



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 2 • p 205-216

## ***Arabidopsis thaliana*: planta teste em estudos multidisciplinares**

A *Arabidopsis thaliana* é uma planta herbácea da família Brassicaceae e é nativa da Europa, Ásia e África tropical, apresentando uma grande distribuição a nível mundial. Esta planta possui um genoma relativamente pequeno quando comparado com o de outras plantas (apenas 5 pares de cromossomas) e um ciclo de vida curto, o que permite o acompanhamento de todas as fases do seu ciclo de vida e das gerações sucessoras, sendo também de fácil cultivo e manutenção em laboratório. Devido a estas características, *A. thaliana* foi a primeira planta a ter o genoma completamente sequenciado, sendo uma planta modelo em estudos genéticos. A fácil manipulação dos seus genes permite a produção de novas linhagens (mutantes), que podem apresentar diferentes sensibilidades quando expostas a factores de *stress* ambiental. Estes podem ser naturais (variação na temperatura, humidade, luminosidade, entre outros) e/ou antropogénicos (compostos químicos, como os pesticidas e metais pesados). Exemplares de plantas selvagens, assim como os seus mutantes produzidos em laboratório, têm sido utilizados em ensaios ecotoxicológicos com o intuito de avaliar a influência directa dos factores de *stress* ambiental na germinação, crescimento e biomassa das plantas.

### **Palavras-chave**

*Arabidopsis thaliana*  
linhagens mutantes  
stress ambiental  
ensaios ecotoxicológicos

Darlan Q Brito\*

Vanessa Menezes-Oliveira

Mónica JB Amorim

Amadeu MVM Soares

Susana Loureiro

CESAM e Departamento de Biologia da  
Universidade de Aveiro

\*darlan@ua.pt

## INTRODUÇÃO

A *Arabidopsis thaliana* é uma espécie vegetal muito utilizada para avaliar os efeitos de agentes ambientais de stress, bem como de compostos antropogênicos tóxicos, nos seus diferentes níveis de organização biológica (Heim *et al.*, 1989; Krizek *et al.*, 2003; Drazkiewicz *et al.*, 2004). Esta planta pertence à família Brassicaceae e possui uma distribuição alargada na Europa, Ásia e América do Norte (Hoffmann, 2002). Devido à sua vasta distribuição, esta espécie apresenta uma quantidade elevada de ecótipos, destacando-se os ecótipos Columbia e Landsberg pela sua utilização em ensaios laboratoriais (Meinke *et al.*, 1998). Apesar da sua proximidade com outras espécies, como o nabo, repolho, couve e brócolos, *A. thaliana* não tem importância alimentar. No entanto, devido às suas características genéticas e morfo-fisiológicas há mais de 40 anos que é objecto de diversos trabalhos na área da biologia molecular, genética, bioquímica e fisiologia (Meyerowitz *et al.*, 1994).

O ciclo de vida completo de *A. thaliana* (germinação, desenvolvimento, floração, maturação de sementes e senescência) corresponde a aproximadamente 42 dias. As plantas desenvolvem-se em forma de roseta, cujo tamanho varia de 2 a 10 cm de diâmetro. Por sua vez, os caules podem chegar a 20 cm de altura conforme as condições de crescimento. As plantas podem produzir centenas de frutos (do tipo síliqua) e

cerca de 5.000 sementes (Meinke *et al.*, 1998) (Figura 1). As folhas de *Arabidopsis* possuem tricomas e as raízes são axiais, não possuindo relações simbióticas com bactérias. As flores têm cerca de 2 mm de tamanho, são compostas por quatro sépalas verdes no verticilo externo, quatro pétalas brancas e seis estames. A sua reprodução é rápida e do tipo autogâmica (Meinke *et al.*, 1998).

*A. thaliana* foi o primeiro organismo vegetal e o terceiro organismo multicelular a possuir o genoma completamente sequenciado, no final de 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Os dois primeiros foram o nemátodo *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (Adams *et al.*, 2000).



FIGURA 1: À esquerda, uma planta madura de *A. thaliana* cultivada em condições ideais. À direita, de cima para baixo: inflorescência com flores brancas, fruto do tipo síliqua e as folhas maduras em formato de roseta na região basal.

O número de trabalhos publicados usando *A. thaliana* como modelo biológico é bastante elevado e aumentou consideravelmente após o sequenciamento do seu genoma. Segundo a base de dados *Web of Science* (01/08/2009), foram publicados cerca de 35 mil trabalhos tendo *A. thaliana* como objecto de estudo, 76% dos quais no período entre 2000-2009.

Neste artigo apresentam-se alguns dos diversos usos de *A. thaliana* como organismo modelo e a sua aplicabilidade na Ecotoxicologia, recorrendo a técnicas e metodologias frequentemente utilizadas nestas áreas.



## ARABIDOPSIS THALIANA COMO ORGANISMO MODELO EM ESTUDOS GENÉTICOS

Os organismos utilizados como modelo em estudos científicos devem possuir determinadas características que os tornem eficazes para a avaliação das respostas pretendidas. Uma das vantagens do uso de *Arabidopsis* em bioensaios é o seu pequeno porte quando comparado com outras plantas. Essa característica possibilita o seu cultivo em placas de Petri e a obtenção de um grande número de plantas, ao mesmo tempo e em espaços reduzidos de laboratório (Meinke, 1998). *A. thaliana* possui um genoma relativamente pequeno, com 5 cromossomas, 20 mil genes e aproximadamente 146 milhões de pares de base; cerca de 85% do genoma é constituído por genes “codificantes”, ou seja, composto por sequências de ADN que podem ser traduzidas (Bevan e Walsh, 2006). A densidade genética em *A. thaliana* é superior à de outras espécies, como p.e. *Oriza sativa* (arroz) e *Zea mays* (milho). Um genoma com uma maior quantidade de sequências codificadas permite, mais rapidamente, a compreensão das funções codificadas por cada um dos genes. Por exemplo, a espécie *Triticum aestivum*, vulgo trigo, possui um genoma 130 vezes maior do que o de *A. Thaliana*, no entanto menos de 1% das suas sequências são codificantes (Devos e Gale, 2000), o que é uma clara desvantagem.

Apesar de todas as características e vantagens descritas acima acerca do uso de *Arabidopsis* em estudos genéticos, um dos factores decisivos para a sua utilização como espécie modelo prende-se com a eficiência na sua transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*<sup>1</sup> (Labra et al., 2004). Desde então, milhares de inserções de T-DNA (DNA transformados) foram sequenciadas e foram identificadas as mutações que interferem na gametogénese, na formação de sementes, nas folhas e desenvolvimento de raízes, na floração, na senescência, na transdução de sinais metabólicos, nas respostas a hormonas e em muitos processos celulares e fisiológicos (Meyerowitz e Somerville, 1994). Este tipo de manipulações reforça as grandes potencialidades da aplicação de *A. thaliana* em estudos de investigação científica, sendo os efeitos ao nível genético os mais analisados (Krizek et al., 2003; Lee et al., 2005).

---

<sup>1</sup> O sistema de infecção da *A. tumefaciens* representa a inserção de um elemento genético com informações complexas que permite a transferência de genes de um organismo procarionte para um eucarionte. A transferência e a integração do T-DNA são determinadas por vários genes localizados no cromossoma bacteriano pelo conjunto de genes de virulência.



## A UTILIZAÇÃO DE *ARABIDOPSIS THALIANA* EM ECOTOXICOLOGIA<sup>2</sup>

Existem diversos mecanismos responsáveis pela introdução, transporte e transformação das substâncias químicas na atmosfera, litosfera, hidrosfera e na biosfera. A volatilização é um dos processos que conduz ao transporte de substâncias perniciosas para a atmosfera, as quais, posteriormente se movimentam para os ecossistemas aquáticos e terrestres, comprometendo assim a saúde e equilíbrio destes ecossistemas.

A utilização de plantas na avaliação do efeito de compostos químicos no ambiente terrestre é de grande importância, tanto do ponto de vista ecológico quanto do da saúde humana. As plantas são produtores primários, pelo que constituem alimento não só para os seres humanos, mas também para inúmeros seres vivos que habitam ambientes terrestres e/ou aquáticos.

Apesar de não ser considerada uma planta modelo em ecotoxicologia, principalmente por possuir um ciclo de vida relativamente longo para a realização dos bioensaios (Kalsch et al., 2006), *A. thaliana* tem sido amplamente utilizada para a avaliação dos efeitos de compostos tóxicos, por ser uma planta “modelo” em estudos genéticos. Portanto, muitos dos estudos realizados em *A. thaliana* combinam ecotoxicologia e genética, avaliando normalmente a função gênica em processos vitais do metabolismo das plantas expostas a compostos tóxicos (Teixeira et al., 2007; Guo et al., 2008; Besson-Bard et al., 2009)

Para além de *Arabidopsis* existem outras espécies de plantas que também são muito utilizadas em ensaios ecotoxicológicos e que, por sua vez, são consideradas modelos nos protocolos padronizados. Os organismos modelo devem ser representativos do ecossistema em estudo, ou seja, serem abundantes e desempenharem um papel importante na manutenção do equilíbrio desses ecossistemas. Além disso, devem ter um tamanho reduzido, ciclo de vida curto, ser de fácil manipulação e cultivo em laboratório, apresentar estabilidade genética e sensibilidade aos vários tipos de compostos tóxicos (Soares, 2007).

Alguns exemplos de espécies vegetais normalmente usadas como modelos em estudos de ecotoxicologia são o milho (*Zea mays* L.), a alface (*Lactuca sativa* L.), o trigo (*Triticum aestivum*), o nabo (*Brassica rapa* L.), a cevada (*Hordeum vulgare* L.), o arroz (*Oryza sativa* L.), aveia (*Avena sativa* L.) (ISO, 1995). Outros exemplos de organismos modelo com aplicação recomendada em diversos estudos são:

- a bactéria *Escherichia coli*, que foi o primeiro modelo utilizado em biologia molecular (Riley e Labedan, 1997);
- o fungo *Saccharomyces cerevisiae*, que é estudado devido à facilidade de manuseamento e rapidez de crescimento (Sutherland et al., 2001);
- a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, que é igualmente muito utilizada como um modelo genético (Adams et al., 2000);
- o nemátodo *Caenorhabditis elegans*, que possui padrões de desenvolvimento definidos e pode ser facilmente estudado quanto à presença de anormalidades sendo, portanto, um modelo em estudos de biologia do desenvolvimento;

<sup>2</sup> O termo ecotoxicologia deriva das palavras ecologia (estudo dos ecossistemas) e toxicologia (estudo dos efeitos das substâncias químicas nos seres humanos), e foi introduzido por René Truhaut em 1969, e está relacionado com o estudo dos efeitos tóxicos de substâncias químicas e de agentes físicos em organismos vivos, geralmente em populações e comunidades de ecossistemas definidos (Arapis, 2004; Fericola et al., 2004).

- o peixe-zebra *Danio rerio*, como modelo consolidado na área de genética e neurociências (Keller e Murtha, 2004) e, mais recentemente, usado também em estudos de cariz ambiental / ecotoxicológico (Grisolia e tal, 2009);
- o crustáceo *Daphnia magna*, como modelo da ecotoxicologia aquática (Baird e tal, 1989);
- o colêmbolo *Folsomia candida*, como um dos modelos utilizados em ecotoxicologia terrestre (Amorim et al, 2005).



## METODOLOGIAS DIVERSAS

Com o intuito de conhecer e avaliar os diversos efeitos causados por substâncias tóxicas em plantas, têm vindo a ser efectuados vários estudos utilizando diferentes níveis de organização biológica. As metodologias mais utilizadas neste tipo de avaliação incluem estudos ao nível sub-celular, com biomarcadores, ao nível do ADN, com a técnica dos cometas ou de *microarrays* de ADN, ou ainda a níveis fenotípicos e/ou fisiológicos, testando-se a capacidade de emergência e crescimento das plantas.

### ● Biomarcadores

Os biomarcadores eram inicialmente utilizados com a finalidade de avaliar alterações funcionais, expressas a níveis de organização inferiores aos do organismo e induzidas por determinados poluentes (NRC, 1987). Essa definição foi modificada várias vezes. Actualmente, autores como (vanGestel e vanBrummelen, 1996) consideram os biomarcadores como sendo respostas biológicas a ambientes químicos ao nível sub-celular, as quais podem ser medidas nos organismos ou em partes destes.

Os níveis tóxicos de metais pesados afectam uma variedade de processos metabólicos das plantas (Siedlecka et al., 2001). O período inicial de exposição ao *stress* determina, frequentemente, uma série de alterações no organismo. Uma das principais consequências dessa acção consiste na produção de compostos reactivos de oxigénio (CRO), que normalmente danificam os componentes celulares como as membranas, os lípidos, as proteínas e os ácidos nucleicos, causando peroxidação lipídica<sup>3</sup>, desnaturação proteica<sup>4</sup> e mutações no ADN (Bowler et al., 1992; Scandalios, 1993; Alscher et al., 1997; Fang e Kao, 2000). Para evitar danos deste tipo, as células vegetais possuem sistemas antioxidantes. Um desses sistemas é formado pelas enzimas que reagem com os CRO: a superóxido-dismutase (SOD), enzima que catalisa a reacção de dois aniões superóxidos formando um peróxido, menos reactivo e que é degradado pelas enzimas catalase ou peroxidase; a catalase (CAT), uma hemoproteína (possui o grupo heme) altamente específica que transforma o peróxido de hidrogénio em água; as peroxidases (POXs), grupo de enzimas oxi-redutases que oxidam os substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogénio como molécula aceitadora de electrões; o acetato de tocoferol (Vitamina E), que captura o radical livre, hidroxila na membrana celular, impedindo a peroxidação dos ácidos gordos das membranas celulares. Ao libertar um H<sup>+</sup>, que neutraliza o radical livre, gera  $\alpha$ -tocoferil; o ascorbato (Vitamina C), que liberta um electrão que é capturado pelo radical  $\alpha$ -tocoferil, transformando-se em acetato de tocoferol. Assim, a vitamina C recicla a

<sup>3</sup> A peroxidação de lípidos ocorre quando o radical livre hidroxila capta um átomo de hidrogénio do ácido insaturado da membrana fosfolipídica e transforma-se em água. O ácido graxo, em presença de oxigénio, transforma-se em um radical livre e inicia uma reacção em cadeia que lesiona a membrana celular.

<sup>4</sup> Desnaturação proteica é a alteração da forma tridimensional de uma proteína. Esse processo resulta na perda da função da proteína, podendo-se ser reversível ou irreversível. O calor, o Ph e os compostos químicos são os agentes reponsáveis por esse processo

vitamina E, prevenindo o ataque de radicais livres. Outro sistema que regenera os antioxidantes oxidados inclui a glutatona, que actua directa ou indirectamente em muitos processos biológicos importantes (síntese de proteínas, metabolismo e protecção celular); a glutatona-redutase (GR), responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH), que é um importante antioxidante celular; as desidroascorbato-redutases (DHAR) e as mono-desidroascorbato-redutases (MDHAR) que actuam na remoção do peróxido de hidrogénio através de um conjunto de reacções associadas a outras enzimas (Smirnov, 1993).

Estudos com *A. thaliana* verificaram que após exposição a um défice hídrico, a radiação UV-B, ozono, dióxido de enxofre (Kubo et al., 1999) e a cobre (Drazkiewicz et al., 2004), a actividade das peroxidases foi estimulada. Desta forma, a elevada actividade das peroxidases é uma resposta comum de *A. thaliana* a diferentes factores de *stress*.

Drazkiewicz (2004) verificou a ocorrência de bioacumulação de cobre em *A. thaliana* quando exposta durante 7 dias a concentrações entre 150µM e 300 µM, tendo observado uma acentuada redução da biomassa da parte aérea das plantas. Após um período de exposição de 14 dias, Wójcik e Tukiendorf (2003) notaram uma maior bioacumulação de cobre nas raízes quando comparada com a acumulação quantificada na parte aérea, sendo este resultado acompanhado por uma diminuição do tamanho da raiz e alterações na ultra-estrutura dos cloroplastos de *A. thaliana*. Além disso, as enzimas antioxidantes SOD e POX foram activadas pelo cobre, enquanto a actividade da catalase foi inibida nas folhas de *A. thaliana*.

#### ● Microarrays de ADN

Os *Microarrays* de ADN consistem num arranjo de moléculas de ADN (fragmentos de ADN genómico, cADNs ou oligonucleotídeos) quimicamente ligadas a uma superfície sólida (como, por exemplo, lâminas de vidro) revestida com compostos que conferem carga positiva. São utilizadas para detectar e quantificar diferenças na expressão de ácidos nucleicos, após hibridização de amostras biológicas, controlo versus exposto, nos *microarrays* (Figura 2). Quando um organismo é exposto a poluentes, podem ocorrer alterações ao nível da expressão dos seus genes (transcrição – formação de mais ou menos ácidos nucleicos, i.e. ARNm), que são detectadas através do processo de hibridização com o ADN fixado no *microarray*, podendo concluir-se se os organismos foram ou não afectados pela exposição. Para mais detalhes a respeito da técnica descrita ver Pereira e Gonçalves (2009).

O uso de *microarrays* de ADN também permite a identificação de alterações nas vias metabólicas activadas ou desactivadas durante o processo de transcrição e síntese proteica, em resposta aos factores de *stress* a que um sistema biológico é exposto. Neste sentido, esta técnica tem possibilitado avanços na obtenção de estratégias que visem o aumento da tolerância às condições de *stress* ambiental. Os genes identificados que tenham influência em mecanismos de tolerância têm demonstrado grande potencial para serem aplicados nos processos de obtenção de plantas mutantes.

No estudo de Magrini et al. (2008) foram avaliados os efeitos causados na expressão genética de *A. thaliana* exposta a solo contaminado com diversas substâncias, entre as quais metais pesados e benzeno. A contaminação afectou as plantas em termos fenotípicos e de expressão genética. De um modo geral, plantas expostas a solo com níveis elevados de contaminantes apresentaram cloroses (diminuição de clorofila) e cresceram menos do que as plantas cultivadas em condições controlo. As plantas que cresceram sob concentrações elevadas de cobre revelaram taxas de crescimento menores e a expressão

genética relacionada com diversos grupos funcionais aumentou. As plantas cultivadas em solo com níveis elevados de chumbo evidenciaram uma reduzida expressão de genes relacionados com o Fotosistema II (complexo proteico envolvido no processo de fotossíntese), metabolismo, transporte celular e síntese proteica. Entre os *microarrays* de ADN analisados, a expressão genética incidiu essencialmente sobre os genes associados ao Fotosistema I, ao *stress* oxidativo, a condições de falta de água, a choque térmico proteico e ao catabolismo de toxinas. Neste estudo, os autores concluíram que os *microarrays* de ADN em organismos modelo como *A. thaliana* são ferramentas de avaliação eficazes na determinação de substâncias tóxicas através da determinação dos seus modos de acção na expressão genética.

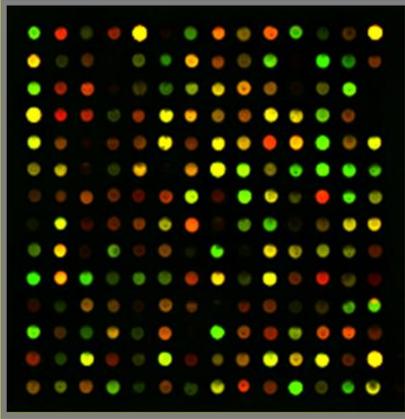


FIGURA 2: Imagem de visualização digital (obtida através de emissão de fluorescência) de um *microarray* após o processo de hibridização com a amostra de ARN marcada. Fonte: (<http://www.imbb.forth.gr>). As mudanças nos níveis de expressão genética são induzidas pelo agente tóxico e são semi-quantificáveis por comparação com os níveis de expressão controlo (amarelos), podendo estar a ser sobre-expressas (vermelhos) ou sub-expressas (verdes).

As previsões climáticas para as próximas décadas indicam um aumento da temperatura global, o aumento de épocas de seca e tempestades em várias regiões (Houghton et al., 2001). Neste contexto, o conhecimento dos mecanismos de tolerância a condições extremas em espécies vegetais, através do estudo de genomas funcionais e proteomas<sup>5</sup>, fornecem informações para o desenvolvimento de genótipos capazes de tolerar períodos de défice hídrico. A planta *A. thaliana* tem sido usada para o estudo da tolerância ao défice hídrico (Kasuga et al., 1999). Um dos avanços relacionados com esse *stress* prende-se com o estudo das proteínas DREB (*Dehydration-Responsive Element Binding* ou Proteína de Resposta à Desidratação Celular) que aderem a sequências de ADN presentes em regiões promotoras de genes expressos durante a desidratação (Kasuga et al., 1999). A DREB mostrou um papel importante na regulação da expressão de genes em resposta ao *stress* hídrico e a temperaturas baixas. Os genes DREB têm sido inseridos em plantas de soja e trigo, com o objectivo de obter plantas mais tolerantes a deficit hídrico. O gene DREB foi patenteado pelo Jircas (*Japan International Research Center for Agricultural Sciences*), e codifica a proteína que acciona os genes de defesa das estruturas celulares da planta. Liu et al. (1998) observaram o efeito dos *DREBs* que super-expressaram esse gene em *A. thaliana*. Estes autores observaram que a planta mutante apresentou maior sobrevivência em condição de seca e temperatura baixa em relação à planta controlo. Verificaram também que a temperaturas baixas, a taxa de sobrevivência das plantas geneticamente modificadas foi quase de 84%, enquanto a linhagem selvagem apresentou uma taxa de mortalidade de 100%.

<sup>5</sup> O estudo do genoma envolve o sequenciamento do conjunto de genes de um organismo ou parte dele. Para o estudo do genoma funcional tem-se: a transcriptômica que se baseia na avaliação da expressão genica e a proteômica que se refere ao conjunto de todas as proteínas expressas por um genoma.

● Ensaio do Cometa “Comet assay”

O ensaio do Cometa é uma técnica para avaliar os efeitos tóxicos causados nos organismos, ao nível do ADN. Sucintamente, esta técnica é utilizada para quantificar os danos causados no ADN de células individuais, através de técnicas de eletroforese<sup>6</sup> aplicadas a uma suspensão celular. A designação de “Cometa” provém da forma que os fragmentos de ADN celular adquirem aquando da eletroforese, muito semelhante a um “cometa com cauda” (Figura 3). O tamanho da cauda de cometa reflecte a extensão das rupturas das hélices de ADN, e pode ser quantificado por métodos de intensificação de imagem e análise computacional. Uma revisão de trabalhos que utilizam esta metodologia pode ser vista em Cotellet e Ferard (1999).

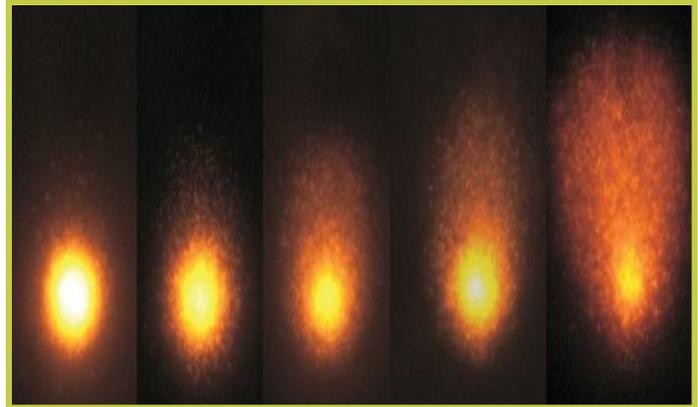


FIGURA 3: Observação de diferentes estágios de fragmentos de ADN celular obtidos no processo de eletroforese. Da esquerda para a direita: o primeiro núcleo mostra-se não fragmentado (Estágio 0 - controlo) e o último possui o maior grau de fragmentação do ADN (Estágio 4). Fonte: <http://www.egms.de>

Com o intuito de avaliar a citotoxicidade e o efeito dos metais ao nível do ADN, Shaoshan et al. (2008) expuseram protoplastos (região

interna das células, constituída pelo citoplasma e núcleo) de folhas de *A. thaliana* com 4 semanas de idade a três diferentes metais pesados: zinco, cobre e cádmio. Estes autores observaram uma dependência da taxa de sobrevivência das células relativamente à dose de contaminante utilizada e ao tempo de exposição considerado. O zinco induziu um menor declínio da taxa de sobrevivência das células quando comparado com os dois outros metais. Foram quantificados danos no ADN das células das plantas e observou-se que a formação de cometas foi induzida pelos metais nas concentrações entre 0,1 e 0,8 mmol L<sup>-1</sup>. O dano no ADN foi significativamente reforçado pelo aumento das concentrações de metais. Para as mesmas concentrações de zinco, os metais cádmio e cobre apresentaram danos mais severos no ADN das células. Esses resultados permitiram concluir que os metais cobre e cádmio são mais citotóxicos e genotóxicos do que o zinco e que o método do cometa é uma ferramenta rápida e eficiente para detecção de genotoxicidade de metais pesados.

● Ensaio ecotoxicológicos para avaliação de parâmetros fenotípicos e/ou fisiológicos das plantas.

Os ensaios utilizados para a avaliação de *stressores* em plantas são baseados no protocolo ISO 11269-2 (1995), onde as sementes são expostas a uma gama de concentrações de um determinado composto químico sob condições óptimas de cultivo. Após avaliar a capacidade de germinação, no final do período de exposição (que poderá englobar o ciclo de vida completo da planta) podem ser avaliados e comparados parâmetros como o comprimento, peso fresco e peso seco da parte aérea e raízes, bem como aspectos gerais, e.g. coloração e rigidez da planta. Detalhes sobre a montagem inicial de uma experiência podem ser observado na Figura 4.

Num estudo realizado por Labidi et al. (2004) foram observados os efeitos da salinidade no crescimento das rosetas, na produção de sementes e na viabilidade das sementes de *A. thaliana*. Foram avaliados cinco ecótipos e observadas diferentes respostas nos factores que condicionam a reprodução das plantas. As sementes de *Arabidopsis* foram germinadas numa mistura de areia e turfa com meio nutritivo; após o

aparecimento do eixo de inflorescência foi adicionada uma solução 35mM de cloreto de sódio (NaCl). Ao longo da experiência foram avaliados alguns parâmetros morfológicos e as sementes provenientes dessas plantas foram colocadas a germinar em meio controlo, com o intuito de observar a viabilidade e a germinação das mesmas. Os ecótipos onde foram encontradas maiores concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  nas vagens deram origem a sementes menos viáveis quando comparadas com o controlo. Os autores concluíram que a acumulação dos sais nas plantas afecta a maturação das sementes geradas e que há uma variabilidade natural no controlo do transporte de iões nos frutos de *Arabidopsis*.

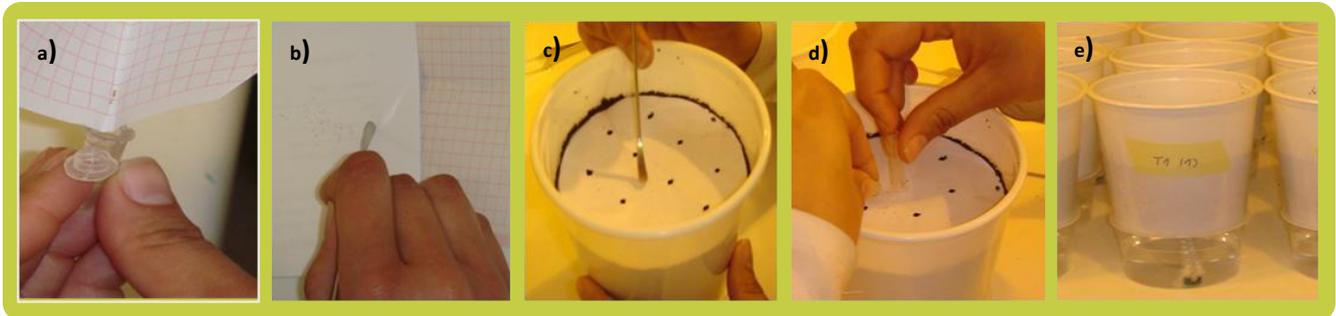


FIGURA 4: Detalhe do procedimento experimental no início do teste. a) e b) separação das sementes, c) e d) distribuição das sementes de *A. thaliana* nos vasos de teste e e) demonstração de como a quantidade de água no solo é mantida constante no decorrer do testes (Menezes-Oliveira et al., 2008)

Menezes-Oliveira et al. (2008) utilizaram *A. thaliana* geneticamente modificada na avaliação da toxicidade do chumbo, onde os mutantes utilizados possuíam diversas perdas de função no transporte de membrana e alterações em genes relacionados com a capacidade de resposta ao *stress*. Este estudo tinha como objectivo investigar o papel desses genes na destoxificação do chumbo em *A. thaliana*. Os resultados obtidos nesse trabalho (Figuras 5 e 6) demonstraram que tanto as plantas mutantes quanto as plantas selvagens foram afectadas pelo chumbo e que em concentrações mais elevadas houve um efeito nos parâmetros avaliados (emergência / crescimento / biomassa) quando comparadas com as plantas cultivadas em condições controlo.

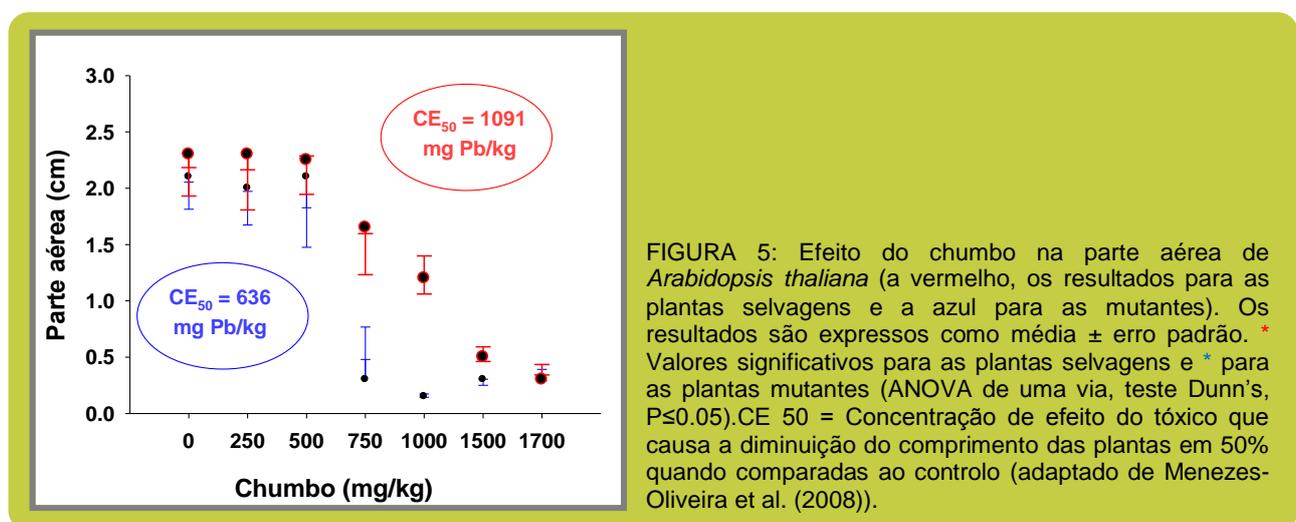


FIGURA 5: Efeito do chumbo na parte aérea de *Arabidopsis thaliana* (a vermelho, os resultados para as plantas selvagens e a azul para as mutantes). Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. \* Valores significativos para as plantas selvagens e \* para as plantas mutantes (ANOVA de uma via, teste Dunn's,  $P \leq 0.05$ ). CE 50 = Concentração de efeito do tóxico que causa a diminuição do comprimento das plantas em 50% quando comparadas ao controlo (adaptado de Menezes-Oliveira et al. (2008)).

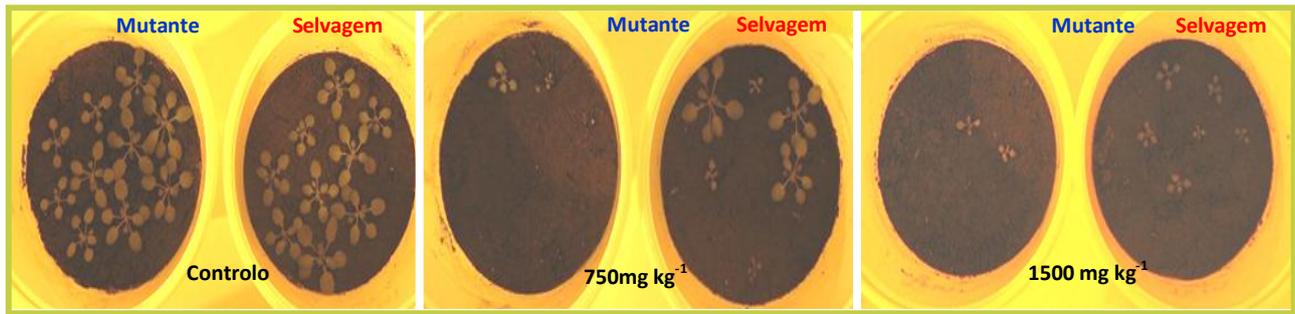


FIGURA 6: Efeito do chumbo na emergência de sementes de *Arabidopsis thaliana* ao fim de 21 dias de exposição (Menezes-Oliveira et al. (2008)).

As plantas mutantes, por sua vez, foram significativamente mais sensíveis ao chumbo do que as plantas selvagens. Logo, os autores concluíram que os genes que foram alterados e utilizados neste estudo podem desempenhar um papel importante nos processos de desintoxicação do chumbo em *A. thaliana*.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como se tentou demonstrar, *A. thaliana* tem sido utilizada em diversas áreas científicas. A utilização desta espécie tem contribuído para entender os efeitos de *stressores* em plantas, sejam eles provenientes de actividades humanas ou naturais. Os estudos realizados com *Arabidopsis* apresentam grande reprodutibilidade, uma vez que tem havido coerência entre os resultados apresentados nas últimas décadas, e ainda uma elevada relevância ecológica tendo em conta os diferentes ecótipos utilizados. Acresce que a *Arabidopsis* pertence a uma família de plantas cuja maioria é utilizada na dieta alimentar humana.

Logo, ainda que *Arabidopsis* não seja considerada como um organismo de referência em ensaios ecotoxicológicos, a sua utilização centra-se essencialmente no estudo das respostas de exposição a compostos químicos de plantas geneticamente modificadas. A compreensão dos efeitos tóxicos ao nível molecular tem permitido, além da descoberta da função de cada um dos genes e das interações com os processos fisiológicos, a obtenção de linhagens adaptativas e/ou resistentes a condições de *stress* ambiental (variações na temperatura, défice hídrico, aumento da salinidade, presença de metais pesados) (Menezes-Oliveira *et al.*, 2008). Tendo em conta o actual contexto mundial e considerando as previsões de alterações climáticas acentuadas nas próximas décadas, estudos na área de Ecotoxicogenómica (interacção entre a Ecotoxicologia e a Genómica) irão contribuir para um importante avanço na avaliação e interacção de contaminantes e *stressores* naturais no ambiente, permitindo avaliar em *Arabidopsis thaliana* alterações ao nível do genoma que sejam resultantes destas interações ou combinações de *stressores*.

**agradecimentos** • Os autores agradecem à Dr. Paula Duque, do Instituto Gulbenkian da Ciência, as sementes de *Arabidopsis thaliana* utilizadas numa das experiências apresentadas neste artigo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams MD et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 5461, 2185-2195.
- Amorim MJB, Römbke J, Scheffczyk A, Nogueira AJA e Soares AMVM (2005). Effects of different soil types on the Collembolans *Folsomia candida* and *Hypogastrura assimilis* using the herbicide Phenmedipham. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49(3): 343-352.
- Arapis GD (2004). From molecule to ecosystems: ecotoxicological approaches and perspectives. In: GD Arapis, N Goncharova, P Baveye (eds.), *Ecotoxicology, Ecological Risk Assessment and Multiple Stressors*, Springer, The Netherlands.
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100: 224–233.
- Baird DJ, Barber I, Bradley M, Calow P & Soares AMVM (1989). The *Daphnia* bioassay: a critique. In: M Munawar, G Dixon, CI Mayfield, T Reynoldson, MH Sadar (eds.), *Hydrobiologia* 188/189: 403-406, *Environmental Bioassay Techniques and their Application*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D (2009). Nitric Oxide Contributes to Cadmium Toxicity in Arabidopsis by Promoting Cadmium Accumulation in Roots and by Up-Regulating Genes Related to Iron Uptake. *Plant Physiology* 149: 1302-1315.
- Bevan M, Walsh S (2006). The *Arabidopsis* genome: a foundation for plant research. *Genome Research* 12, 15: 1632-1642.
- Bowler Ch, Van Montagu M, Inzé D (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83–116.
- Cotelle S, Ferard JF (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 34: 246-255.
- Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* 17: 379-387.
- Devos KM, Gale MD (2000). Genome relationships: The grass model incurrent research. *The Plant Cell* 5: 12:637–646.
- Fang W-Ch, Kao Ch H (2000). Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science* 158: 71–76.
- Fernicola AGG, Bohrer-Morel MBC, Bainy CD (2004). Ecotoxicologia. In: FA Azevedo, AAM Chasin (eds.), *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*, Intertox RiMa São Paulo.
- Grisolia CK, Oliveira R, Domingues I, Oliveira-Filho EC, Monerat RG, Soares AMVM (2009). Genotoxic evaluation of different  $\delta$ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* on zebrafish adults and development in early life stages. *Mutation Research* 672(2): 119-123.
- Guo J, Dai X, Xu W, Ma M (2008). Overexpressing GSH1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere* 72: 1020-1026.
- Heim DR, Roberts JL, Pike PD, Larrinua IM (1989). Mutation of a Locus of *Arabidopsis thaliana* confers resistance to the herbicide Isoben. *Plant Physiology* 90: 146-150.
- Hoffmann MH (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana*. (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal Biogeography* 4 29: 125–34.
- Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Nogue M, van der Lindern PJ, Xiaosu D (2001). *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, 785pp.
- ISO\_11269-2 (1995). Soil Quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants.
- Kalsch W, Junker T, Rombke J (2006). A chronic plant test for the assessment of contaminated soils part 1: Method development. *Journal of Soils and Sediments* 6: 37-45.
- Keller ET, Murtha JM (2004). The use of mature zebra fish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 138:335-341.
- Krizek BA, Prost V, Joshi RM, Stoming T, Glenn TC (2003). Developing transgenic Arabidopsis plants to be metal-specific bioindicators. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 175-181.
- Kasuga M, Liu K, Miura S, Yamaguchi-Shinozaku K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291.

- Kubo A, Aono M, Nakajima N, Saji H, Tanaka K, Kondo N (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 112: 279–290.
- Labidi N, Lachaal M, Soltani A, Grignon C, Hajji M (2004). Variability of the effects of salinity on reproductive capacity of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Nutrition* 27: 1561-1573.
- Labra M, Vannini C, Grassi F, Bracale M, Balsemin M, Basso B, Sala F (2004). Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1512-1518.
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 138: 827-836.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 1391–1406.
- Magrini KD, Basu A, Spotila JR, Avery HW, Bergman LW, Hammond R, Anandan S (2008). DNA Microarrays detect effects of soil contamination on *Arabidopsis thaliana* gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 2476-2487.
- Menezes-Oliveira et al. (2008). Soil ecotoxicity of a veterinary pharmaceutical used in the poultry industry (Poster). 18th Annual Meeting of SETAC Europe, 25-29 Maio 2008, Varsóvia, Polónia.
- Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 662-682.
- Meyerowitz EM, Somerville CR (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- NRC (1987). Committee on Biological Markers of the National Research Council. Biological Markers in Environmental Health Research, Canada, 74, 3-9.
- Pereira JL & Gonçalves F (2009). A expressão genética como ferramenta de avaliação de impactos da poluição por pesticidas em ecossistemas aquáticos. *CAPTAR* 1(1): 40-53.
- Riley M, Labedan B (1997). Protein evolution viewed through *Escherichia coli* protein sequences: introducing the notion of a structural segment of homology, the module. *Journal of Molecular Biology* 268: 857-68.
- Scandalios JG (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7–12.
- Shaoshan (2008). Heavy metal induced DNA damage in plant measured by single cell gel electrophoresis. *Toxicology Letters* 180, Supplement 1. Page S200. Abstracts of the 45th Congress of the European Societies of Toxicology.
- Siedlecka A, Tukendorf A, Sk'orzyńska-Polit E, Maksymiec W, W'ojcik M, Baszy'nski, T, Krupa Z (2001). Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae). In: MNV Prasad (Ed.), *Metals in the Environment*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 171–215.
- Smirnov N (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27–58.
- Soares AMMV (2007). Texto de apoio. Princípios de Toxicologia e Ecotoxicologia. Parte 3. Critérios de seleção e espécies mais utilizadas em Ecotoxicologia aquática.
- Sutherland C et al. (2001). *Saccharomyces cerevisiae*- A model organism to investigate the mammalian AMP-activated protein kinase system. *Yeast* 18: 191-191.
- Teixeira MC, Duque P, Sa-Correia I (2007). Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends in Biotechnology* 25: 363-370.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. Elegans*: A platform for investigating Biology. *Science* 282: 2012-2046.
- vanGestel CA M, vanBrummelen TC (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5: 217-225.
- Wójcik M, Tukiendorf A (2003). Response of wild type of *Arabidopsis thaliana* to copper stress. *Biologia Plantarum* 46, 79–84.

FIGURA 2. Imagem digital da emissão de fluorescência num microarray. Disponível em:

<<http://www.egms.de/egms/servlet/figure?id=cto000003&figure=f1&vol=2004-3>> Acesso em: 05 Ago 2009.

FIGURA 3. Imagem do Comet Assay. Disponível em:

<<http://www.imbb.forth.gr/people/poirazi/researchEP.htm>> Acesso em: 05 Ago 2009.