. Ladaslav Sodek

Assinatura

Prof. Dr. Antonio Augusto Franco de Garcia

Assinatura

Profa. Dra. Angela Pierre Vitória

Assinatura

Prof. Dr. Cláudia Regina Baptista Haddad

Assinatura

Prof. Dr. Silvia Maria Guerra Molina

Assinatura

Profa. Dra. Laura Maria Mariscau Ottoboni

Assinatura

OFEREÇO

A Deus pela luz e proteção, a meu pai, a minha mãe, aos meus filhos, minha família
pelo apoio irrestrito, amor e compreensão dedicados

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido o alcance de mais esse ideal.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pela orientação, incentivo, oportunidade e acima de tudo a pessoa amiga;

Ao Prof. Dr. Ladaslav Sodek, Prof. Dr. Antônio Augusto Fanco de Garcia, Prof. Dra. Angela Pierre Vitória, Prof. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad, Prof. Dra. Silvia Maria Guerra Molina, ao Prof Dr. Victor Alexandre Vitorello, Prof. Dra Laura Maria Mariscal Ottoboni, Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pela colaboração e enriquecedoras discussões generosamente concedidas;

Aos amigos do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas Vanderlei, Carmezini, Renato, Fabrício, Alejandro, Rui, Georgia, Priscila, Bertha, Ariane, Patrícia, Ricardo e Salete pela sempre amigável convivência;

Aos amigos Leandro e Liliane por compartilharem conhecimentos, amizade incondicional, e espaço de trabalho;

A todos os professores e funcionários deste programa;

Aos amigos do curso de pós-graduação;

À UNICANP e ESALQ/USP por todo o apoio ao trabalho;

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo

Aqueles que direta ou indiretamente participaram de todo esse processo

ÍNDICE

Banca examinadora.	iii
Lista de Figuras	vii
Abreviaturas.....	viii
Resumo..	x
Abstract.....	xi
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1 O gênero <i>Crotalaria</i> e sua importância	1
1.2 Os metais pesados e o estresse oxidativo	2
1.2.1 Superóxido Dismutase	3
1.2.2. Catalase	4
1.2.3 Glutathione Redutase.....	5
1.3 Justificativa para o estudo do estresse induzido pelos metais.....	5
1.4 Os sistemas isoenzimáticos no estudo de filogenia.....	6
2. OBJETIVOS	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
3.1 ARTIGO 1	8
3.2 ARTIGO 2	19
4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DO ARTIGO I

Figura 1. Comprimento de folhas e raízes de plântulas de *C. juncea* crescidas em solução nutritiva com CdCl_2

Figura 2. Acumulação de Cd em folhas e raízes de plântulas de *C. juncea*

Figura 3. Atividade da CAT em espectrofotômetro para folhas e raízes de plântulas de *C. juncea*

Figura 4. Atividade da CAT em PAGE para folhas e raízes de plântulas de *C. juncea*

Figura 5. Atividade da SOD em PAGE para folhas e raízes de plântulas de *C. juncea*

Figura 6. Atividade de isoenzimas da SOD em PAGE revelada com inibidores KCN e H_2O_2

Figura 7. Atividade da GR em espectrofotômetro para folhas e raízes de plântulas de *C. juncea*

FIGURAS DO ARTIGO II

Figura 1. Atividade da SOD em folhas de 10 espécies de *Crotalaria*

Figura 2. Isoenzimas da SOD em folhas de *C. grantiana*

Figura 3. Isoenzimas da SOD em folhas de *C. paulina*

Figura 4. Dendograma de 10 espécies de *Crotalaria* em relação a 7 sistemas enzimáticos

ABREVIATURAS

γ -Glu-Cys = gamaglutamilcisteína

$^1\text{O}_2$ = oxigênio “singlet”

AA = ascorbato

BSA = soro albumina bovina

Cu/Zn-SOD = cobre/zinco superóxido dismutase

DTNB = 5,5’ – ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)

DTT = ditioneitol

EOs = espécies reativas de oxigênio

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

Fe-SOD = ferro superóxido dismutase

GSH = glutathione reduzida

GSSG = glutathione oxidada

KCN = cianeto de potássio

Mn-SOD = manganês superóxido dismutase

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT = nitroblue tetrazolium

$\text{O}_2^{\bullet-}$ = radical superóxido

$\text{OH}^{\bullet}$ = radical hidroxila

PA = persulfato de amônio

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

PCs = fitoquelatinas

PVPP = polivinil polipirrolidona

SH = grupo sulfidril

TEMED = N,N,N',N' – tetrametilenodiamina

TRIS = tris (hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Plântulas de crotalaria crescidas em meio hidropônico por uma semana foram submetidas a concentrações de 0 mM, 0.2 mM e 2.0 mM de CdCl₂. Foram analisados parâmetros de crescimento e atividade de enzimas antioxidantes. Foi verificado, tanto na parte aérea quanto nas raízes uma diminuição no crescimento comparado com o controle, em função do aumento do tempo de exposição ao CdCl₂. Foram analisadas as atividades da catalase (CAT) e glutathione redutase (GR), para as quais foi observado uma tendência semelhante de aumento na atividade principalmente na parte aérea. Uma terceira enzima, a superóxido dismutase (SOD) a qual catalisa a dismutação do O₂^{•-} à H₂O₂, também foi analisada na presença do CdCl₂, mas ao contrário do ocorrido com CAT e GR nenhuma alteração expressiva foi observada. Neste estudo diversas espécies de crotalaria também foram analisadas para variabilidade de isoenzimas de SOD na ausência do metal. Foi observada uma grande variação nas classes e número de isoformas. As isoenzimas mais frequentes entre as espécies foram a Mn-SOD e a Cu/Zn-SOD, mas apenas uma Fe-SOD foi identificada. Além disso, a análise dos coeficientes de similaridade para diversos outros sistemas isoenzimáticos, mostrou uma variação de 49 a 78%, tendo sido observado principalmente a formação de dois grandes grupos. Os resultados obtidos, indicaram que as espécies de crotalaria apresentam um bom potencial para estudos futuros envolvendo variabilidade genética para características agronômicas e também em estudos relacionados ao estresse oxidativo.

ABSTRACT

Seedlings of crotalaria were grown in a hydroponic medium for a week period in the presence of 0 mM, 0.2 mM and 2.0 mM of CdCl₂. Shoots and roots exposed to CdCl₂ treatment exhibited growth inhibition with a more pronounced effect with increase in CdCl₂ concentration and time of exposure. The enzymes catalase (CAT) and Glutathione reductase (GR) were analysed and showed a similar behaviour, with an increased activity mainly in the shoots. A third enzyme, superoxide dismutase (SOD) which catalyses the O₂^{•-} dismutation to H₂O₂, was also analysed in CdCl₂ treated seedlings and any expressive changes were observed. Furthermore, in this study several distinct crotalaria species were also analysed for SOD isoenzyme variability and large variation in isoenzymes types and number was observed. The more frequent isozymes observed among species were Mn-SOD and Cu/Zn-SOD, but only one Fe-SOD was identified. In addition, analysing the similarity coefficients for several other enzymes systems, coefficients ranging from 49% to 78% were observed. The results obtained indicated that crotalaria species have a good potential for further studies involving genetic variability for agronomic traits and also in studies related to oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Crotalaria* e sua importância

A tribo Crotalarieae, centrada no Sul da África, atualmente é representada por 11 gêneros, alguns dos quais irradiaram-se para a região do Mediterrâneo e Índia, Austrália ou América do Sul (Filliettaz, 2002).

O gênero *Crotalaria* é um dos maiores dentro da família Leguminosae, com cerca de 600 espécies distribuídas pelos trópicos e subtropicais é o único representante da tribo na América do Sul. O gênero está dividido em oito seções botânicas de acordo com características morfológicas, especialmente da flor. Algumas espécies de *Crotalaria* são de importância agrícola, sendo as mais importantes *C. juncea*, *C. paulina*, *C. stipularia* e *C. spectabilis*, respectivamente, as quais são usadas principalmente na adubação verde, produção de papel fino e corda (Mondin, 2003).

Muitas espécies são altamente tóxicas, contendo alcalóides pirrolisidínicos causadores de hemorragias internas e lesões hepáticas (Gentchujnicov, 1976), mas de acordo com vários autores, sua toxicidade apresenta-se apenas quando se encontra em fase de frutificação, podendo ser usada como forrageira durante a fase vegetativa (Giurnos, 1985).

As espécies deste gênero possuem uma grande capacidade de colonização de áreas perturbadas, ocorrendo em vários tipos de ambientes. Consideradas invasoras, pois são plantas cujas populações são capazes de se introduzir em habitats cultivados ou ocupados pelo homem, desvalorizando ou substituindo potencialmente as populações residentes, que são plantas cultivadas ou de interesse ecológico (Navais, 1991).

1.2 Os metais pesados e o estresse oxidativo

A poluição ambiental por metais pesados é um dos problemas mais sérios encarados atualmente pela humanidade (Fernandes & Henriques, 1991). Fertilizações com lodo de esgoto e adubos fosfatados, efluxos das indústrias e minérios, encontram-se entre as principais causas de poluição por metais pesados (Galli *et al.*, 1996). A entrada destes na cadeia alimentar de animais e do homem tem início principalmente através de sua bioacumulação nas plantas (Cieslinski *et al.*, 1996).

De uma forma genérica, os níveis excessivamente altos de metais pesados diminuem o crescimento das plantas induzindo uma gama de alterações metabólicas (Chongpraditnun *et al.*, 1992).

A exposição da planta à uma extensa cadeia de poluentes incluindo metais pesados, drogas e outras toxinas, e uma série de metais de transição, tais como o Cu e o Fe, produz radicais livres altamente reativos (Hendry *et al.*, 1992). Entre estes, está o radical superóxido (O_2^-), uma espécie de oxigênio ativo que é produzido pelos sistemas de transporte de elétrons na mitocôndria e cloroplastos (Ushimaru, 1995).

Estas espécies citotóxicas de oxigênio podem causar sérias alterações no metabolismo normal, através da danificação dos componentes celulares (Chaoui *et al.*, 1997). Estes radicais livres estão também relacionados com a determinação de tolerância e susceptibilidade da planta a uma série de metais pesados (Hendry *et al.*, 1992).

Para aliviar os danos causados, as plantas apresentam uma série de mecanismos de defesa, os quais incluem na síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos, como α -

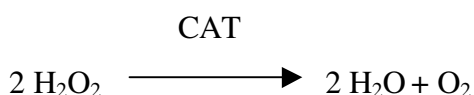
tocoferol e carotenoides e anzimáticos, como SOD, CAT e GR entre outros (Smirnoff, 1993; Prasad, 1995).

1.2.1 Superóxido dismutase

A enzima SOD (superóxido dismutase) catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 , apresentando-se na forma de isoenzimas (Bowler *et al.*, 1992 e Voet & Voet, 1995). Estas metaloenzimas multiméricas têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) ou ferro (Fe) (Scandalios, 1993). A Mn-SOD, normalmente localizada na mitocôndria, é resistente ao KCN e ao H_2O_2 , a Cu/Zn-SOD, localizada nos cloroplastos, é inativada por KCN e por H_2O_2 e a Fe-SOD, também associada aos cloroplastos, é resistente ao KCN e inativada por H_2O_2 . As Cu/Zn-SODs e algumas Mn-SODs e Fe-SODs de procariotos são diméricas, enquanto as Mn-SODs das mitocôndrias e de algumas bactérias termófilas são tetraméricas (Scandalios, 1993). As isoenzimas da SOD são ubíquas em organismos aeróbicos, anaeróbicos aerotolerantes e alguns anaeróbicos obrigatórios, protegendo-os contra os danos oxidativos através da remoção do radical $O_2^{\bullet-}$. Estas enzimas são codificadas no núcleo e então transportadas para seus locais organelares por meio de seqüências marcadas com NH_2 terminais. São as únicas enzimas cujas atividades determinam as concentrações de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss que origina os radicais $OH^{\bullet}$ e provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (Bowler *et al.*, 1992 e Alscher *et al.*, 1998).

1.2.2. Catalase

A catalase descrita em 1901 por Loew (Frugoli et al., 1996), é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Devido à sua ampla distribuição e capacidade de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, foi proposto por vários pesquisadores que a CAT desempenha um papel fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a viverem em ambientes aeróbicos (Mallick & Mohn, 2000).



A CAT é a única entre as enzimas degradantes de H_2O_2 que não consome equivalentes redutores celulares e possui um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio formado nas células sob condições de estresse (Mallick & Mohn, 2000).

Existem três tipos distintos de isoenzimas de CAT identificadas (CAT1, CAT2, CAT3) (Scandalios, 1993). Em plantas a CAT1 é responsável por 80% da atividade total desta enzima e está localizada no interior dos peroxissomos, sendo responsável pela transformação do H_2O_2 produzido na fotorrespiração em H_2O e O_2 (Willekens et al., 1997). A CAT2 é encontrada nos tecidos vasculares. A CAT3 está localizada no mesófilo das folhas (Scandalios, 1990). Em plantas, as CATs concentram-se no citoplasma, principalmente nos peroxissomos de folhas e glioxissomos de tecidos que armazenam lipídeos, com exceção da CAT3 de milho e da CAT de algumas algas verdes que são mitocondriais, embora esta última ainda não tenha papel fisiológico totalmente compreendido (Skadsen et al., 1995; Frugoli et al., 1996; Iwamoto et al., 1998).

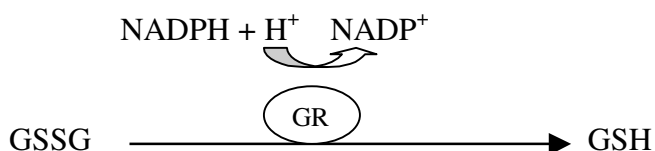
Várias condições ambientais podem alterar a atividade da CAT, por exemplo, em um procarioto simbiote fotossintético, *Prochloron* sp., a atividade da CAT foi diretamente proporcional à irradiação com ultravioleta (Lesser & Stochaj, 1990). Por outro lado, a

mudança na temperatura afetou da mesma forma a atividade da catalase em cianobactéria *Synechocystis* (Rady et al., 1994).

1.2.3 Glutationa redutase

A glutathiona reduzida (GSH), é um importante metabólito no combate às EAOs (especificamente $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2) via o ciclo Halliwell-Asada. Para a regeneração de GSH, a partir da sua forma oxidada (GSSG), a enzima chave é a Glutationa Redutase (GR) (Lee et al., 1998; Lea et al., 1998).

A enzima GR (NADPH: glutathiona oxidada) é de ocorrência quase universal, sendo amplamente distribuída entre procariotos e eucariotos, desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até plantas e animais superiores (Creissen et al., 1994). Em folhas de ervilh, a GR encontra-se presente no cloroplasto, mitocôndrias e compartimentos celulares (Edwards et al., 1990). A GR contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da GSSG para GSH (Creissen et al., 1994; Voet & Voet, 1995), conforme a seguinte reação:



1.3 Justificativa para o estudo do estresse induzido pelos metais

Muitos estudos têm sido dedicados a avaliação da interferência dos metais pesados com um número de processos fisiológicos associados com o crescimento normal e desenvolvimento das plantas. No entanto muito pouco se conhece sobre os efeitos adversos destes metais como fatores de estresse oxidativo, e nos trabalhos existentes ainda existem controvérsias (Chaoui *et al.*, 1997).

Os mecanismos pelos quais os metais pesados são distribuídos e retidos nas plantas não estão completamente esclarecidos (Casterline JR & Barnett, 1982). Particularmente neste estudo, em função da pouca informação disponível sobre os efeitos dos metais pesados em *Crotalaria* envolvendo enzimas antioxidantes, optamos por utilizar diferentes variedades da mesma para avaliarmos as respostas fisiológicas causadas pela exposição a estes metais.

1.4 Os sistemas isoenzimáticos no estudo de filogenia

A utilização de isoenzimas como marcadores moleculares e genéticos vem sendo empregada com grande sucesso, em diversos trabalhos nos quais se estuda a diversidade de germoplasma ou mesmo de populações naturais por meio de marcadores moleculares de DNA (Freitas, 2000).

A análise de isoenzimas por eletroforese representa uma metodologia útil para determinar a diversidade genética em plantas, porque a neutralidade seletiva para locos isoenzimáticos pode ser assumida em muitos casos, e portanto elas proporcionam uma medida de relacionamento entre os cultivares que não são capazes de ser alterados significativamente por processo de seleção experimental (Resende *et al.*, 2000).

A determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores isoenzimáticos possui três vantagens em relação à determinação por marcadores morfológicos: 1) As isoenzimas têm herança codominante; 2). muitos locos isoenzimáticos são altamente polimórficos na maioria das populações; 3) as isoenzimas possivelmente não estão sujeitas a forças seletivas (Silva, 2000).

A variação de isoenzimas tem sido estudada para determinar o relacionamento genético de 269 cultivares de *Dioscorea alata* desde o Sul do Pacífico, Ásia, África e Caribe (Lebot *et al.*, 1998), para classificar cultivares Japoneses (*Colocassia esculenta* (L.) Schott) (Isshiki *et al.*, 1998) e para caracterização e diversidade genética de cultivares de capim elefante e seus híbridos com mileto (De Freitas *et al.*, 2000).

2. OBJETIVOS

Determinar as respostas induzidas pelo metal pesado em *Crotalaria sp*, principalmente focando o sistema antioxidante e utilizar os resultados para possíveis aplicações no âmbito do monitoramento ambiental como perspectiva e avaliar o potencial da mesma como bioindicadora da poluição. Além disso, baseados na literatura (Resende *et al.*, 2000) procuramos utilizar vários sistemas isoenzimáticos para determinar a filogenia entre dez espécies de *Crotalaria* e identificar possível variabilidade genética que possa ser explorada futuramente visando identificar e entender melhor os mecanismos que conferem tolerância ou susceptibilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ARTIGO 1



Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*

G.J.G. Pereira¹, S.M.G. Molina², P.J. Lea³ & R.A. Azevedo^{2,4}

¹Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas CEP 13083-970, SP, Brasil; ²Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba CEP 13400-970, SP, Brasil; ³Department of Biological Sciences, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK; ⁴Corresponding author*

Received 23 May 2001. Accepted in revised form 13 November 2001

Key words: cadmium, catalase, *Crotalaria juncea*, glutathione reductase, heavy metals, superoxide dismutase

Abstract

The effects of the heavy metal Cadmium (Cd) on the growth and the activities of the antioxidant enzymes, catalase (CAT, EC 1.11.1.6), superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) have been investigated in *Crotalaria juncea* seedlings. Concentrations above 0.2 mM CdCl₂ were shown to inhibit strongly the growth of roots and shoots. Cd was shown to accumulate to very high concentrations in the roots, whilst in the leaves, the maximum concentration obtained following treatment with 2 mM CdCl₂, was only 6% of that determined in the roots. Although CAT activity did not exhibit any major variation in the roots following CdCl₂ treatment, 2 mM CdCl₂ induced a 6-fold increase in activity in the leaves when compared to the untreated control. Non-denaturing PAGE gels stained for SOD activity revealed four isoenzymes, two Mn-SOD and two Cu/Zn-SOD. The results observed for SOD were different of those observed for CAT activity, since in both, leaves and roots, no significant changes in the total activity or of the four isoenzymes were observed following the treatment with CdCl₂. GR activity exhibited a similar pattern of that of CAT activity. The concentration of 2 mM CdCl₂ induced a small increase in activity in the roots after 48 h of exposure, whereas in leaves a 7-fold increase in GR activity was detected after 48 hr exposure to 2 mM CdCl₂. The results suggest that in *C. juncea* the reactive oxygen species (ROS) induced by Cd, are metabolised by CAT in the peroxisomes. In the case of GR activity, the increase observed in the leaves suggest that GR is also playing a role in the detoxification of Cd-induced ROS possibly via the glutathione-ascorbate cycle.

Abbreviations: Cd – cadmium; CAT – catalase; GR – glutathione reductase; ROS – reactive oxygen species; SOD – superoxide dismutase

Introduction

The heavy metal cadmium (Cd) is not an essential nutrient for plants and it is normally toxic, with the clear exception of certain hyperaccumulator plant species (Schickler and Caspi, 1999). Cd can accumulate in the top soil in areas of agricultural land which have been subjected to sewage sludge application (Lombi et al., 2000) and the concentrations can be very high (100–6000 mg Kg⁻¹ dry weight) in areas subjected

to mining (Lombi et al., 2000). Within the cell system, the concentration of Cd can be decreased, thus avoiding direct damage to the plant tissue by a group of peptides termed phytochelatins, which may bind Cd and other heavy metals (Bruns et al., 2001; Grill et al., 1987). Phytochelatins are structurally related to glutathione and the sulphur atom of cysteine is able to bind Cd (Harada et al., 2001; Höfgen et al., 2001). In general, plant growth and the net photosynthetic rate in the presence of Cd have been shown to be significantly reduced, even at low concentrations of the metal (Boussama et al., 1999a; Khudsar et al., 2001),

* FAX No: 19-3433-6706.

E-mail: mazeved@carpa.ciagn.usp.br

whereas leaf senescence is accelerated (Siedlecka and Krupa, 1999). Moreover, Cd can also inhibit the activity of several groups of enzymes such as those of the photosynthetic Calvin cycle (Stevens et al., 1997), nitrogen metabolism (Boussama et al., 1999a,b; Kumar and Dubey, 1999), sugar metabolism (Verma and Dubey, 2001), and sulphate assimilation (Lee and Leustek, 1999). The concentrations of betaine, putrescine and spermine have been shown to be differently affected by growth of plants in high concentrations of Cd and other heavy metals, suggesting a protection against metal-induced oxidative stress by polyamines (Bergmann et al., 2001; Groppa et al., 2001). Cd has also been shown to induce lipid peroxidation and chlorophyll breakdown in plants (Somashekaraiah et al., 1992), indicating the production of reactive oxygen species (ROS). Further evidence of ROS generation induced by Cd has been obtained through the detection of new isoenzymes of peroxidases (Tahlil et al., 1999; Van Assche and Clijsters, 1990).

ROS such as superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are produced naturally during cell metabolism in processes such as photosynthesis, photorespiration (Foyer and Noctor, 2000), fatty acid oxidation and senescence (Vitória et al., 2001). ROS can also be induced by external stresses such as exposure to gaseous pollutants, herbicides, pathogen attack (Grant and Loacke, 2000), extreme temperatures and drought (Noctor and Foyer, 1998).

Due to these large number of processes that produce ROS, plants have evolved a series of detoxification reactions, which are located in distinct cell organelles. H_2O_2 formed during photorespiration by the conversion of glycolate into glyoxylate (Kendall et al., 1983) can be decomposed into H_2O and O_2 within the peroxisome, by catalase (CAT, EC 1.11.1.6), which does not require an additional substrate (Scandalios, 1994). The scavenging of H_2O_2 in other cell compartments depends on distinct peroxidases that use a reduced substrate for activity. Plant glutathione peroxidases (EC 1.11.1.9) which can degrade H_2O_2 have also been recently reported (Mullineaux et al., 2000). Ascorbate peroxidases (EC 1.11.1.11) use ascorbate as a reducing substrate and have been shown to be localized in several cell compartments such as chloroplasts, the cytosol and microbodies (Corpas et al., 2001; De Leonardis et al., 2000; Noctor and Foyer, 1998). Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) can be located in the chloroplast, cytoplasm and mitochondria of higher plants (Stevens et al., 1997) and is

involved in the breakdown of H_2O_2 via the ascorbate-glutathione cycle (Noctor and Foyer, 1998), exhibiting changes in activity following the application of environmental stresses (Azevedo et al., 1998; Pilon-Smits et al., 2000).

The dismutation of superoxide into H_2O_2 and O_2 by superoxide dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) has been extensively studied (Bowler et al., 1992). Three classes of SOD have been observed in plants, cytosolic and chloroplastic Cu-Zn/SODs, a chloroplastic Fe/SOD and a mitochondrial Mn/SOD, of which the former two have been shown to be regulated by oxidative stress (Azevedo et al., 1998; Kliebenstein et al., 1998).

Recent reports on the responses of plant antioxidant enzymes to Cd and other metals, have indicated several distinct patterns, which varied according to the species and tissue analysed (Cardoso et al., 2002; Cuypers et al., 2000; Ferreira et al., 2002; Fomazier et al., 2002; Gallego et al., 1999; Hegedus et al., 2001; Schickler and Caspi, 1999; Vitória et al., 2001). The aim of this study was to investigate the changes in activities of the antioxidant enzymes, CAT, SOD and GR in the leaves and roots of *C. juncea*, a legume plant species used as a compost (green fertilizer), in response to increasing concentrations of Cd.

Materials and methods

Plant material

Seeds of *Crotalaria juncea* were obtained from the seed bank of the Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, Brazil.

Growth and Cd exposure

Seeds of *C. juncea* were germinated in a growth chamber under controlled environmental conditions (60–80% relative humidity, 25–27 °C temperature and a 16/8 h light/dark photoperiod at 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for 7-d. At the end of this period, seedlings of approximately the same size were selected and grown for a further 96 h period in 1.5 l pots containing Hoagland's nutrient solution to which had been added two CdCl_2 concentrations (0.2 and 2 mM), plus the untreated control. Leaf and root samples were harvested periodically during the experiment, leaf and root growth was recorded and the samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C , prior to enzyme extraction.

The experimental design was a randomized complete block with treatments arranged as individual pots, with five plants per pot, each replicated 4 times. Data were statistically analysed within each experiment and the results expressed as mean ($\pm$ S.E.) of four independent replicates for antioxidant enzymes activity measurements.

Cd accumulation

The accumulation of Cd in *C. juncea* leaves and roots was analysed as described by Vitória et al. (2001) in a inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS).

Enzyme extraction

Enzyme extractions were carried out at 4 °C. Frozen plant tissues were ground to a fine powder in liquid nitrogen in a pestle and mortar and extracted at a ratio 1:3 (w/v) fresh weight to extraction buffer (100 mM potassium phosphate buffer [pH 7.5] containing 1 mM EDTA, 3 mM DTT and 5% [w/v] insoluble PVPP). The homogenate was centrifuged at $10\,000 \times g$ for 30 min and the supernatant kept stored in separate aliquots at -80 °C to be used for CAT, GR and SOD analyses. Protein was estimated by the method of Bradford (1976), using BSA as a standard.

Enzyme assays

CAT activity was assayed spectrophotometrically at 25 °C as described by Chaparro-Giraldo et al. (2000) using an assay mixture comprising 1 ml 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 2.5 μ l H₂O₂ (30% solution) prepared immediately before use. The reaction was started by the addition of 15 μ l of plant extract and activity measured by monitoring the degradation of H₂O₂ at 240 nm over 1 min, against a plant extract-free blank.

GR activity was assayed spectrophotometrically at 30 °C as described by Barata et al. (2000) in a reaction mixture consisting of 3 ml 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 1 mM oxidized glutathione and 0.1 mM NADPH. The reaction was initiated by the addition of 50 μ l of plant extract. The rate of reduction of oxidized glutathione was followed by monitoring the increase in absorbance at 412 nm over 2 min.

CAT and SOD activity staining

Electrophoresis was carried out under native condition in 5% and 8% polyacrylamide mini-gels for CAT and SOD activity staining, respectively. Electrophoresis running conditions were as described by Vitória et al. (2001) and buffers and gels were prepared as described by Laemmli (1970) lacking SDS. Equal amounts of protein (40 μ g) were loaded on to each lane.

CAT activity was also assayed in native PAGE gels as described by Woodbury et al. (1971). Gels were incubated in 0.003% H₂O₂ for 10 min and developed in a 1% (w/v) FeCl₃ and 1% (w/v) K₃Fe(CN₆) solution for 10 min.

SOD activity was determined on native PAGE gels as described by Beauchamp and Fridovich (1971) and modified by Azevedo et al. (1998). The gels were rinsed in distilled-deionized water and incubated in the dark for 30 min at room temperature in an assay mixture containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 1 mM EDTA, 0.05 mM riboflavin, 0.1 mM nitroblue tetrazolium and 0.3% (v/v) N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED). At the end of this period, the gels were rinsed with distilled-deionized water and placed in distilled-deionized water and exposed on a light box for 5–10 min at room temperature until the development of colourless bands of SOD activity in a purple-stained gel was visible. The reaction was stopped by transferring the gels to 6% (v/v) acetic acid. Bovine SOD (Sigma Chemical Co.) was used as a positive control of SOD activity in all gels. SOD isoenzymes were visualized and classified as described previously by Azevedo et al. (1998) by incubating gels for 20 min in solutions containing 2 mM KCN and 5 mM H₂O₂, separately and then incubating in the SOD reaction mixture as above. The pre-treatment of the gels in H₂O₂ and KCN before SOD staining allowed the classification of the SOD into Cu/Zn-SOD, Fe-SOD or Mn-SOD isoenzymes. Mn-SOD is resistant to both inhibitors, the Fe-SOD isoenzymes is resistant to KCN and inhibited by H₂O₂, and Cu/Zn-SOD is inhibited by both inhibitors. The concentration of protein loaded onto the gel was increased to 150 μ g in order to identify any minor SOD isoenzymes.

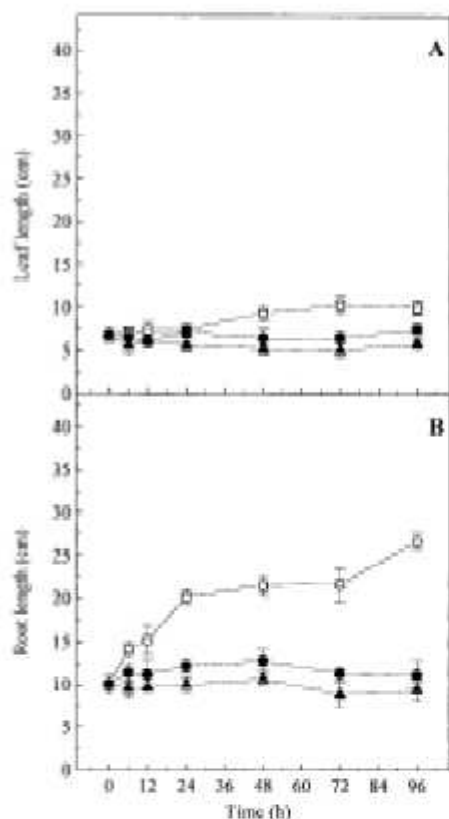


Figure 1. Length of shoot (A) and root (B) of *C. juncea* seedlings grown for a 96 h period in nutrient solution containing 0 mM CdCl₂ (□), 0.2 mM CdCl₂ (●) and 2 mM CdCl₂ (▲).

Results

Growth of *C. juncea* seedlings in CdCl₂

Preliminary experiments with several different concentrations of CdCl₂ (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 2 mM) were carried out to determine the doses of CdCl₂ which cause inhibition of growth (data not shown). Based on these early tests, further experiments were carried out for periods up to 96 h using two concentrations (0.2 and 2 mM) of CdCl₂. Root and shoot length were measured at 12 h intervals. It was observed that both concentrations strongly inhibited the growth of the seedlings during the period of the experiments (Figure 1).

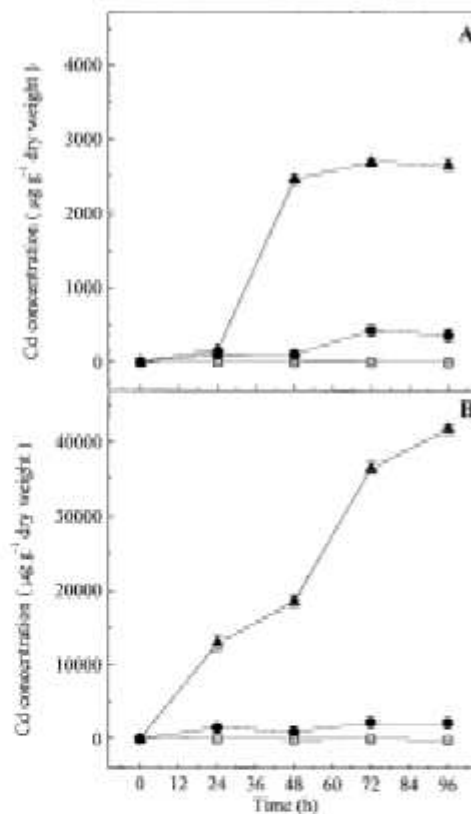


Figure 2. Cd accumulation in *C. juncea* seedlings. Cd concentrations were determined in the leaves (A) and roots (B) of plants grown over a 96 h period. Control 0 mM CdCl₂ (□), 0.2 mM CdCl₂ (●) and 2 mM CdCl₂ (▲).

Cd accumulation in roots and leaves

The Cd concentration in the roots and leaves was determined for the *C. juncea* grown in the presence of 0.2 and 2 mM CdCl₂ for 96 h (Figure 2). In the roots, there was a massive, approximately linear increase in the concentration of the Cd detected, over the four time points for the 2 mM CdCl₂ treatment, but the concentration following the 0.2 mM treatment, did not increase correspondingly during the 96 h period. In the leaves, an increase in the concentration of Cd was not definitely detectable in the 2 mM CdCl₂ treatment until 48 hr after the commencement of the experiment, and after 72 h the concentration values remained constant.

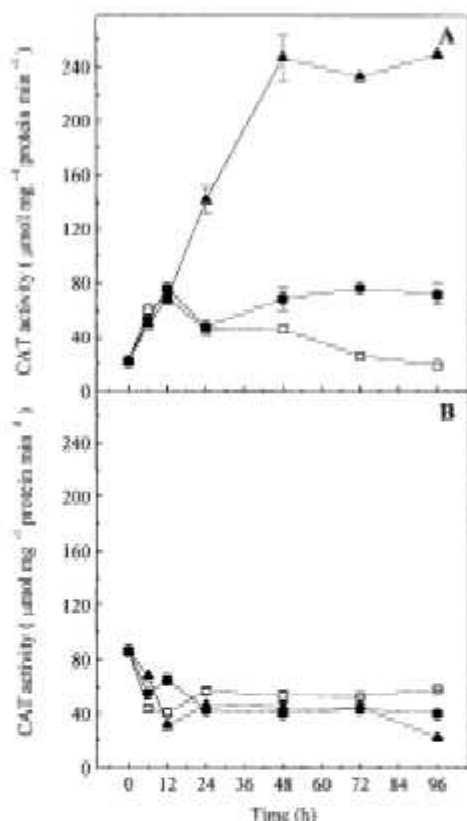


Figure 3. The specific activity of CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) in the leaves (A) and roots (B) of *C. juncea* seedlings grown for a 96 h period in two concentrations of CdCl_2 . Control zero ($\square$), 0.2 mM ($\bullet$) and 2 mM ($\blacktriangle$).

CAT activity

Changes in CAT activity after exposure to 0.2 and 2 mM CdCl_2 were determined for up to 96 h. CAT activity in the leaves of control and 0.2 mM CdCl_2 treated plants exhibited a similar pattern up to 48 h of treatment, when there was a small increase in activity at 0.2 mM CdCl_2 after that time (Figure 3A). On the other hand, 2 mM CdCl_2 induced a 6-fold increase in activity when compared to the control after 48 h of treatment, which remained relatively constant after that time (Figure 3A). CAT activity in roots did not exhibit any major variation following treatment with CdCl_2 , during the time of the experiment (Figure 3B).

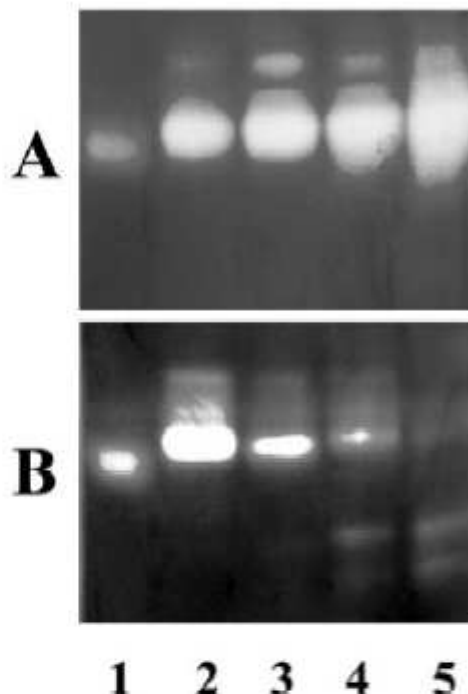


Figure 4. Activity staining following PAGE for CAT of extracts of *C. juncea* leaves (A) and roots (B) grown for increasing times in 2 mM CdCl_2 . Lane 1, CAT activity standard from bovine liver; lane 2, control 0 h; lane 3, 24 h; lane 4, 48 h; lane 5, 72 h. 40 μg of protein from leaves and roots was loaded onto each gel lane.

These results were partially confirmed by assaying leaf and root samples exposed to 2 mM CdCl_2 for CAT activity, following non-denaturing PAGE. Three bands of CAT activity were observed in untreated leaves and roots (Figure 4). In leaves, a clear increase in total CAT activity was verified following treatment with 2 mM CdCl_2 (Figure 4A). Although one major and two minor bands of CAT activity were present following staining of leaf extracts, all three isoenzymic bands seemed to increase following CdCl_2 treatment. In roots, there was a dramatic decrease in the intensity of the main CAT band (Figure 4B). However, after 24 h of treatment (Figure 4B, lane 3), this reduction of CAT activity was concurrent with the appearance of at least two new bands of CAT activity in roots exposed to CdCl_2 (Figure 4B), which had a greater electrophoretic mobility.

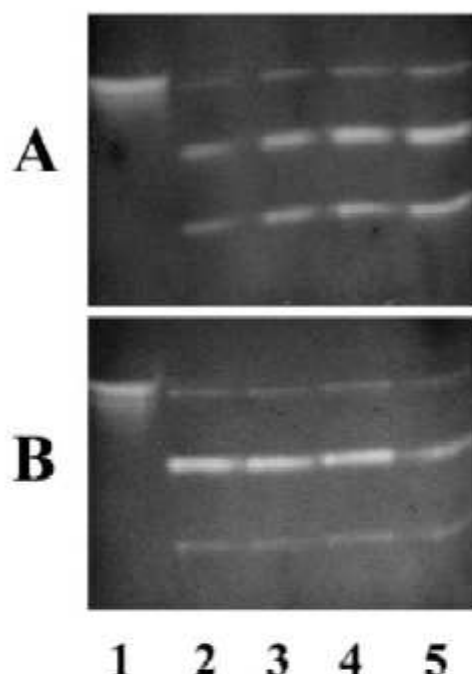


Figure 5. Activity staining following PAGE for SOD of extracts of *C. juncea* leaves (A) and roots (B) grown for increasing times in 2 mM CdCl₂. Lane 1, SOD activity standard from bovine liver; lane 2, control 0 h; lane 3, 24 h; lane 4, 48 h; lane 5, 72 h. Forty μ g of protein from leaves and roots was loaded onto each gel lane.

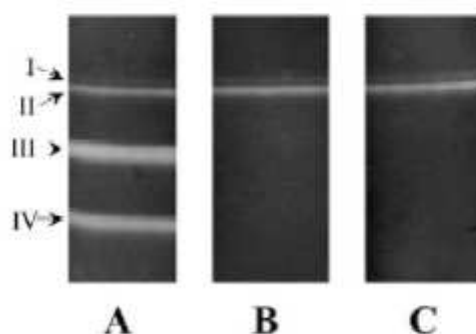


Figure 6. Extracts of *C. juncea* leaves containing 150 μ g of protein were loaded onto a non-denaturing gel and stained for individual SOD isoenzymes. (A) control SOD activity staining, (B) plus 2 mM KCN and (C) plus 5 mM H₂O₂. Isoenzymes I and II were classified as Mn-SOD, whereas the isoenzymes II and IV were classified as Cu/Zn-SOD.

SOD activity

The plant extracts (leaf and roots samples exposed to 2 mM CdCl₂) used for CAT activity staining were also used for detection of SOD following PAGE. Three clear SOD isoenzymes were observed in the control and following CdCl₂ treatments (Figure 5). The results obtained were different from those observed for CAT activity (Figures 3 and 4), since in both tissues, leaves and roots, no significant changes in the activity of the three SOD isoenzymes, were observed during the treatment with CdCl₂ (Figure 5). Furthermore, the appearance of new SOD isoenzymes was not observed (Figure 5). In a separate gel, 150 μ g protein was loaded in order to classify the SOD isoenzymes. One extra minor SOD band was visualized under these conditions (Figure 6). The four SOD isoenzymes identified were classified according to the inhibition patterns to hydrogen peroxide and KCN (Figure 6). SOD isoenzyme I and II, the least electronegative bands, were classified as Mn-SOD (resistant to both inhibitors), whereas the SOD isoenzymes III and IV were classified as Cu/Zn-SOD (inactivated by both inhibitors) (Figure 6). Fe-SOD isoenzymes were not observed in the leaves or roots of *C. juncea*. A soybean leaf SOD extract was used as a control for the classification of the isoenzymes (data not shown).

GR activity

The activity of GR was also determined in the leaves and roots of *C. juncea* plants treated with CdCl₂. A very similar result of that for CAT activity (Figure 3) was observed for GR activity (Figure 7). In the leaves a 7-fold increase of GR activity was detected after 48 h exposure to 2 mM CdCl₂, which increased further until the end of the experiment, whereas only a slight increase in GR activity was observed in the 0.2 mM CdCl₂ treatment after 48 h of exposure and onwards (Figure 7A). However, in roots, only the concentration of 2 mM CdCl₂ induced a small increase in GR activity after 48 h of exposure (Figure 7B).

Discussion

Several mechanisms are utilised by plants to detoxify ROS. It is clearly important to establish whether the exposure of plants to Cd causes a detrimental or stimulatory effect on the enzymes involved in this detoxification process.

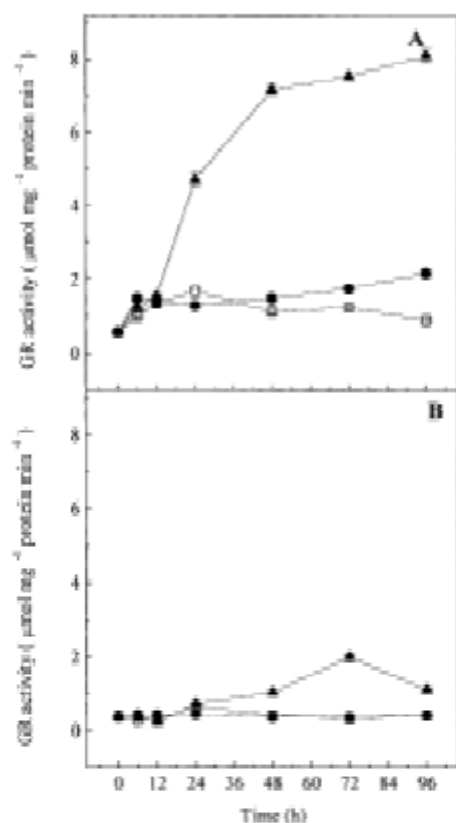


Figure 7. The specific activity of GR ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) in the leaves (A) and roots (B) of *C. juncea* seedlings grown for a 96 h period in two concentrations of CdCl_2 . Control zero ($\square$), 0.2 mM ($\bullet$) and 2 mM ($\blacktriangle$).

By increasing the concentration of CdCl_2 in the nutrient solution, the growth of *C. juncea* seedlings was inhibited significantly during the experiment. The concentration of CdCl_2 used (0.2 and 2 mM) were higher than that normally observed in polluted soils. However, even at such high concentrations as these, distinct differences have been observed among the plants analysed so far, in their tolerance of Cd. For instance, only a slight inhibition of growth of sugarcane plants was observed at concentrations above 1 mM and after 15-day of CdCl_2 exposure (Fomazier et al., 2002). When 5 mM CdCl_2 was used, growth was completely inhibited after 96 h of treatment (Fornazier et al., 2002). In radish seedlings, concentrations below 0.25 mM

CdCl_2 had little effect on growth (Willekens et al., 1994). Several reports have used concentrations of Cd up to 1 mM, when studying effects on plants (Bhattacharjee, 1998; Chugh and Sawhney, 1999; Di Toppi et al., 1999; Kubota et al., 2000; Leita et al., 1991; Stroinski et al., 1999).

Cd accumulated to high concentrations in the roots of *C. juncea*, and was readily detectable after the first 24 h and increased rapidly thereafter in the 2 mM CdCl_2 treatment. Some Cd was also shown to be translocated to the leaves as previously observed for a number of plant species (Fargasova et al., 2001; Hegedus et al., 2001; Rauser, 2000; Vitória et al., 2001). Interestingly in the leaves, the Cd was not detectable until 48 h after exposure to CdCl_2 and then the concentration reached a plateau after 72 h.

There have been previous studies that have examined the effect of Cd on CAT activity in higher plants, some of them reporting a decrease in activity, although some variation during the time of treatment was recorded (Vitória et al., 2001). In sugarcane, for up to 72 h of CdCl_2 treatment, there was evidence of a considerable inhibitory effect on CAT activity (Fornazier et al., 2002), but after 84 h and 96 h, there was evidence of a recovery of enzyme activity in all the CdCl_2 treatments. In soybean, although a clear inhibitory effect of Cd on plant growth was observed, the activity of CAT was not altered significantly in the roots or leaves at all concentrations tested (Ferreira et al., 2002). However, recent reports have shown an increase in CAT activity, in response to Cd treatment. Brej (1998), positively demonstrated a significant increase in CAT activity in the roots and leaves of some populations of *Agrropyron repens* growing in highly contaminated soils. Similar results demonstrating an increase in CAT activity have now been obtained in radish (Vitória et al., 2001), in both the leaves and roots after only 24 h exposure to the metal, also indicating a direct correlation with Cd accumulation. It can be clearly seen in Figure 3, that there was a large increase in CAT activity induced by 2 mM CdCl_2 in the leaves, but not in roots. Staining for CAT activity, following native PAGE confirmed the results obtained by the spectrophotometer assay, albeit new CAT bands appeared in the CdCl_2 treatments in the roots. CAT isoenzymes have been studied in higher plants, and normally there are three genes encoding the isoenzymes. In *Nicotiana plumbaginifolia*, the transcription of two of the three genes was stimulated by ozone (Willekens et al., 1994), whereas the transcription of all three genes in maize has been shown to

be increased by the addition of hydrogen peroxide, although the time course of the response varied between the genes (Polidoros and Scandalios, 1999).

The major function of CAT activity in leaves is to metabolise the peroxide liberated in the peroxisome during photorespiration and the activity of the enzyme is greatly reduced when plants are grown in elevated atmospheres of CO₂ (Azevedo et al., 1998). The increase in CAT activity in the leaves of *C. juncea* detected following CdCl₂ treatment supports the hypothesis that Cd is causing the formation of peroxide which is then metabolised by CAT. Although no significant changes in total CAT activity following CdCl₂ treatment were detected in the roots (Figure 3B), it is clear from Figure 4B, that there has been a large change in isoenzymic complement. The reduction in activity of the predominant band would suggest that there is an effect of CdCl₂, with the induction of new isoenzymic forms caused by the presence of ROS. However, it is not possible to speculate as to the subcellular localisation of the CAT isoenzymes.

Three major SOD isoenzyme bands were observed following the staining of native PAGE gels for enzyme activity in the leaves and roots (Figure 5), however, a extra SOD isoenzyme band was visible when larger amounts of protein were loaded onto the gel (Figure 6). The use of KCN and H₂O₂ in inhibition studies, indicated that the SOD isoenzymes I and II are Mn-SOD, while isoenzymes III and V were classified as Cu/Zn-SODs (Figure 6). Contrary to the results obtained for CAT activity, SOD activity was unaltered in leaves or roots, at both CdCl₂ concentrations and during the time that the seedlings were exposed to the metal. Previous research examining the effects of Cd on SOD activity in plants has also produced varied results as indicated for CAT activity, although the great majority have shown a decrease or no change in SOD activity (Ferreira et al., 2002; Fornazier et al., 2002). On the other hand, in pea (Dalurzo et al., 1997), *Alyssum* species (Schickler and Caspi, 1999) and radish (Vitória et al., 2001), increases in SOD activity have been observed in response to Cd exposure. In the case of radish (Vitória et al., 2001) SOD isoenzymes were identified and separated on native PAGE in an attempt to identify specific alteration in response to CdCl₂, however a general increase for all isoenzymes was observed. Different oxidative stresses have been shown previously to increase both the activity and expression of genes encoding SOD (Bowler et al., 1992; Willekens et al., 1994). The results obtained suggest that, although Cd may be generating

an oxidative stress, there is not a sufficient increase in superoxide to induce a change in SOD activity.

In a similar manner to CAT, changes in GR activity were observed in response to the Cd induced stress in *C. juncea* seedlings. Such changes were clearly more pronounced in the leaves following treatment with 2 mM CdCl₂, but less so at 0.2 mM CdCl₂ (Figure 7). Several reports have detected increases in GR activity in plants following exposure to Cd (Chaoui et al., 1997; Ferreira et al., 2002; Fornazier et al., 2002; Schickler and Caspi, 1999; Stroinski et al., 1999; Vitória et al., 2001), although the responses have often been dose dependent and variable over time. Oxidative stress has been shown to induce increases in GR activity (Stevens et al., 1997). Furthermore, it has been demonstrated that the activity of ascorbate peroxidase also increases following exposure to Cd (Chaoui et al., 1997; Shaw, 1995). Previous reports have shown that Cd accumulates mainly in the roots of plants when compared to leaves and stems (Hart et al., 1998; Rauser, 2000; Vitória et al., 2001). The slight increase in GR activity in the roots suggests that this enzyme may be responding to Cd exposure and possible accumulation of the metal in this tissue, by maintaining glutathione in the reduced form to be incorporated into phytochelatins (Cobbett, 2000). However, the significant increase in GR activity in the leaves suggest that this enzyme plays a role in the detoxification of Cd-induced-ROS possibly via the glutathione-ascorbate cycle. These results for GR activity are different from those recently reported for *Phaseolus vulgaris* (Chaoui et al., 1997), potato (Stroinski et al., 1999), radish (Vitória et al., 2001), soybean (Ferreira et al., 2002) and sugarcane (Fornazier et al., 2002) seedlings, which when exposed to CdCl₂, consistently exhibited significant increases in GR activity in the roots, although such increases were dependent upon Cd concentration and the time of exposure. The results suggest that in *C. juncea* the reactive oxygen species (ROS) induced by Cd, are metabolised by CAT in the peroxisomes. In the case of GR activity, the increase observed in the leaves suggest that GR is also playing a role in the detoxification of Cd-induced ROS possibly via the glutathione-ascorbate cycle.

Acknowledgements

This work was financed by Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) grant no. 99/06429-0 and by the British Council. R. A. A. re-

ceived a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). G. J. G. P. received a Ph.D. scholarship from FAPESP.

References

- Azevedo R A, Alas R M, Smith R J and Lea P J 1998 Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280–292.
- Barata R M, Chapparro A, Chabregas S M, Gonzalez R, Labate C A, Azevedo R A, Samth G, Lea P J and Silva-Filho M C 2000 Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: Effects on aerobic metabolism in transgenic plants. *Plant Sci.* 155, 193–202.
- Bauchamp C H and Fridovich I 1971 Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287.
- Bergmann H, Machelett B, Lippmann B and Friedrich Y 2001 Influence of heavy metals on the accumulation of trimethylglycine, putrescine and spermine in food plants. *Amino Acids* 20, 325–329.
- Bhattacharjee S 1998 Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biol. Plant.* 40, 131–135.
- Boussanna N, Ouairi O and Ghorbal M H 1999a Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *J. Plant Nutr.* 22, 731–752.
- Boussanna N, Ouairi O, Suzuki A and Ghorbal M H 1999b Cd-stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155, 310–317.
- Bowler C, Van Montagu M and Inzé D 1992 Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83–116.
- Bradford M M 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brej T 1998 Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Baur. populations from Legnica copper smelter area, Lower Silesia. *Acta Soc. Pol.* 67, 325–333.
- Bruns I, Sutter K, Menge S, Neumann D and Krauss G J 2001 Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* 158, 79–89.
- Cardoso P F, Molina S M G, Pereira G J G, Vitória A P and Azevedo R A 2002 Response of rice inbred lines to cadmium exposure. *J. Plant Nutr.* 25, 927–944.
- Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal M H and El Fetjani E 1997 Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127, 139–147.
- Chaparro-Giraldo A, Barata R M, Chabregas S M, Azevedo R A and Silva-Filho M C 2000 Soybean leghemoglobin targeted to potato chloroplasts influences growth and development of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 19, 961–965.
- Chugh L K and Sawhney S K 1999 Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Biol. Plant.* 42, 401–407.
- Cobbett C S 2000 Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825–832.
- Corpas F J, Bartoso J B and del Río L A 2001 Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.* 6, 145–150.
- Cuypers A, Vangronoveld J and Clusters H 2000 Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during early stages of metal assimilation. *Physiol. Plant.* 110, 512–517.
- Dalurzo H C, Sandalo L M, Gomez M and Del Rio L A 1997 Cadmium infiltration of detached pea leaves: Effect on its activated oxygen metabolism. *Phyton* 37, 59–64.
- De Leonandis S, Dipierro N and Dipierro S 2000 Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 773–779.
- Di Toppi L S, Lambardi M, Pecchioni N, Pazzagli L, Durante M and Gabbriellini R 1999 Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.* 154, 385–393.
- Fargascova A 2001 Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biol. Plant.* 44, 471–473.
- Ferreira R R, Fornazier R F, Vitória A P, Lea P J and Azevedo R A 2002 Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *J. Plant Nutr.* 25, 327–342.
- Fornazier R F, Ferreira R R, Vitória A P, Molina S M G, Lea P J and Azevedo R A 2002 Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biol. Plant.* 41, 91–97.
- Foyer C H and Noctor G 2000 Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146, 359–388.
- Gallego S M, Benavides M P and Tomaro M L 1999 Effect of cadmium ions on antioxidant defence system in sunflower cotyledons. *Biol. Plant.* 42, 49–55.
- Grant J J and Loake G J 2000 Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21–29.
- Groppa M D, Tomaro M L and Benavides M P 2001 Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161, 481–488.
- Hamada E, Choi Y E, Tsuchisaka A, Obata H and Saito H 2001 Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J. Plant Physiol.* 158, 655–661.
- Hart J J, Welch R M, Norvell W A, Sullivan L A and Kochian L V 1998 Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116, 1413–1420.
- Hegedus A, Erdei S and Horvath G 2001 Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 160, 1085–1093.
- Höfigen R, Kreft O, Willmitzer L and Hesse H 2001 Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* 20, 291–299.
- Kendall A C, Keys A J, Turner J C, Lea P J and Milfin B J 1983 The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 159, 505–511.
- Khudr T, Mahmooduzzafar and Iqbal M 2001 Cadmium-induced changes in leaf epidermal, photosynthetic rate and pigment concentration in *Cajanus cajan*. *Biol. Plant.* 44, 59–64.
- Kliebenstein P J, Moxde R A and Last R L 1998 Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localisation. *Plant Physiol.* 118, 637–650.
- Kubota H, Sato K, Yamada T and Maitani T 2000 Phytochelatin homologs induced in hairy roots of hotteradish. *Phytochemistry* 53, 239–245.
- Kumar R G and Dubey R S 1999 Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings: Effects of stress on enzyme activity and the protective roles of osmolytes. *J. Plant Physiol.* 155, 118–121.
- Laemmli U K 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

- Lee S M and Leustek T 1999 The effect of cadmium on sulphate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Sci.* 141, 201–207.
- Leita L, Contin M and Maggioni A 1991 Distribution of cadmium and induced Cd binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Sci.* 77, 139–147.
- Mullineaux P, Ball L, Escobar C, Karpinska B, Creissen G and Karpinski S 2000 Are diverse signalling pathways in the regulation of Arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B.* 355, 1531–1540.
- Noctor G and Foyer C H 1998 Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.
- Olson-Smits E A H, Zhu Y L, Sears T and Terry N 2000 Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: Effects on cadmium accumulation and tolerance. *Physiol. Plant.* 110, 455–460.
- Polidoros A N and Scandalios J G 1999 Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* 106, 112–120.
- Rauser W F 2000 Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two complexes. *J. Plant Physiol.* 156, 545–551.
- Scandalios J G 1994 Regulation and properties of plant catalases. In *Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, Eds C H Foyer and P M Mullineaux, pp 275–316. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Schickler H and Caspi H 1999 Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant.* 105, 39–44.
- Shaw B P 1995 Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol. Plant.* 37, 587–596.
- Siedlecka A and Krupa Z 1999 Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica* 36, 321–331.
- Somashekariah B V, Padmaja K and Prasad A R K 1992 Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) – involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* 85, 85–89.
- Stevens R G, Creissen G P and Mullineaux P M 1997 Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol. Biol.* 35, 641–654.
- Stroinski A, Kubis J and Zieleszinska M 1999 Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. *Acta Physiol. Plant.* 21, 201–207.
- Van Assche F and Clijsters H 1990 Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195–206.
- Verma S and Dubey RS 2001 Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biol. Plant.* 44, 117–123.
- Vitória A P, Lea P J and Azevedo R A 2001 Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57, 710–710.
- Willekens H, Langebartels C, Tire D, Van Montagu M, Inzé D and Van Camp W 1994 Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 10450–10454.
- Woodbury W, Spencer A K and Stahmann M A 1971 An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Anal. Biochem.* 44, 301–305.

Section editor: A.J.M. Baker

3.2 ARTIGO 2

Título: Diversidade isoenzimática em espécies de crotalaria e isolamento e classificação de isoenzimas de SOD

Número de páginas: 19

Total de figuras:3

Autor para correspondência: Ricardo A. Azevedo, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, CEP 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil. Fax: 00 55 19 433 6706; e-mail raazeved@esalq.usp.br

Diversidade isoenzimática em espécies de crotalaria e isolamento e classificação de isoenzimas de SOD

G.J.G.Pereira,¹ L.R.Pinto,² R.F.Fornazier,¹ P.J.Lea,⁴ and R.A.Azevedo^{3,5}

¹ *Departamento de Genética e Evolução, Universidade Estadual de Campinas, Campinas CEP 13083-970, SP, Brasil*

². *Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas CEP 13083-970, SP, Brasil*

³ *Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba CEP 13400-970, SP, Brasil*

⁴ *Department of Biological Sciences, Lancaster University, Lancaster LA1 4YQ, UK*

Palavras chave: Glutationa Desidrogenase Malato desidrogenase, Xiquimato desidrogenase, Enzima Málica, Peroxidase, Esterase, Fosfatase Ácida, Superoxido dismutase

Resumo

A Eletroforese enzimática foi usada como um método para determinar a diversidade genética em várias espécies de crotalaria produzidas no Instituto agrônomo do Paraná (IAPAR)-PR, Instituto Agrônomo de Campinas-SP e Piraí Sementes-SP, Brasil. Foram analisadas 10 espécies de crotalaria, considerando as isoenzimas esterase (EST; EC 3.1.1.1), glutaciona desidrogenase (GDH; EC 1.4.1.2), peroxidase (PO), xiquimato desidrogenase (SKDH; EC 1.1.1.15), malato desidrogenase (MDH; EC 1.1.1.37), enzima málica (ME) e fosfatase ácida (ACP; EC 3.1.3.2). Os resultados permitiram agrupar diferentes espécies numa faixa de similaridade entre 49 e 78 %. Também foi observado uma grande variabilidade nas classes e números de isoenzimas de SOD, destacando-se a *C. paulina* com maior número de isoenzimas, o que nos leva a sugerir estudos posteriores de interação entre os diversos materiais.

Introdução

Crotalaria (Leguminosae, Papilionoideae, Crotalaraceae) é um gênero extenso na África tropical e comumente encontrado em regiões abertas desde as montanhas aos semidesertos. Quinhentas espécies já foram reconhecidas nesses lugares e no resto da África e Madagascar, e outras 100 ou mais espécies se estendem pelos trópicos e subtropicais do hemisfério sul. O mais notável em África é a enorme proliferação ao longo dos rios, Congo e Zambezi; no extremo Sul do lago Tanganika 75 espécies têm sido coletadas. O incremento da coleta intensiva nas regiões menos exploradas e a existência de fragmentos em herbários, indicam que um bom número de espécies está sendo encontrado (Polhill, 1982).

Crotalaria é o terceiro maior gênero de Papilionoideae sendo o único representante da tribo Crotalarieae na América do Sul (Fillietaz, 2002). O crescimento vigoroso, boa nodulação e resistência razoável a doenças, são características de algumas espécies do gênero que lhes conferem diferentes propósitos e usos (Polhill, 1982), sendo utilizadas na alimentação humana e animal, para uso médico, ornamental e suas duas maiores aplicações são a fixação de nitrogênio atmosférico, característica da família Leguminosae (Medina, 1959; Polhill, 1982), citados por (Mondin, 2003) e a qualidade de suas fibras, notavelmente de *C. retusa*, *C. brevidens*, *C. pallida* e *C. zanzibarica* (Polhill, 1982). Os alcalóides e outros princípios ativos farmacêuticos de determinadas espécies, também são utilizados na medicina tradicional (Polhill, 1982).

C. juncea é a principal espécie cultivada; na Índia, sua fibra é empregada na fabricação de lonas, cordas, redes de pesca, papel e na confecção de diversos utensílios (Vietmayer, 1979; Oliveira, 1992); foi introduzida amplamente na África, mas exceto

algum sucesso no Zimbabwe, tem sido pouco explorada (Fox, 1954). No Brasil foi introduzida no século XIX para adubação verde, principalmente na cultura da cana-de-açúcar (Oliveira, 1992) e sua produção anual é de 130000 toneladas métricas, principalmente na Índia e Brasil (Vietmayer, 1979). A espécie tem sido usada por todo o trópico como adubo verde, e pode ser usada com discrição como forrageira. Embora outras 15 espécies têm sido extensivamente tratadas como adubo verde e plantas de cobertura em estações experimentais em várias regiões, nenhuma parece ter interesse em práticas agronômicas gerais (Polhill, 1982).

A classificação de espécies de *Crotalaria* tem-se baseado principalmente em caracteres florais; características como por exemplo, estilete coberto de pelos em duas fileiras em espiral e anteras claramente diferenciadas, têm evitado confundir com *Lebeckia*, género com características semelhantes a *Crotalaria*. No entanto características mais óbvias, como a quilha rostrada e o legume inflado são úteis para o reconhecimento, mas não para uma classificação precisa, sendo estas características as maiores responsáveis por classificações errôneas de um grande número de espécies (Polhill, 1982).

A análise de isoenzimas por eletroforese é de grande significado como um método para determinar a diversidade genética em plantas, porque a neutralidade seletiva para locos isoenzimáticos pode ser assumida em muitos casos, e portanto elas proporcionam uma medida de relacionamento entre os cultivares que não são capazes de ser alterados significativamente por processo de seleção experimental (Resende *et al.*, 2000).

A utilização de isoenzimas como marcadores moleculares e genéticos vem sendo empregada com grande sucesso, em diversos trabalhos nos quais se estuda a diversidade de germoplasma ou mesmo de populações naturais, o que vem sendo estudado por meio de marcadores moleculares de DNA (Freitas, 2000).

A determinação do sistema reprodutivo por meio de marcadores isoenzimáticos possui três vantagens em relação à determinação por marcadores morfológicos: 1. As isoenzimas têm herança codominante; 2. muitos locos isoenzimáticos são altamente polimórficos na maioria das populações; e 3. as isoenzimas possivelmente não estão sujeitas a forças seletivas (Silva, 2000).

A variação de isoenzimas tem sido estudada para determinar o relacionamento genético de 269 cultivares de *Dioscorea alata* desde o Sul do Pacífico, Ásia, África e Caribe (Lebot *et al.*, 1998), para classificar cultivares Japoneses de (*Colocassia esculenta* (L.) Schott) (Isshiki *et al.*, 1998) e para caracterização e diversidade genética de cultivares de capim elefante e seus híbridos com milheto (De Freitas *et al.*, 2000)

A enzima SOD (Superóxido:superóxido oxidorreductase) catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ à H_2O_2 , apresentando-se na forma de isoenzimas (Bowler *et al.*, 1992 e Voet & Voet, 1995). As isoenzimas da SOD são ubíquas em organismos aeróbicos, anaeróbicos aerotolerantes e alguns anaeróbicos obrigatórios, protegendo-os contra os danos oxidativos através da remoção do radical $O_2^{\bullet-}$. Estas enzimas são codificadas no núcleo e transportadas para seus locais organelares por meio de seqüências marcadas com NH_2 terminais. São as únicas enzimas em que suas atividades determinam as concentrações de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , os dois substratos da reação de Haber-Weiss que origina os radicais $OH^{\bullet}$ e provavelmente por isso, as SODs representam o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (Bowler *et al.*, 1992 e Alscher *et al.*, 1998). Estas metaloenzimas multiméricas têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico de seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn), manganês (Mn) ou ferro (Fe) (Scandalios, 1993). A Mn-SOD, normalmente localizada na mitocôndria, é resistente ao KCN (B) e ao H_2O_2 (C), a Cu/Zn-SOD, localizada nos cloroplastos, é inativada por KCN e por H_2O_2 e a Fe-SOD, está também

associada aos cloroplastos, é resistente ao KCN e inativada por H₂O₂. As Cu/Zn-SODs e algumas Mn-SODs e Fe-SODs de procariotos são diméricas, enquanto as Mn-SODs das mitocôndrias e de algumas bactérias termófilas são tetraméricas (Scandalios, 1993).

Neste estudo, a eletroforese de enzimas foi usada como um método para determinar a diversidade genética de várias espécies de *Crotalaria*, as quais têm sido mantidas na coleção do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Piraí Sementes e Instituto Agronômico de Campinas (IAC), Brasil. Foi conduzido também um estudo com o objetivo de investigar e classificar diferentes isoformas de SOD em espécies de *crotalaria*

Materiais e Métodos

Material Vegetal

Sementes de *C. brevipflora*, *C. lanceolata*, *C. mucronata* e *C. spectabilis*, foram obtidas do banco de sementes do Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, Brasil. Sementes de *C. grantiana*, *C. paulina*, *C. streata*, *C. othoptera* e *Crotalaria zanzibarica*, foram obtidas no Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, Brasil e Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil. As sementes de *C. juncea* foram obtidas do banco de sementes da empresa Piraí Sementes, Piracicaba, Brasil

As sementes foram escarificadas quimicamente com ácido sulfúrico puro durante 20 minutos, em capela. Após o tempo de escarificação o ácido foi lavado cuidadosamente várias vezes em água corrente, repetindo posteriormente o processo em água deionizada, até que o excesso de ácido fosse eliminado. As sementes lavadas foram postas para

germinar em rolos de papel de germinação, previamente umedecido e colocados em potes plásticos com água até ¼ da altura dos rolos e com aeração contínua em câmara de crescimento sob condições ambientais controladas (60-80 % de umidade relativa, 25-27 °C .de temperatura e um fotoperíodo de 16 h a 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 7 dias.

No fim desse período, as plântulas com aproximadamente o mesmo tamanho, foram selecionadas e colocadas para crescer por um período de 96 horas em potes plásticos de 1,5 L de capacidade contendo solução nutritiva de Hoagland. As folhas e raízes foram posteriormente recortadas e as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, prévio a extração enzimática.

Extração das enzimas

Todo o processo de extração enzimática foi feito a 4 °C. Os tecidos das plântulas congelados com nitrogênio líquido foram macerados na proporção 1:3 (p/v) de massa seca por tampão de extração (100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7.5 contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 5 % p/v de PVPP). O homogenado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 min e o sobrenadante coletado e armazenado em alíquotas separadas a -80 °C para serem usadas para as análises da atividade de ME, PO, SKDH, GDH, ACP, MDH, EST e SOD. A proteína foi estimada pelo método da Bradford (1976), usando BSA como padrão.

Ensaio enzimático

A atividade da GDH, MDH, SKDH, ME, PO, EST e ACP foram determinadas em géis nativos segundo metodologias descritas por Pasteur & Pasteur (1988).

A atividade da SOD foi igualmente determinada em géis nativos como descrito por Beauchamp & Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998). Os géis foram enxaguados com água deionizada e incubados no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente num ensaio contendo mistura de 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7.8), 1mM EDTA, 0.05 mM riboflavina, 0.1 mM tetrazolium nitroblue e 0.3% (v/v) N,N,N'',N''-tetrametiletilenodiamina (TEMED). No fim deste período, os géis foram enxaguados com água deionizada e expostos a luz em uma caixa por 5-10 minutos a temperatura ambiente até o aparecimento de bandas representando a atividade da SOD. Foi paralisada a reacção por transferência dos géis a 6% (v/v) de ácido acético. Foi usada SOD Bovina (Sigma Chemical Co.) como um controle positivo da atividade da SOD em todos géis. As isoenzimas da SOD foram visualizadas e classificadas como descrito previamente por Azevedo *et al.* (1998) por incubação dos géis por 20 minutos em solução contendo 2 mM KCN e 5 mM H₂O₂, separadamente e então incubada a mistura de reacção da SOD como segue. Foi feito um pré-tratamento dos géis em H₂O₂ and KCN antes de manchar os géis da SOD, para classificar a SOD em isoenzimas de Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ou Mn-SOD. A Mn-SOD é resistente a ambos inibidores, A isoenzima Fe-SOD é resistente ao KCN e inibido por H₂O₂, e a Cu/Zn-SOD é inibida por ambos inibidores. O acúmulo da concentração de proteína no gel, foi incrementado para 150 µg para identificar alguma isoenzima de SOD com bandas menos expressivas no gel de eletroforese.

Construção do dendograma

Um dendograma foi construído baseado no coeficiente de Jaccard (S_j) usando a análise dos grupos segundo a posição das bandas (para cada padrão, S_j divide o número de bandas correspondentes pelo número total de bandas em ambos padrões). O dendograma consensual foi obtido usando o método de reamostragem “bootstrap” (entre 1000 réplicas), através do software Winboot (Araújo *et al.*, 2001).

Resultados

Os resultados em PAGE (Fig. 1) mostraram uma variação na atividade total de isoformas de SOD entre as diferentes espécies de *Crotalaria* estudadas, as quais puderam ser classificadas posteriormente pela análise de inibidores (dados não mostrados), como Cu/Zn-SOD, Mn- SOD e Fe-SOD. Pela figura pode observar-se a presença de 15 isoenzimas de SOD:

As isoformas IIa, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI e XII foram classificadas como sendo Cu/Zn-SOD; as isoformas I, II e III foram classificadas como sendo Mn-SOD; a isoforma IVa foi classificada como pertencente a classe Fe-SOD.

Das isoformas identificadas, três foram localizadas em *C.mucronata* (B), sendo uma Mn-SOD (III) e duas Cu/Zn-SOD (IV e XII), o mesmo acontecendo com *C.lanceolata* (C), onde foi encontrada também uma Mn-SOD (I) e duas Cu/Zn-SOD (IV e XI). Já em *C.grantiana* [Fig 1(D); Fig.2], foram localizadas duas isoformas Cu/Zn-SOD (IIa e VI) e uma Fe-SOD (IVa), ao passo que em *C.streata* (E) foi encontrada uma Mn-SOD (III) e também duas Cu/Zn-SOD (IV e XI).

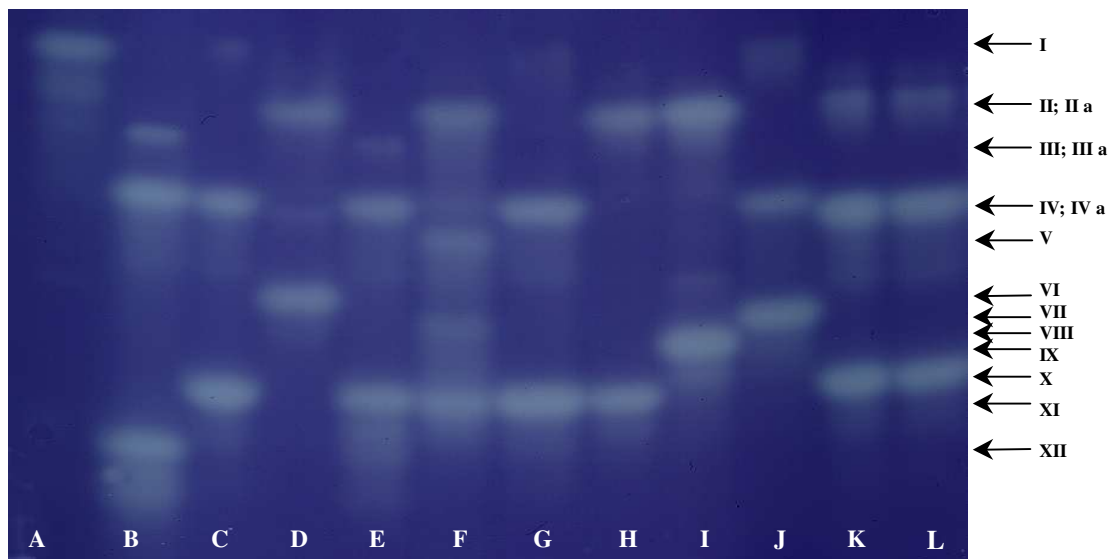


Figura 1. Atividade da SOD em folhas de diferentes espécies de crotalaria. A: amostra padrão de SOD; B: *C. mucronata*; C: *C. lanceolata*; D: *C. granthiana*; E: *C. streata*; F: *C. paulina*; G: *C. ochroleuca*; H: *C. brevisflora*; I: *C. spectabilis*; J: *C. zanzibarica*; K: *C. juncea*; L: *C. juncea* var. IAC-KR1. Os números à direita indicam isoformas de SOD.

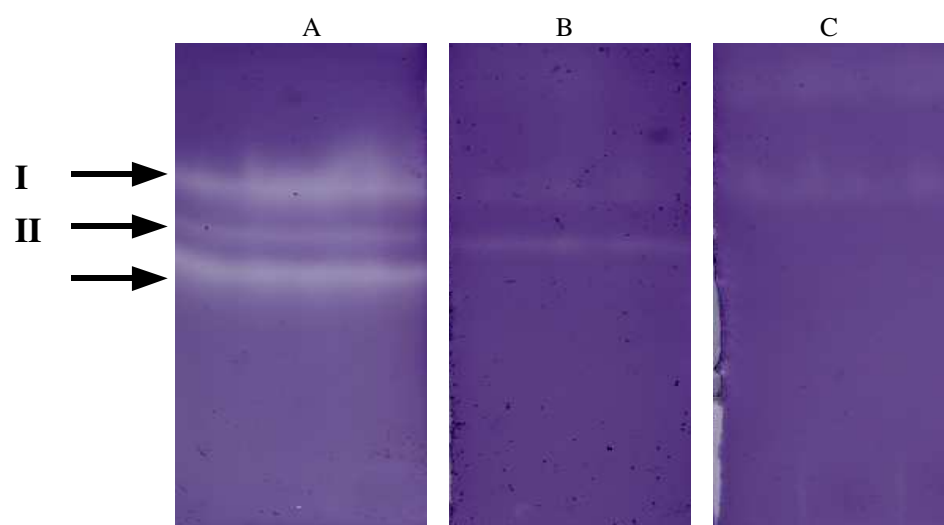


Figura 2. Isoformas de SOD em plântulas de *C. grantiana*. A: controle padrão de atividade; B: incubação em KCN antes da revelação; C: incubação em H_2O_2 antes da revelação. Os números a esquerda indicam isoformas de SOD.

Em *C. paulina* [Fig.1(F); Fig.3] foram localizadas cinco isoenzimas, sendo uma Mn-SOD (II) e as outras quatro classificadas como Cu/Zn-SOD (IIIa, V, VIII e XI).

De maneira semelhante ao observado na maioria das espécies até agora analisadas foi ainda possível identificar em *C. ochroleuca* (G), três isoformas de SOD, das quais uma Mn-SOD (I) e duas Cu/Zn-SOD (IV e XI). Em *C. breviflora* (H) foi identificada apenas uma Mn-SOD (II) e uma Cu/Zn-SOD (XI), o mesmo acontecendo com *C. spectabilis* (I) onde foi identificada uma isoforma de SOD como sendo Mn-SOD (II) e outra Cu/Zn-SOD (VIII).

Em *C. zanzibarica* (J) foi identificada uma isoforma Mn-SOD (I) e duas isoformas Cu/Zn-SOD (IV e VII). Outras três isoformas foram também localizadas em *C. juncea* (K) e *C. juncea* var.IAC-KR1 (L), tendo aparecido pela análise de inibidores, para ambas espécies uma isoforma Mn-SOD (II) e duas Cu/Zn-SOD (X).

Para a análise de similaridade entre as espécies *C. juncea*, *C. streata*, *C. paulina*, *C. breviflora*, *C. grantiana*, *C. zanzibarica*, *C. ochroleuca*, *C. mucronata*, *C. lanceolata* e *C. spectabilis*, foram utilizados sistemas isoenzimáticos em géis nativos (PAGE), nos quais foram corridos os géis com todas espécies de *Crotalaria* utilizadas neste estudo em cada gel de ACP, EST, ME, MDH, GDH, PO e SKDH. Posteriormente foi montado um dendograma relacionando todas as espécies e as enzimas, como pode observar-se na figura 4.

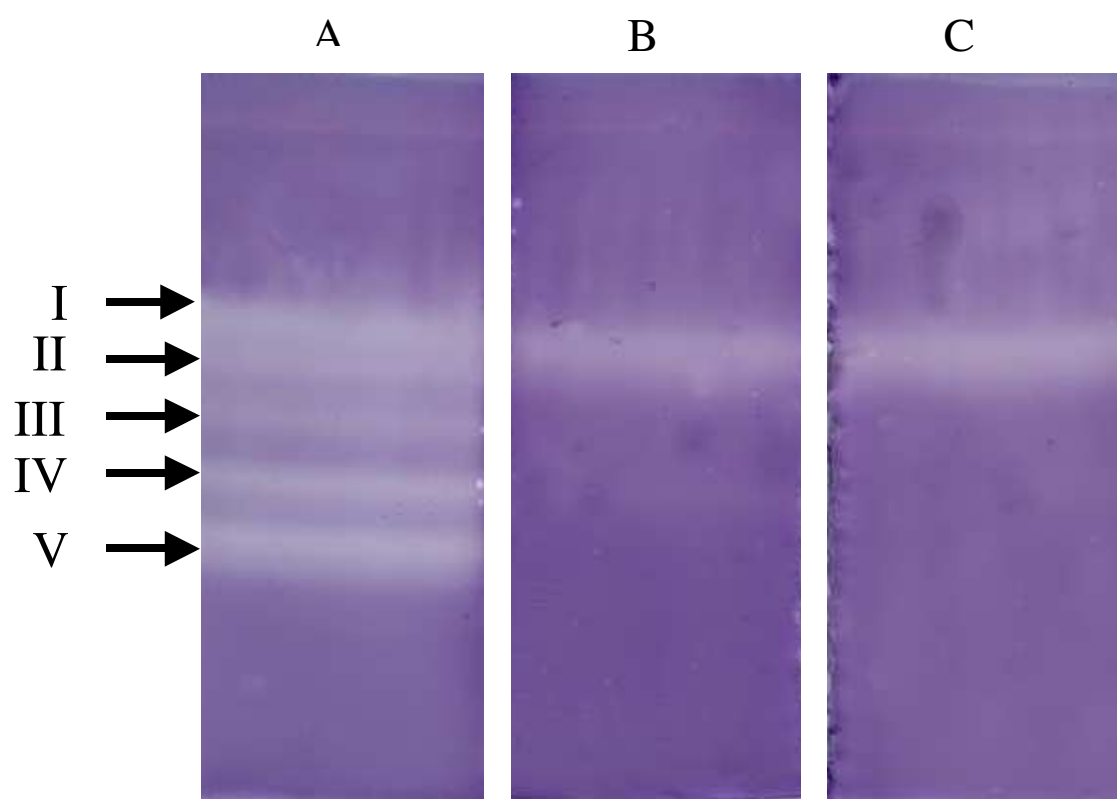


Figura 3. Isoformas de SOD em plântulas de *Crotalaria paulina*. A: controle padrão de atividade; B: incubação em KCN antes da revelação; C: incubação em H₂O₂ antes da revelação. Os números a esquerda indicam isoformas de SOD.

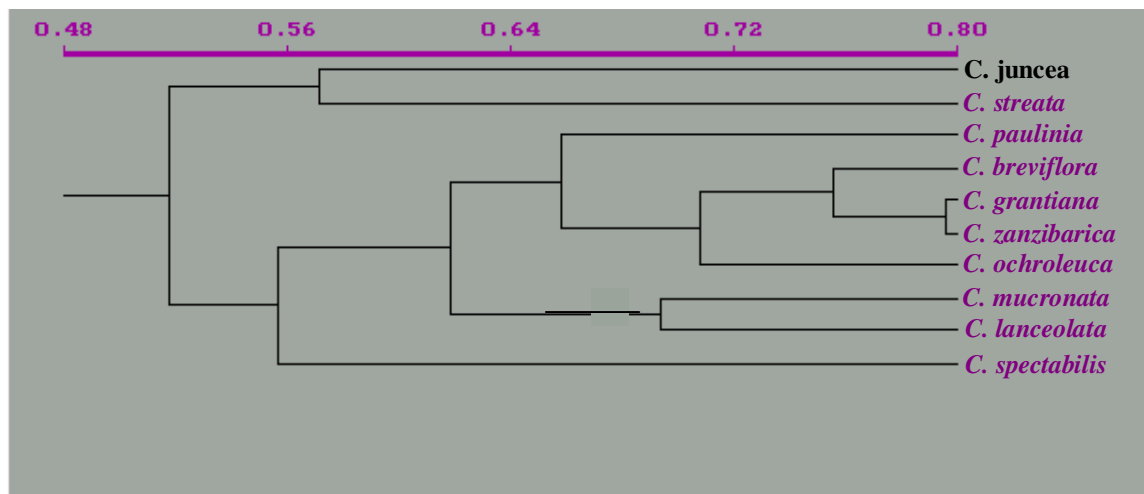


Figura 4. Dendrograma com 10 espécies de crotalaria em relação a diversos sistemas enzimáticos. Espécies: *Crotalaria juncea*; *Crotalaria streata*; *Crotalaria paulinia*; *Crotalaria breviflora*; *Crotalaria grantiana*; *Crotalaria zanzibárca*; *Crotalaria ochroleuca*; *Crotalaria mucronata*; *Crotalaria lanceolata*; *Crotalaria spectabilis*. Sistemas enzimáticos: Esterase, Glutathione desidrogenase, Peroxidase, Xiquimato desidrogenase, Malato desidrogenase, Enzima málica e Fosfatase ácida.

Discussão

Pela análise com inibidores as diferentes isoformas de SOD puderam ser classificadas, e foram identificadas onze isoenzimas pertencentes a classe Cu/Zn-SOD, três isoformas pertencentes a classe Mn-SOD e uma isoforma pertencente a classe Fe-SOD. O número de isoenzimas de cada classe de SOD varia grandemente de planta para planta (Bowler *et al.*, 1992), sendo que as Cu/Zn-SODs são consideradas as mais abundantes em vegetais (Wingsle *et al.*, 1991).

As isoformas que apareceram com mais frequência entre as espécies são: II (Mn-SOD), presente em *C. granthiana* (D), *C. paulina* (F), *C. breviflora* (H), *C. spectabilis* (I), *C. juncea* (K) e *C. juncea* var. IAC-KR1 (L); IV (Cu/Zn-SOD), presente em *C. mucronata* (B), *C. lanceolata* (C), *C. streata* (E), *C. ochroleuca* (G), *C. zanzibarica* (J), *C. juncea* (K) e *C. juncea* var. IAC-KR1 (L) e a isoforma XI que também é uma (Cu/Zn-SOD), presente em *C. lanceolata* (C), *C. streata* (E), *C. paulina* (F), *C. ochroleuca* (G), e em *C. breviflora* (H).

As menos frequentes, apresentando-se apenas em uma espécie de crotalaria, são: V, VI, VII, VIII, IX e XII, todas elas pertencentes Classe Cu/Zn-SOD. A espécie que apresentou maior número de isoformas foi a *C. paulina* (F) sendo uma Mn-SOD (II), e quatro do tipo Cu/Zn-SOD (IIIa, V, VIII e XI). A isoforma I que é uma Mn-SOD é foi identificada em *C. lanceolata* (C), *C. ochroleuca* (G), e *C. zanzibarica* (J), apesar de aparecerem as bandas com pouca intensidade nas três espécies; o comportamento da atividade das isoenzimas de SOD nas espécies *C. lanceolata* (C) e *C. ochroleuca* (G) foi

muito semelhante, já que além desta Mn-SOD têm em comum as isoformas IV e XI, ambas Cu/Zn-SOD, como pode observar-se na fig.1.

A isoforma IV também é comum a *C. zanzibarica* (J), mas esta última tem uma isoforma VII, que é uma Cu/Zn-SOD e não está presente nas duas primeiras. A isoforma II também é uma Mn-SOD e é comum a em *C. granthiana* (D), *C. paulina* (F), *C. breviflora* (H), *C. spectabilis* (I), *C. juncea* (K) e *C. juncea* var. IAC-KR1 (L). A intensidade com que aparece a banda é maior em *C. spectabilis* (I), a atividade das isoenzimas da SOD nesta última espécie difere ainda da atividade de todas as outras espécie, por ser a única em apresentar a isoenzima IX, que é uma Cu/Zn-SOD, também com uma banda bastante intensa.

C. grantiana (D), por sua vez difere de todas as outras pela presença da isoenzima VI, que é uma Cu/Zn-SOD e aparece unicamente nesta espécie; por outro lado aqui também está presente a isoenzima IVa [fig.1; fig.2], que é uma Fe-SOD, apesar da banda aparecer com pouca intensidade, como pode observar-se na incubação com KCN (fig. 2). Este é um fato interessante, já que segundo Azevedo et al. (1998), é muito raro o aparecimento da Fe-SOD em células vegetais, e quando encontrada está associada aos cloroplastos. *C. juncea* (K) e *C. juncea* var. IAC-KR1 (L) são iguais entre si, pois apresentam as mesmas isoformas (II, IV e IX), a primeira Mn-SOD e as duas últimas Cu/Zn-SOD.

Por sua vez *C. paulina*(F) e *C.breviflora* (H) têm também em comum a isoforma XI, que é uma Cu/Zn-SOD, mas diferem entre si, nas isoformas III, V e VIII, que são Cu/Zn-SOD e aparecem apenas em *C.paulina* (F); das espécies por nós estudadas, esta última foi a única onde foram observadas cinco isoformas de SOD, como pode observar-se pela análise de inibidores para *C. paulina* (fig. 3). Pan e Yuan (1991) já teriam encontrado em arroz seis isoformas de SOD, sendo que duas eram Mn-SOD e quatro Cu/Zn-SOD; Sehmer &

Dizengremel (1998) encontraram em cevada também cinco isoformas de SOD sendo uma Mn-SOD localizada na mitocôndria e quatro Cu/Zn-SOD, uma das quais localizada no cloroplasto. Em folhas de aveia estes mesmos pesquisadores encontraram cinco isoformas de SOD, todas da classe Cu/Zn-SOD, uma das quais foi encontrada na mitocôndria.

A isoforma III (Mn-SOD) (fig. 1) é comum a *C.mucronata* (B) e *C.streta* (E) mas *C.mucronata* (B) difere da segunda por apresentar também a isoforma XII que é uma Cu/Zn-SOD, e por sua vez em *C.streta* (E) aparece a isoforma XI, também Cu/Zn que não está presente em *C.mucronata* (E).

Para a análise de similaridade entre as espécies *C. juncea*, *C. streata*, *C.paulina*, *C. breviflora*, *C. grantiana*, *C. zanzibarica*, *C.ochroleuca*, *C. mucronata*, *C. lanceolata* e *C. spectabilis*, foram utilizados sistemas isoenzimáticos em geis nativos (PAGE), nos quais foram corridas todas espécies de *Crotalaria* utilizadas neste estudo em cada gel de ACP, EST, ME, MDH, GDH, PO e SKDH. Posteriormente foi montado um dendograma relacionando todas as espécies e as enzimas, como pode observar-se na figura 3.

Pode observar-se pelo dendograma representado na figura 4 a formação de dois grandes grupos distintos, o primeiro formado pela *C. Juncea* e *C. Zanzibarica*, com uma similaridade de aproximadamente 58 %, e o outro grande grupo formado por todas as outras especies com uma similaridade de 56 %. *C. granthiana* e *C. zanzibárica* foram as espécies que mais se assemelharam levando em conta os 7 sistemas enzimáticos estudados, pois apresentaram o maior coeficiente de similaridade (78 %); ambas em relação a *C. breviflora* apresentaram coeficiente de similaridade de 74 % e 70 %de similaridade em relação a *C. ochroleuca*. Este grupo de espécies difere pouco da *C. paulina*, pois tem uma semelhança de 66 %, em relação aos sistemas enzimáticos estudados ao passo que em relação ao grupo formado entre a *C. mucronata* e *C. lanceolata* têm apenas 60 % de

semelhança. A *C. juncea* e *C. streata* apesar de terem uma semelhança de apenas 58 %, formam um grupo cuja semelhança com as demais espécies é relativamente pequena (49 %).

Apesar de apenas existir na literatura trabalhos feitos tendo em conta parâmetros morfológicos com algumas das espécies de *Crotalaria* utilizadas neste estudo, nenhum trabalho considerando sistemas enzimáticos, até onde pudemos pesquisar foi encontrado. Dessa acreditamos, que esta abordagem pode contribuir para a classificação dos diferentes materiais, aliados aos estudos morfológicos entre outros. É importante ressaltar que de um ponto de vista geral, essas análises indicam que para os sistemas considerados existe um bom potencial genético a ser explorado. Embora de forma especulativa podemos imaginar que as diferenças observadas, uma vez que grandes grupos não foram evidenciados, podem conferir características eventualmente importantes em situações específicas. Vale a pena ressaltar que as enzimas consideradas estão envolvidas em importantes processos metabólicos. Por outro lado, outras combinações podem ser feitas, talvez relacionando outras enzimas que participam de processos em comum, e que por ventura podem resultar em informações completamente diferentes. Também a consideração de origem dos materiais pode ser explorada.

Como a *Crotalaria* é uma espécie cujas pesquisas estão crescendo devido a importância do gênero, mas ainda não existem muitas publicações envolvendo aspectos moleculares e bioquímicos, destacamos a importância da geração de hipóteses e formulação de questões que permanecem em aberto, para futuras abordagens.

Em adição, ainda temos dados em vias de discussão que poderão enriquecer nosso entendimento a respeito dos sistemas enzimáticos, bem como informações que estão sendo analisadas a respeito da origem e características gerais das espécies para relacionar com o

que já está apresentado (as informações não são de fácil acesso, pois como já mencionado, poucos estudos foram realizados a respeito com espécies de *Crotalaria*). Como exemplo, podemos citar um fato que foi observado no decorrer dos trabalhos realizados: as espécies com maior coeficiente de similaridade, apresentam características morfológicas semelhantes para a semente e também quanto ao processo de germinação, o qual é mais lento. Dessa forma, com a evolução das pesquisas poderemos cada vez mais relacionar estas características morfológicas com as observadas em estudos bioquímicos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) processo N° 99/06429-0 e por The British Council. R.A.Azevedo. recebeu uma bolsa de pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). G.J.G.Pereira. recebeu uma bolsa de doutorado da FAPESP.

Especial agradecimento ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Paraná, e a Pirai Sementes, Piracicaba, SP, por terem cedido as sementes dos diferentes materiais.

Referências

Alscher, R.G.; Donahue, J.L.; Cramer, C.L. (1998). Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. *In*: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (Ed.) Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.233-240.

- Araújo, W. L., Maccheroni, Jr W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O. and Azevedo, J.L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47:229-236.
- Azevedo R A, Alas R M, Smith R J and Lea P J (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104, 280-292.
- Bowler C, Van Montagu M and Inzé D (1992). Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.
- Bradford M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Freitas, N.S.A., Falcão, T.M.M.A., Burity, H.A., Tabosa, J.N. and Silva, Márcia Vâusa Oliveira, A.L.P.C. de (1992). Evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae). ESALQ – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.
- Fillettaz, A.M. (2002). Estudos taxonômicos de *Crotalaria* sect. *Calycinae* Wight & Arn. (Leguminosae – Papilionideae – Crotalarieae) no Brasil. Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, Tese de Mestrado.
- Fox, D.H. (1954). Sunhemp fibre production. *The Rhodesia Agricultural Journal.* 42:6-13.
- Isshiki, S., Nakamura, N., Tashiro, Y. and Miyasaki, S. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 67(4):521-525.

- Lebot, V., Trilles, B., Noyer, J.L. and Modesto, J. (1988). Genetic relationship between *Dioscorea alata* L. cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45(6):499-509.
- Mondin, M. (2003). Estudo da evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e *hibridação in situ* fluorescente (FISH). ESALQ – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.
- Pan, Shu-Mei & Yau, Yaun-Yeu. The isozymes of superoxido dismutase em arroz (1991). *Bot. Bull. Academia Sinica* 32:253-258.
- Pasteur, N.; Pasteur, G, Bonhomme, F., Catalan, J., Britton-Davidian, J. and Cobb, N (1988). *Practical isozyme genetics*. Ellis Horwood Limited, 213 p.
- Pilon-Smits E A H, Zhu Y L, Sears T and Terry N (2000). Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: Effects on cadmium accumulation and tolerance. *Physiol. Plant.* 110, 455-460.
- Polhill, R.M. (1982). *Crotalaria* in Africa and Madagascar, Royal Botanic Gardens, Kew, A.A.Balkema/Rotterdam, 489 p.
- Resende, A.G., Vidigal Filho, P.S. and Machado, M.F.P.S. (2000). Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). *Biochem. Genet.* 38(7/8):203-216.
- Scandalios, J.G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, v.101, p.7-12.
- Sehmer, L. & Dizengremel, P. (1998). Contribution to subcellular localization of superoxido dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. *Journal of Plant Physiology*.

- Silva, R.M. (2000). Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz. ESALQ – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.
- Voet, D.; Voet, J.G. (1995). Biochemistry. 2.ed. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore: Wiley,. 1361p.
- Willekens H, Langebartels C, Tire D, Van Montagu M, Inzé D and Van Camp W (1994). Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). Proc. Natl Acad. Sci. USA 91, 10450-10454.
- Wingsle, G.; Gardeström, P.; Hällgren, J.; Karpinski, S. (1991). Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. Plant Physiology, v.95, p.21-28,
- Woodbury W, Spencer A K and Stahmann M A (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. Anal. Biochem. 44, 301-305.

4. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Efeitos drásticos induzidos pela toxicidade do Cd têm sido relatados em organismos vivos (Vitória *et al.*, 2000). As Plantas possuem diversos mecanismos para minimizar estes efeitos tóxicos. Assim, determinar o efeito desse metal, bem como relacionar os mecanismos mobilizados é extremamente importante para um completo entendimento da fisiologia do estresse em plantas.

Foi demonstrado que concentrações crescentes de CdCl₂ inibiram o crescimento de *C. juncea*. Esse efeito inibitório tem sido relatado na literatura, porém diferenças distintas têm sido demonstradas entre diversas espécies de plantas. Em cana-de-açúcar um pequeno

efeito inibitório pode ser observado em concentrações maiores e por um período mais longo de exposição, sendo claramente essa espécie mais tolerante a esse metal (Fornazier et al., 2002). Diversos artigos têm relatado o efeito de altas concentrações de Cd em plantas (Di Toppi et al., 1999; Kubota et al., 2000; Stroinski et al., 1999; Bhattacharjee, 1998). Em rabanete concentrações abaixo de 0,25 mM de CdCl₂ afetaram muito pouco o crescimento (Willekens et al., 1994). Esses resultados estão de acordo com os demonstrados para *C. Juncea*.

Foi observado grande acúmulo de Cd em raízes de plântulas de *C.juncea* nas primeiras 24 horas, sendo que um rápido aumento neste acúmulo ocorreu em plantas tratadas com 2 mM de CdCl₂. Plantas apresentam variações na capacidade de acumular o Cd em raízes, sendo este metal acumulado de 34 a 97% (Jarvis et al., 1976). A translocação para a parte aérea tem sido demonstrada previamente em um grande número de plantas (Rauser 2000; Hegedus et al., 2001;Vitória et al., 2001). Em *C. juncea* não foi observado acúmulo de Cd até 48 horas de exposição e então a concentração alcançou um platô após 72 horas.

Diversos estudos têm demonstrado o efeito do Cd na atividade da CAT (Vitória et al., 2001; Ferreira et al., 2002; Fornazier et al., 2002). Um aumento na atividade da CAT foi observado em folhas, mas não em raízes de plântulas de *C. juncea* na concentração de 2 mM de CdCl₂. Estes resultados estão de acordo com o observado em *Agropyron repens* (Brej, 1998) e em rabanete (Vitória et al., 2001), onde um aumento na atividade da CAT foi observado em raízes e folhas. Em contrapartida, em soja (Ferreira et al., 2002) e em um período inicial (até 72 h) em cana-de-açúcar (Fornazier et al., 2002), foi observado um efeito inibitório, com diminuição na atividade de CAT foi observado.

Em plantas superiores, três isoenzimas, codificadas por genes distintos têm sido reportadas. Em *C.juncea*, foram observadas de duas a três isoformas de CAT, porém não foram classificadas. Em cana-de-açúcar também foram observadas três isoformas (Fornazier et al., 2002). O aumento da atividade de catalase em folhas de *C. juncea* observado nos tratamentos com CdCl_2 suporta a hipótese de que o Cd causa a formação de peróxido de hidrogênio, o qual é então metabolizado pela CAT (Polidoros and Scandalios, 1999). Embora não tenha sido observado um aumento significativo no total da atividade de CAT em raízes, houve uma alteração no padrão de isoenzimas.

A atividade de SOD permaneceu inalterada durante o período de exposição nas concentrações de CdCl_2 testadas, contrariamente ao ocorrido com a CAT embora variações na atividade de CAT tenham sido observadas previamente por Ferreira et al (2002) e Fornazier *et al.* (2002). A atividade da SOD também permaneceu inalterada. Em rabanete (Vitória *et al.*, 2001) e ervilha (Dalurzo et al., 1997) um padrão diferente foi observado por, onde um aumento de atividade da SOD foi demonstrado. Diferentes estresses oxidativos têm induzido a um aumento na atividade e expressão de genes que codificam a SOD (Bowler et al., 1992; Willekens *et al.*, 1994). Embora o Cd possa estar levando a um estresse oxidativo, provavelmente, não seja o suficiente para um aumento do superóxido que acarrete em incremento na atividade da SOD.

De maneira similar ao observado para CAT, a atividade da GR em folhas aumentou tanto na concentração de 0,2 mM de CdCl_2 quanto na de 2 mM de CdCl_2 , sendo mais pronunciada nesta última. Aumento na atividade de GR tem sido observado também em outras plantas (Ferreira *et al.*, 2002; Fornazier *et al.*, 2002; Schikler and Caspi, 1999; Vitória *et al.*, 2001). Apesar de evidências indicarem que o Cd acumula-se principalmente em raízes, quando comparado a folhas e caules, estes resultados em folhas sugerem que esta

enzima pode responder a exposição ao Cd e possivelmente acumular o metal neste tecido por manter a glutathione em sua forma reduzida, a qual é precursora de fitoquelatinas (Cobbet, 2000). Dessa forma as atividades observadas para a enzima GR indiretamente indicam a possibilidade de biossíntese de fitoquelatinas.

Assim, em *C. juncea*, é possível que as espécies ativas de oxigênio (EAOs) induzidas pelo Cd, sejam metabolizadas pela CAT nos peroxissomos, e que um aumento da atividade de GR, além de promover a GSH para síntese de fitoquelatinas, como já mencionado, também desempenhe um papel na limpeza das EAOs induzidas pelo Cd através do ciclo da glutathione-ascorbato, já que a GSH também é um antioxidante.

Finalmente, as atividades das enzimas antioxidantes em conjunto indicam a ocorrência de estresse oxidativo induzido pelo metal.

Os dados ao crescimento nos permitem sugerir a crotalaria como possível espécie a ser utilizada como bioindicadora e monitoramento da poluição ambiental.

Os resultados relativos aos sistemas isoenzimáticos utilizados mostraram ser eficientes para identificar através da análise de agrupamento a ocorrência de pelo menos dois grandes grupos distintos. Além disso, a variabilidade isoenzimática encontrada para SOD, abre perspectiva para explorá-la buscando um melhor entendimento dos mecanismos que podem por ventura conferir diferentes níveis tolerância aos metais pesados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alscher, R.G.; Donahue, J.L.; Cramer, C.L., 1998. Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. *In*: DE KOK, L.J.; STULEN, I. (Ed.) Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p.233-240.
- Araújo, W. L., Maccheroni, Jr W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O. and Azevedo, J.L., 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from tissues of citrus rootstocks. *Can. J.Microbiol.* 47:229-236.
- Azevedo R A, Alas R M, Smith R J and Lea P J , 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104: 280-292.
- Barata R M, Chapparro A, Chabregas S M, Gonzalez R, Labate C A, Azevedo R A, Sarath G, Lea P J and Silva-Filho M. C., 2000. Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: Effects on aerobic metabolism in transgenic plants. *Plant Sci.* 155: 193–202.
- Beauchamp C H and Fridovich I , 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276–287.
- Bergmann H, Machelett B, Lippmann B and Friedrich Y, 2001. Influence of heavy metals on the accumulation of trimethylglycine, putrescine and spermine in food plants. *Amino Acids* 20, 325–329.
- Bhattacharjee S, 1998. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biol. Plant.* 40, 131–135.

- Boussama N, Ouariti O and Ghorbal M H, 1999a. Changes in growth and nitrogen assimilation in barley seedlings under cadmium stress. *J. Plant Nutr.* 22, 731–752.
- Boussama N, Ouariti O, Suzuki A and Ghorbal M H, 1999b. Cd stress on nitrogen assimilation. *J. Plant Physiol.* 155: 310–317.
- Bowler C, Van Montagu M and Inzé D. 1992. Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 83-116.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brej T ,1998. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. populations from Legnica copper smelter area, Lower Silesia. *Acta Soc. Pol.* 67, 325–333.
- Bruns I, Sutter K, Menge S, Neumann D and Krauss G J.,2001. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *J. Plant Physiol.* 158, 79–89.
- Cardoso, P.F., Molina, S.M.G., Pereira, G.J.G, Vitória, A.P. and Azevedo R.A., 2002. Response of rice inbred lines to cadmium exposure. *J. Plant Nutr.* 25, 927–944.
- Casterline Jr., J.L, Barnett, N.M., 1982. *Plant Physiol.* 69:1004-1007.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., Ferjani, E.E., 1997. *Plant Science* 127:139-147.).
- Chaparro–Giraldo A, Barata RM, Chabregas SM, Azevedo R A and Silva–Filho MC., 2000. Soybean leghemoglobin targeted to potato chloroplasts influences growth and development of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 19, 961–965.
- Chongpraditnun, P., Mori, S., Chino, M., 1992. *Plant Cell Physiol.* 33(3):239-244.
- Chugh L K and Sawhney S K., 1999. Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea. *Biol. Plant.* 42, 401–407.

- Cieslinski, G., Van Rees, K.C.J., Huang, P.M., Kozak, L.M., Rostad, H.P.W., Knott, D.R., 1996. Plant And Soil 182:115-124.
- Cobbett C S., 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol. 123, 825–832.
- Corpas F J, Barroso J B and del Rio L A., 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. Trends Plant Sci. 6, 145–150.
- Creissen, G.P.; Broadbent, P.; Kular, B.; Reynolds, H.; Wellburn, A.R.; Mullineaux, P.M., 1994. Manipulation of glutathione-reductase in transgenic plants—implications for plants responses to environmental-stress. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B - Biological Sciences, .102,167-175.
- Cuypers A, Vangronsveld J and Cliisters H., 2000. Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during early stages of metal assimilation. Physiol. Plant. 110, 512–517.
- Dalurzo H C, Sandalio L M, Gomez M and Del Rio L A.,1997. Cadmium infiltration of detached pea leaves: Effect on its activated oxygen metabolism. Phyton. 37, 59–64.
- De Leonardis S, Dipierro N and Dipierro S., 2000. Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. Plant Physiol. Biochem. 38, 773–779.
- Di Toppi L S, Lambardi M, Pecchioni N, Pazzagli L, Durante M and Gabbrielli R 1999 Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. J. Plant Physiol. 154, 385–393.

- Edwards, E.A.; Rawsthorne, S.; Mullineaux, P.M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 80, 2, 278-284.
- Fargasova A., 2001. Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapsis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biol. Plant.* 44, 471–473.
- Fernandes, J.C., Henriques, F.S., 1991. *The Botanical Review* 57:246-273.
- Ferreira R R, Fornazier R F, Vitória A P, Lea P J and Azevedo R A., 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *J. Plant Nutr.* 25, 327–342.
- Filliettaz, A.M., 2002. Estudos taxonômicos de *Crotalaria* sect. *Calycinae* Wigh & Arn. (Leguminosae – Papilionideae – Crotalarieae) no Brasil. Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, Tese de Mestrado.
- Fornazier R F, Ferreira R R, Vitória A P, Molina S M G, Lea P J and Azevedo R A., 2002. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biol. Plant.*, 41, 91–97.
- Foyer C H and Noctor G, 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.* 146, 359–388.
- Fox, D.H. ,1954. Sunhemp fibre production. *The Rhodesia Agricultural Journal.* 42:6-13.
- Freitas, N.S.A., Falcão, T.M.M.A., Burity, H.A., Tabosa, J.N. and Silva, Márcia Vâusa
- Frugoli, J.A.; Zongh, H.H.; Nuccio, M.L.; Mccourt, P.; Mcpeek, M.A.; Thomas, T.L.; Mcclung, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology*, v.112, n.1, p.327-336, 1996.
- Gallego S M, Benavides M P and Tomaro M L, 1999. Effect of cadmium ions on antioxidant defence system in sunflower cotyledons. *Biol. Plant.* 42, 49–55.

Galli, U., Schüepp, H., Brunold, C., 1996. *Planta* 198:139-143.

Garcia, M.B.O., 2002. Influência da lectina de *Crotalaria paulina* e lectina de veneno de serpente *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.

Gentchujnicov, I.D., 1976. Manual de Taxonomia Vegetal, S.P., DE. Agronômica Ceres, 368 p.

Giurnos, E.C., 1985. Estudos organográficos e anatômicos de espécies do gênero *Crotalaria* (Leguminosae) em três estádios de desenvolvimento vegetativo. Tese Apresentada à Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Rio Claro-S.P., 126 p.

Grant J J and Loake G J 2000 Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant Physiol.* 124, 21–29.

Groppa M D, Tomaro M L and Benavides M P 2001 Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161, 481–488.

Harada E, Choi Y E, Tsuchisaka A, Obata H and Sano H 2001 Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *J. Plant Physiol.* 158, 655–661.

- Hart J J, Welch R M, Norvell W A, Sullivan L A and Kochian L V 1998 Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiol.* 116, 1413–1420.
- Hegedus A, Erdei S and Horvath G 2001 Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 160, 1085–1093.
- Hendry, G.A.F., Baker, A.J.M., Ewart, C.F., 1992. *Acta Bot. Neerl.* 41(3):271-281.
- Höfgen R, Kreft O, Willmitzer L and Hesse H 2001 Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids* 20, 291–299.
- Isshiki, S., Nakamura, N., Tashiro, Y. and Miyasaki, S., 1998. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 67(4):521-525.
- Iwamoto, M.; Maekawa, M.; Saito, A. Evolutionary relationship of plant catalase genes inferred from exon-intron structures: isozyme divergence after the separation of monocots and dicots. *Theoretical and Applied Genetics*, v.97:9-19, 1998.
- Jarvis S C, Jones L H P, Hopper M J.,1976. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from root to shoot. *Plant and Soil*, 44, 179-191,
- Kendall A C, Keys A J, Turner J C, Lea P J and Miflin B J 1983 The isolation and characterization of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 159, 505–511.
- Khudsar T, Mahmooduzzafar and Iqbal M 2001 Cadmium-induced changes in leaf epidermes, photosynthetic rate and pigment concentration in *Cajanus cajan*. *Biol. Plant.* 44, 59–64.

- Kliebenstein P J, Monde R A and Last R L 1998 Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localisation. *Plant Physiol.* 118, 637–650.
- Kubota H, Sato K, Yamada T and Maitani T 2000. Phytochelatin homologs induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 53, 239–245.
- Kumar R G and Dubey R S 1999 Glutamine synthetase isoforms from rice seedlings: Effects of stress on enzyme activity and the protective roles of osmolytes. *J. Plant Physiol.* 155, 118–121.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lee, H.; Jo, J.; Son, D. 1998 Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Structure and Expression*, v.1395, n.3, p.309-314, 1998.
- Lesser, M.P.; Stochaj, W.R. Protoadaptation and protection against active forms of oxygen in the symbiotic prokaryote *Prochloron* sp. and its ascidian host. *Applied Environmental Microbiology*, v.56, p.1530-1535, 1990.
- Mallick, N.; Mohn, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. *Journal of Plant Physiology*, v.157, p.183-193, 2000.
- Medina, J.C., 1959. *Plantas Fibrosas da Flora Mundial*. São Paulo: Industria Gráfica Siqueira, 913 p.
- Navais, M.L., 1991. Using plant population biology in weedy research: a strategy to improve weed management. *Weed Res*, 31:171-179.
- Lebot, V., Trilles, B., Noyer, J.L. and Modesto, J. (1988). Genetic relationship between *Dioscorea alata* L. cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45(6):499-509.

- Lee S M and Leustek T 1999 The effect of cadmium on sulphate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. Plant Sci. 141, 201– 207.
- Leita L, Contin M and Maggioni A 1991 Distribution of cadmium and induced Cd binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Sci. 77, 139–147.
- Medina, J.C., 1959. Plantas Fibrosas da Flora Mundial. São Paulo: Industria Gráfica Siqueira, 913 p.
- Mondin, M., 2003. Estudo da evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae) com o emprego de técnicas de bandamento cromossômico e *hibridação in situ* fluorescente (FISH). ESALQ – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.
- Mullineaux P, Ball L, Escobar C, Karpinska B, Creissen G and Karpinski S 2000 Are diverse signalling pathways in the regulation of Arabidopsis antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 355,1531–1540.
- Noctor G and Foyer C H 1998 Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 249–279.
- Oliveira, A.L.P.C., 1992. Evolução cariotípica do gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae). ESALQ – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.
- Pan, Shu-Mei & Yau, Yaun-Yeu., 1991. The isozymes of superoxido dismutase em arroz. Bot. Bull. Academia Sinica 32:253-258.
- Pasteur, N.; Pasteur, G, Bonhomme, F., Catalan, J., Britton-Davidian, J. and Cobb, N., 1988. Practical isozyme genetics. Ellis Horwood Limited, 213 p.

- Pilon-Smits E A H, Zhu Y L, Sears T and Terry N 2000. Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: Effects on cadmium accumulation and tolerance. *Physiol. Plant.* 110, 455-460.
- Polhill, R.M., 1982. *Crotalaria* in Africa and Madagascar, Royal Botanic Gardens, Kew, A.A.Balkema/Rotterdam, 489 p.
- Polidoros A N and Scandalios J G., 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol. Plant.* 106, 112–120.
- Rady, A.A.; El-Sheekh, M.M.; Matkovics, B. Temperature shift-induced changes in the antioxidant enzyme system of cyanobacterium *Synechosystis* PCC6803. *International Journal Biochemistry*, 26:433-435, 1994.
- Rauser W E., 2000. Roots of maize seedlings retain most of their cadmium through two complexes. *J. Plant Physiol.* 156, 545– 551.
- Resende, A.G., Vidigal Filho, P.S. and Machado, M.F.P.S., 2000. Isozyme diversity in cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). *Biochem. Genet.* 38(7/8):203-216.
- SCANDALIOS, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, v.101, p.7-12,.
- Scandalios J G 1994. Regulation and properties of plant catalases. *In* Causes of Photo-oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. Eds C H Foyer and P M Mullineaux. pp 275– 316. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Schickler H and Caspi H., 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant.* 105, 39–44.
- Sehmer, L. & Dizengremel, P., 1998. Contribution to subcellular localization of superoxido dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. *Journal of Plant Physiology*.

- Shaw B P., 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. Biol. Plant. 37, 587–596.
- Siedlecka A and Krupa Z., 1999. Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. Photosynthetica 36, 321–331.
- Silva, R.M., 2000. Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz. ESALQ – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Tese de Doutorado.
- Skadsen, R.W.; Schuzelefert, P.; Herbst, J.M., 1995. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. Plant Molecular Biology, v.29, n.5, p.1005-1014,
- Somashekaraiah B V, Padmaja K and Prasad A R K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseoulus vulgaris*) – involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. Physiol. Plant. 85, 85–89.
- Stevens R G, Creissen G P and Mullineaux P M., 1997. Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. Plant Mol. Biol. 35, 641–654.
- Stroinski A, Kubis J and Zielezinska M., 1999. Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. Acta Physiol. Plant. 21, 201–207.
- Ushimaru, T., Ogawa, K., Ishida, N., Shibasaka, M., Kanematsu, S., Asada, K., Tsuji, H., 1995. Planta 196:606-613.
- Van Assche F and Clijsters H 1990 Effects of metals on enzyme activity in plants. Plant Cell Environ. 13, 195–206.
- Verma S and Dubey R S 2001 Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. Biol. Plant. 44, 117– 123.

- Vietmeyer, N.D., 1979. Tropical legumes: Resources for the future. National Academy of Sciences, New York.
- Vitória A P, Lea P J And Azevedo R A 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57, 710-710,
- Vitória, A.P., 1994. Propriedades da asparaginase e determinação de compostos nitrogenados em algumas espécies do gênero *Crotalaria*. UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil, Tese de Mestrado.
- Voet, D.; Voet, J.G. 1995 *Biochemistry*. 2.ed. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore: Wiley,. 1361p.
- Willekens, H.; Chamnongpol, S.; Davey, M.; Schraudner, M.; Langebaertels, C.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C3 plants. *EMBO Journal*, v.16, n.16, p.4806-4816,
- Willekens H, Langebartels C, Tire D, Van Montagu M, Inzé D and Van Camp W 1994 Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 10450-10454.
- Wingsle, G.; Gardeström, P.; Hällgren, J.; Karpinski, S. 1991. Isolation, purification, and subcellular localization of isozymes of superoxide dismutase from scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Plant Physiology*, v.95, p.21-28,
- Woodbury W, Spencer A K and Stahmann M A 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Anal. Biochem.* 44, 301-305.