



2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Testes de não-escolha em *Porcellio dilatatus* sujeitos a dieta folhas de *Alyssum* spp. com diferentes concentrações de Ni

Daniela Sofia Aguiar dos Santos

2013



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Testes de não-escolha em *Porcellio dilatatus*
sujeitos a dieta de folhas de *Alyssum* spp. com
diferentes concentrações de Ni

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor António Portugal (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra) e da Professora Doutora Maria Teresa Gonçalves (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra).

Daniela Sofia Aguiar dos Santos

2013

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado não teria sido possível sem ajuda, incentivos e importantes apoios que recebi e sem os quais a conclusão do presente trabalho teria sido impossível, e pelos quais sou sincera e imensamente grata.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Teresa Gonçalves e Professor Doutor António Portugal, pela competência científica, pelas sugestões, orientação e disponibilidade sem as quais este trabalho nunca poderia ser realizado. Obrigada pela disponibilidade e paciência que tiveram comigo ao longo de todo este tempo.

Ao Diretor do Conselho do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, Professor Doutor Carlos Palmeira, pelas facilidades concedidas no Departamento na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, do Laboratório de Biotecnologia e Cultura de Tecidos do Departamento de Ciências da Vida, FCTUC, pela disponibilidade de materiais e equipamento necessários à realização da cultura *in vitro*

À Dra. Lara Currais, pela disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, pela imprescindível ajuda e pela boa disposição e preocupação sempre demonstradas. À Dona Eulália pelo apoio laboratorial e ajuda prestada e pela sua disponibilidade.

À Escola Secundária Oliveira Júnior, em São João da Madeira, pela cedência do laboratório e material laboratorial, sem os quais a realização deste trabalho teria sido bastante mais difícil.

Aos meus amigos, pelo carinho e companheirismo, apoio e incentivo sempre demonstrados ao longo da realização deste trabalho. À Dra. Liliana Vilas Boas, pela ajuda e apoio laboratorial.

Ao Hélder, pela compreensão, presença e motivação incondicional.

Aos meus pais, final e especialmente, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo e paciência demonstrados, pela sua total ajuda na superação dos obstáculos que foram surgindo ao longo desta caminhada. Por serem o meu porto de abrigo.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO	iv
INTRODUÇÃO	1
1.1 - Defesas anti-herbivoria.....	2
1.2 - Hiperacumulação de metais	3
1.3 - Áreas serpentínicas ou ultramáficas	4
1.4 - Espécies hiperacumuladoras.....	6
1.4.1 - <i>Alyssum pintodasilvae</i> Dudley.....	8
1.5 - Espécies não-hiperacumuladoras	10
1.5.1 - <i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn	10
1.5.2 - <i>Alyssum simplex</i> Rudolphi	10
1.6 - Propagação <i>in vitro</i> : micropropagação	11
1.7 - <i>Porcellio dilatatus</i>	14
1.8 - Objetivo	17
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	18
2.1 - Colheita e Condicionamento das folhas	19
2.2 - Determinação da concentração de Níquel no material vegetal	19
2.3 – Obtenção de material <i>in vitro</i>	20
2.3.1 - Cultura <i>in vitro</i> de <i>Alyssum simplex</i>	20
2.3.2 - Cultura <i>in vitro</i> de <i>Alyssum pintodasilvae</i>	20
2.3.2.1 - Recolha e esterilização das sementes	21
2.3.2.2 - Preparação dos meios de cultura	21
2.3.2.3 - Germinação das sementes.....	23
2.3.2.4 - Estabelecimento das culturas e Propagação <i>in vitro</i>	23
2.3.2.5 - Aclimação das plantas obtidas <i>in vitro</i>	26
2.4 - Obtenção e manutenção de <i>Porcellio dilatatus</i>	26
2.5 – Acção da dieta de <i>Alyssum pintodasilvae</i> , <i>Alyssum simplex</i> e <i>Alnus glutinosa</i> em <i>Porcellio dilatatus</i>	26
RESULTADOS e DISCUSSÃO	29
3.1 - Determinação da concentração de Ni no material vegetal	30
3.2 – Obtenção de material <i>in vitro</i>	30
3.3 – Acção da dieta de <i>Alyssum pintodasilvae</i> , <i>Alyssum simplex</i> e <i>Alnus glutinosa</i> em <i>Porcellio dilatatus</i>	31
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ANEXOS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variâncias	N - azoto
C – controlo	Ni – níquel
Ca – cálcio	p – probabilidade
ca. – cerca de	P - fósforo
cm – centímetro	P(ds)i – Índice de Fagodepressão ou fagoestimulação
Co - cobalto	QFC – Quantidade de folhas consumidas
Cr - crómio	T – tratamento
F – F estatístico de ANOVA	Wgh – variação de peso dos isópodes
Fe - ferro	Zn – zinco
g - grama	°C – graus Celsius
H – H estatístico do teste de Kruskal-Wallis	µg – micrograma
K – potássio	% - percentagem
Mg - magnésio	α – nível de significância
mg – miligrama	< - menor que
ml – mililitro	> - maior que
mm – milímetro	
MS – meio de cultura de Murashige&Skoog, 1964	

RESUMO

A hiperacumulação de metais é um fenómeno que ocorre principalmente em solos ultramáficos ou serpentínicos, ricos em minerais ferromagnésicos e caracterizados por um pH de 6,5 – 8, predomínio de Mg em relação ao Ca e teores muito baixos de P, N e K. Em Portugal, este tipo de solo ocorre apenas em Trás-os-Montes, em diversos afloramentos de áreas reduzidas. *Alyssum pintodasilvae*, uma das espécies endémicas desses solos, é a única hiperacumuladora de Ni conhecida no país. *Alyssum simplex* é outra espécie endémica de solos serpentínicos, de distribuição mais reduzida e que não acumula Ni.

Para avaliar se a hiperacumulação de níquel em *A. pintodasilvae* constitui uma defesa elementar contra a herbívora, realizaram-se ensaios com *Porcellio dilatatus*, um isópode detritívoro representativo do nível trófico dos macrodecompositores. Os isópodes foram alimentados com folhas condicionadas das seguintes espécies: *A. pintodasilvae* (colhido no afloramento serpentínico de Alimonde, Bragança), *A. simplex* (colhido no afloramento serpentínico de Carrazedo, Bragança), *Alnus glutinosa* como controlo positivo e de *A. pintodasilvae* cultivado em laboratório sem Ni. Os isópodes foram alimentados durante 32 dias, sob condições controladas de humidade e temperatura.

Os resultados obtidos mostraram que *A. pintodasilvae* induziu elevada mortalidade dos isópodes relativamente às outras espécies de plantas utilizadas, principalmente *A. Pintodasilvae* in vitro e *Alnus glutinosa*. Estes resultados indicam que o Ni exerce um efeito tóxico nos isópodes detritívoros e, portanto, atua como defesa elementar em *A. pintodasilvae*.

Os resultados obtidos com *A. simplex* sugerem um efeito anti-herbivoria algo idêntico a *A. pintodasilvae*, uma vez que não foram detetadas diferenças significativas entre o efeito das duas espécies para os parâmetros avaliados. Os resultados sugerem a existência, em *A. Simplex*, de um mecanismo de defesa anti-herbivoria, como por exemplo compostos fenólicos ou glucosinolatos, que poderá não ser tão eficaz como a hiperacumulação de Ni em *A. pintodasilvae*.

SUMMARY

Metal hyperaccumulation is a phenomenon that occurs mainly in ultramafic and serpentine soils, rich in ferromagnesian minerals and characterized by pH 6.5 - 8, predominance of Mg towards Ca and very low levels of P, N and K. In Portugal, this soil type occurs only in Trás-os-Montes, in several outcrops of small areas. *Alyssum pintodasilvae*, one of the endemic species of these soils, is the only known hyperaccumulator of Ni in the country. *Alyssum simplex* is another species endemic to serpentine soil, with a lower distribution and does not accumulate Ni.

To assess whether the hyperaccumulation of nickel in *A. pintodasilvae* is an elemental defense against herbivores, assays were performed with *Porcellio dilatatus*, a scavenger isopod representative of the macrodecomposers trophic level. The isopods were fed conditioned leaves of the following species: *A. pintodasilvae* (collected in a serpentine outcrop of Alimonde, Bragança), *A. simplex* (collected in a serpentine outcrop of Carracedo, Bragança), *Alnus glutinosa* as a positive control and *A. pintodasilvae* grown in laboratory without Ni. The isopods were fed for 32 days under controlled conditions of humidity and temperature.

The results showed that *A. pintodasilvae* induced high mortality of isopods regarding to the other plants species used, primarily *A. pintodasilvae in vitro* and *Alnus glutinosa*. These results indicate that Ni has a toxic effect on isopods scavengers and thus acts as an elemental defense in *A. pintodasilvae*.

The results obtained with *A. simplex* suggest an anti-herbivory effect somehow identical to *A. pintodasilvae*, since no significant differences were detected between the effect of these two plant species in the accessed parameters. The results suggest the existence, in *A. Simplex*, of an anti-herbivory defense mechanism, such as glucosinolates and phenolic compounds, which may not be so effective as Ni hyperaccumulation in *A. pintodasilvae*.

INTRODUÇÃO

As espécies vegetais reflectem, em parte, a composição química dos solos onde crescem. Na natureza, observamos organismos vegetais que apresentam uma enorme variedade na sua composição elementar. Nas últimas décadas aumentou progressivamente o interesse em plantas que absorvem grandes quantidades de determinados elementos do solo para os seus tecidos (Boyd, 2009). Os casos mais extremos são as plantas hiperacumuladoras, sobre as quais tem vindo a aumentar significativamente o interesse na comunidade científica. Conhecer como os elementos se mobilizam na cadeia alimentar e os seus efeitos nos organismos é o tópico sobre o qual se dedica uma grande parte desta comunidade (Boyd, 2009).

1.1 - Defesas anti-herbivoria

As plantas são a base da vida na Terra; são os principais produtores primários nos ecossistemas terrestres. Fornecem alimento para a maioria dos seres vivos (sob as mais variadas formas), além de fornecerem energia química (resultante da fotossíntese) e oxigénio, essencial para a vida. A herbivoria tem forte influência na biodiversidade, produtividade e estabilidade dos ecossistemas, nos quais os consumidores primários (herbívoros, plantas parasitas, patogénios) são responsáveis pelo consumo de grande parte da matéria vegetal produzida. Estes consumidores primários constituem os “inimigos naturais” das plantas, facto que contribuiu para o desenvolvimento de características que reduzissem a suscetibilidade ao ataque dos predadores naturais (Boyd, 2007).

A capacidade das plantas terrestres em se moldarem a variadas condições abióticas permitiu que se adaptassem a ambientes extremamente rigorosos. Níveis tóxicos de metais pesados no solo são um dos potenciais stresses abióticos que as plantas podem enfrentar. A planta terrestre comum tem uma capacidade limitada para lidar com o excesso de metais, e geralmente os metais pesados são acumulados em vacúolos nas células da raiz, ficando assim afastados das partes aéreas da planta, não interferindo com o mecanismo da fotossíntese. No entanto, algumas plantas evoluíram em solos metalíferos, adaptando-se a este tipo de ambiente pouco comum (Milner&Kochian, 2008).

Herbivoria é um tipo de relação onde um animal se alimenta dos tecidos vegetais vivos. Os herbívoros são responsáveis por grandes impactos sobre as plantas, pois estas são seres imóveis e, à primeira vista, bastante indefesos ^[1].

As defesas das plantas contra os herbívoros podem ser classificadas como induzidas ou constitutivas. Defesas induzidas (metabolitos secundários [como a produção de toxinas], mudanças fisiológicas ou morfológicas) são sintetizadas ou mobilizadas para o local em que a planta sofre danos (Traw & Dawson, 2002). Defesas constitutivas estão sempre presentes na planta, independentemente de se verificar ou não consumo de parte da planta. As principais estratégias de defesas constitutivas de plantas contra herbívoros são o crescimento compensatório, as defesas associativas (com formigas, por exemplo) e a indução de defesas bióticas, como as defesas físicas (espinhos, pelos, etc.) e as defesas químicas (Boyd, 2007). Estas podem ser constituídas por compostos orgânicos sintetizados pelas próprias plantas (metabolitos secundários), como os fenóis e alcalóides^[2], ou por elementos absorvidos do solo, como os metais, processo conhecido por hiperacumulação. Uma vantagem das defesas do tipo induzido sobre as constitutivas é o aumento na variabilidade dentro do indivíduo, ou seja, em diferentes tecidos e em tecidos em diferentes estados de desenvolvimento as respostas induzidas vão ser diferentes e mais rápidas, e portanto os herbívoros tendem a não escolher estas plantas quando expostos aos fenótipos que manifestam estas defesas (Karban *et al*, 1997; Lohmann *et al*, 2009).

1.2 - Hiperacumulação de metais

“A tolerância a metais pesados nas plantas é provavelmente um exemplo de evolução mais poderoso que o melanismo industrial em borboletas.” (Antonovics *et al*, 1971).

O termo ‘hiperacumulação’ foi pela primeira vez utilizado por Brooks *et al*. (1977) para definir plantas com concentrações de níquel superiores a 1000µg/g DW (*dry weight*) nas suas partes aéreas (Baker&Brooks, 1989; Boyd&Moar, 1999). Desde então, tem sido utilizado para descrever plantas que acumulem concentrações excecionalmente elevadas de elementos, geralmente metais, nos tecidos dos órgãos aéreos sem exibirem sintomas de toxicidade, sendo um fenómeno bastante intrigante.

Várias hipóteses foram propostas para explicar o significado funcional da hiperacumulação nas plantas. Estas incluem alelopatia, através da acumulação de metais nas partes aéreas, como as folhas, que ao caírem enriquecem a superfície do solo com esses mesmos metais, inibindo o crescimento de outras plantas vizinhas não tolerantes aos metais pesados (Boyd & Martens, 1998; Brooks, 1998); resistência à seca pela redução da transpiração cuticular (Boyd & Martens, 1998; Seregin & Kozhevnikova,

2006); e defesa contra herbivoría ou patogénicos, pois as elevadas concentrações de metais pesados nos tecidos dérmicos das plantas evitam a entrada e a propagação de microorganismos patogénicos, e além disso, gastam menos azoto e carbono nos substratos orgânicos (taninos e compostos fenólicos) que protegem os tecidos contra os herbívoros (Davis *et al*, 2001; Seregin&Kozhevnikova, 2006). Nos últimos anos, cada vez mais evidências suportam a hipótese de defesa (Macnair *et al*, 2003; Freeman *et al*, 2006; Boyd, 2007), e distinguem este tipo de defesa química elementar da defesa química que ocorre através de químicos orgânicos (Martens & Boyd, 2004, Agrawal & Fishbein, 2006).

Na maioria das plantas, os metais acumulam-se na raiz, mas nas espécies hiperacumuladoras as concentrações de metais são superiores nas folhas. De acordo com Kramer (2010) este facto ocorre devido a alterações em certos processos: elevada taxa de transporte dos metais do simplasma radicular para o xilema apoplástico radicular, entrando assim no sistema de transpiração (Kramer *et al*, 1996; Lasat, 1998); sequestração de metais nas folhas, dentro de vacúolos nas células foliares (Kramer *et al*, 2000; Kupper *et al*, 2000; Ma *et al*, 2005). A mobilidade de metais direcionada para os sistemas vasculares é fortemente realçada devido à baixa sequestração dos metais nos vacúolos radiculares (Lasat, 1998). Nas folhas, o sistema de distribuição de metais célula a célula é mais eficiente (Kramer, 1997; Kupper, 2000) e portanto a acumulação de metais ao longo do xilema é evitada.

1.3 - Áreas serpentínicas ou ultramáficas

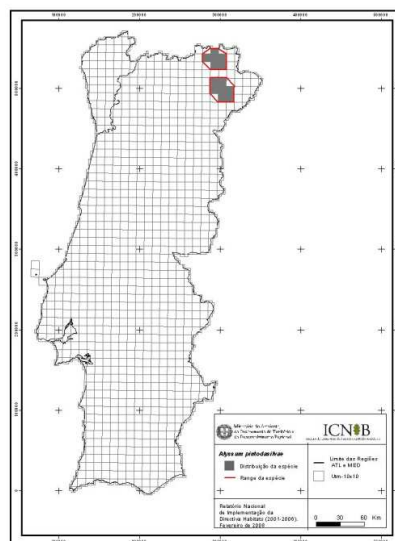
A hiperacumulação de metais é um fenómeno que ocorre principalmente em solos ultramáficos ou serpentínicos. Este tipo de solo existe em diferentes partes do mundo, cobrindo menos de 1% da superfície terrestre, e possui elevadas concentrações em magnésio (Mg), ferro (Fe), níquel (Ni), crómio (Cr) e cobalto (Co), e concentrações muito pequenas de silício (Si), cálcio (Ca), fósforo (P), azoto (N) e potássio (K) (Proctor, 1999; Gonçalves *et al*, 2007).

Os solos serpentínicos tendem a ser secos e pouco espessos, por vezes pedregosos, vulneráveis à erosão, e são ricos em minerais ferromagnésicos. Podem ser vermelhos, verdes, azuis ou pretos, dependendo da sua composição química. Têm um pH de 6,5 – 8 e o predomínio de Mg em relação ao Ca provoca importantes desequilíbrios nutricionais, o que coincide com os provocados pelos teores muito baixos de P, N e K.

Este stress ambiental é desfavorável para a maioria das plantas, o que leva a que a flora destes locais seja muito diferente da flora dos solos envolventes (Ghaderian *et al*, 2006). Os solos ultramáficos contêm uma quantidade de Ni relativamente elevada, potencialmente tóxica para as plantas. No entanto, eles suportam uma flora altamente especializada rica em endemismos e aparentemente adaptada a estas condições (García-Barriuso *et al*, 2012). Algumas espécies existentes nestes solos apresentam elevadas concentrações de Ni nos seus tecidos, muitas vezes excedendo as concentrações do solo (Meneses de Sequeira & Pinto da Silva, 1992; Brooks *et al*, 1998; V. de la Fuente *et al*, 2007).

Várias tentativas foram feitas para descrever o ‘síndrome serpentínico’, i.e. as múltiplas limitações deste tipo de solos. Foram descritas três características das comunidades serpentínicas: reduzida produtividade e elevados graus de endemismos, tornando a vegetação distinta das áreas envolventes. Assim, as plantas nestas áreas têm que enfrentar algumas limitações: baixo quociente de Ca/Mg, limitação de nutrientes e concentrações elevadas de metais pesados (Kazakou *et al*, 2008).

Em Portugal, estes solos ocorrem na região de Bragança, NE Portugal, situados em dois locais diferentes: Maciço de Vinhais (Bragança) e Maciço de Morais (Alimonde) (Meneses de Sequeira & Pinto da Silva, 1992; Asensi *et al*, 2004) (figura 1). A área serpentínica portuguesa tem cerca de 8.000 ha, com flora e geologia características (Prasad & Freitas, 1999; García-Barriuso *et al*, 2012). A ecologia e florística desta região foram investigadas por Sequeira e Pinto da Silva (1991). O solo é rico em magnésio (Mg) e as concentrações totais de Ni variam entre 851 e 2962 mg kg⁻¹ (Peterson *et al*, 2003). A caracterização bioclimática corresponde ao macrobioclima mediterrâneo (V. de la Fuente *et al*, 2007).



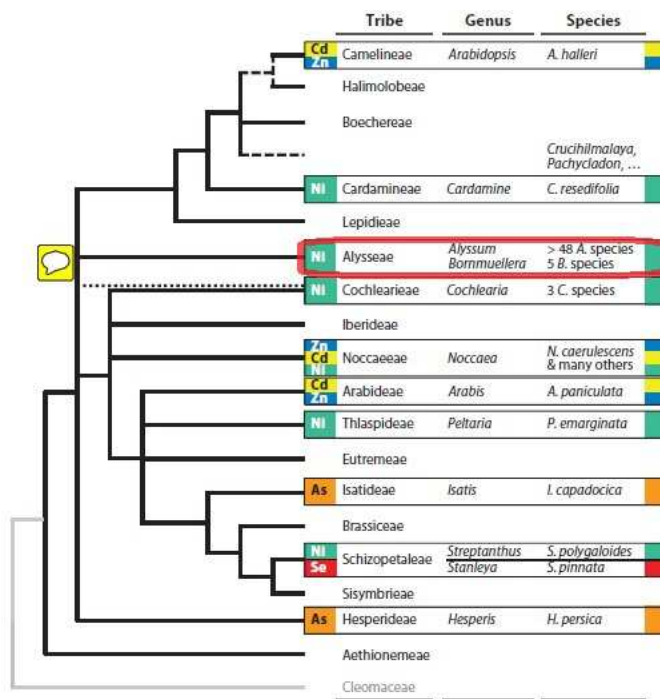
Fonte: http://www.icnb.pt/reldhabitats/FLORA/Espermat%C3%B3fitas/Alyssum_pintodasilvae/
Figura 1. Localização geográfica das áreas serpentínicas no NE de Portugal.

1.4 - Espécies hiperacumuladoras

Existe um grupo de plantas que desenvolveu mecanismos de resistência à presença de metais em concentrações muito elevadas no solo. A hiperacumulação é uma das estratégias e estas plantas são caracterizadas por acumularem elevadas concentrações de metais nas suas partes aéreas enquanto mantêm baixa concentração de metais nas raízes (Krämer *et al*, 2010). O mecanismo de hiperacumulação desenvolvido por estas plantas é ainda pouco compreendido (Paes-Leme *et al*, 2009), sendo que as quantidades de metal acumuladas, mesmo dentro de plantas da mesma espécie, podem variar bastante. Estas plantas podem conter até cerca de cem vezes mais metal do que plantas não acumuladoras.

As plantas hiperacumuladoras foram definidas como plantas que acumulam concentrações maiores que 1000µg/g (peso seco) Ni, Cu, Co, Cr e Pb; 10 000µg/g Zn e Mn (Boyd & Martens, 1998); 100µg/g Cd, quando cresce em solos nativos (Baker & Brooks, 1989); 2500 – 22 630 mg/kg As (Ma *et al*, 2001; Rathinasabapathi *et al*, 2006, 2007). Na hiperacumulação de Ni, o nível é 100 a 1000 vezes maior que o encontrado em plantas de solos não ultramáficos, e 10 a 100 vezes maior que o encontrado em plantas não hiperacumuladoras dos solos serpentínicos. Segundo Van der Ent *et al* (2013), em várias floras ultramáficas as concentrações de Ni de 100 – 1000µg/g são raras, mas a acumulação > 1000µg/g representa uma forma distinta de resposta da planta, sugerindo algumas características e funcionalidades metabólicas pouco comuns.

A hiperacumulação de Ni foi descoberta pela primeira vez em 1948 em *Alyssum bertolonii* (Minguzzi & Vergnano, 1948) e, desde então, cerca de 400 hiperacumuladoras (Peterson *et al*, 2003) de níquel foram descobertas em membros das famílias Acanthaceae, Asteraceae, Caryophyllaceae, Fabaceae, Flacourtiaceae, Meliaceae, Myristicaceae, Ochnaceae, Poaceae, Rubiaceae, Sapotaceae and Stackhousiaceae - assim como 26 espécies acumuladoras de cobalto, 24 de cobre, 19 de selénio, 16 de zinco, 11 de manganésio, 1 de tálio e outra de cádmio (Khan *et al*, 2000; Brooks *et al*, 2001). A maioria das espécies acumuladoras de Ni pertencem à família Brassicaceae, que contem cerca de 25% das espécies hiperacumuladoras de Ni conhecidas (Figura 2) (Kramer, 2010), o que se traduz em cerca de 87 espécies (Milner & Kochian, 2008).



Fonte: Kramer, U. Metal hyperaccumulation in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 2010. 61:517–34

Figura 2. Ocorrência de hiperacumulação de metais ao nível tribo na família Brassicaceae.

Uma aplicação prática do estudo das plantas hiperacumuladoras é a sua utilização em vários processos, como a fitoextração, uma vertente da fitorremediação para a descontaminação de solos, a recuperação de áreas degradadas que ainda contenham este metal ou na retirada destes metais para comercialização (fitomineração). Ambas as tecnologias são essencialmente ‘verdes’ e, portanto, foram recebidas favoravelmente pelo público, uma vez que as plantas usadas não são geneticamente modificadas e geralmente são nativas da área (Brooks *et al*, 2001).

As espécies do género *Alyssum* pertencem à família Brassicaceae e são hiperacumuladoras de níquel e cobalto, originárias das regiões áridas do Mediterrâneo perto da Turquia e Grécia (Baker & Brooks, 1989). Esta família contém o maior número de hiperacumuladoras de níquel, *ca.* de 170 *spp.*, e a sua distribuição ocorre principalmente nos solos serpentínicos do sul da Europa e Ásia Menor, desde Portugal no oeste e Iraque/Turquia/Irão no este, estando o expoente máximo de diversidade localizado na Península de Anatólia (Ghaderian *et al*, 2006). Algumas são consideradas infestantes, outras podem ter efeito ornamental. Caracterizam-se por terem flores brancas ou amarelas dispostas abundantemente em rácimos, o que as tornam particularmente usadas em jardins.

O nome científico *Alyssum* refere-se ao seu passado, quando estas plantas eram utilizadas como ervas medicinais na cura contra a raiva: do grego "a" ("sem") "lyssum" ("loucura")^[7].

Presente em grande número de plantas, o Ni foi descrito por Dixon *et al* (1975) como componente da enzima urease, sendo que tanto a urease como o Ni são essenciais para as funções vitais da planta. A sua deficiência causa necrose nas extremidades das folhas devido à acumulação de ureia pela diminuição da atividade da urease. A deficiência em Ni apresenta várias consequências – influência no crescimento e senescência da planta, no metabolismo do azoto e na absorção de ferro - demonstrando que o Ni pode ser classificado como um micronutriente das plantas superiores (Neves *et al*, 2007; Seregin & Kozhevnikova, 2006). No entanto, o excesso de níquel é mais comum, provocando toxicidade. Os efeitos tóxicos mais comuns são a inibição das atividades mitóticas, redução do crescimento da planta e danos na qualidade e produção dos frutos (Chen *et al*, 2009; Seregin & Kozhevnikova, 2006).

1.4.1 - *Alyssum pintodasilvae* Dudley

Alyssum pintodasilvae Dudley (*syn. Alyssum serpyllifolium subsp. Lusitanicum* T.R.Dudley & P.Silva), conhecida comumente como tomelos ou salgadeira^[3], é uma planta hiperacumuladora de Ni endêmica da Península Ibérica, ocorrendo nos solos serpentínicos do Nordeste de Portugal (Maciço de Morais e Maciço de Bragança-Vinhais) e da Galiza (Melide), locais pedregosos e rochosos, geralmente de substrato calcário^[15]. A correlação entre a presença desta espécie e os afloramentos de rochas ultrabásicas é absoluta, o que constitui uma boa ajuda para os especialistas em cartografia geológica e para os prospectores de minerações de níquel e cromo.

A. pintodasilvae possui uma grande capacidade de translocar níquel das raízes para os órgãos aéreos, nomeadamente, as folhas. É a única espécie hiperacumuladora de Ni que ocorre em Portugal. Esta é uma planta perene, ramificada a partir da base, lenhosa e as folhas são arredondadas no ápice e cobertas de pelos estrelados. As flores reúnem-se em grupos terminais e têm pétalas amarelas com 2 a 3cm. A floração pode ocorrer entre Maio e Junho e forma frutos lenticulares que contêm uma semente por lóculo^{[15][16]} (figura 3).



Figura 3. *Alyssum pintodasilvae* com o detalhe da flor (em baixo).

Esta espécie coloniza solos recentemente abandonados pela agricultura cerealífera e margens de caminhos. Embora menos abundante é frequente em comunidades herbáceas vivazes (figura 4). A regeneração de *Alyssum* depende da perturbação do solo. A mobilização mecânica do solo, a movimentação dos animais domésticos, as fossadas dos javalis ou os ciclos de congelamento-descongelamento da superfície do solo nos dias frios de Inverno facilitam a instalação desta espécie. A sua abundância está, em grande medida, relacionada com o historial recente de uso agrícola do solo^[18].

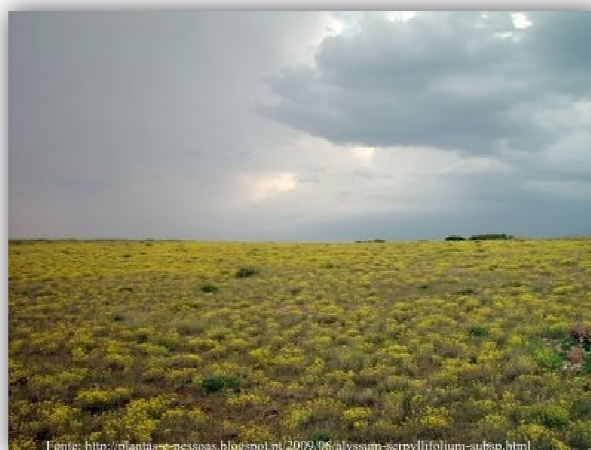


Figura 4. Comunidade de *A. serpyllifolium subsp. lusitanicum* (Samil, Bragança) [foto C. Aguiar].

Segundo a Comissão das Comunidades Europeias, em 2009, as maiores ameaças a esta espécie são as modificações das práticas de cultivo, a urbanização, depósitos de lixo, e os veículos motorizados [14].

1.5 - Espécies não-hiperacumuladoras

Neste trabalho experimental foram utilizadas duas espécies não hiperacumuladoras de níquel, sendo que uma delas pertence à mesma família que *A. pintodasilvae*: *Alyssum simplex* (Brassicaceae [Cruciferae]) e a outra pertence à família Betulaceae, *Alnus glutinosa*.

1.5.1 - *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn

Esta planta, conhecida vulgarmente como amieiro (figura 5), é uma árvore que pode atingir os 35m de altura, possui folhas redondas/ovadas, com 4 a 10 cm de comprimento, ocorrendo em regiões de clima temperado húmido. Em Portugal, o amieiro pode ser encontrado em quase todo o território com prevalência na região norte e centro. Esta árvore raramente ultrapassa os 120 anos de idade e é originária de Europa, Oeste da Ásia e Norte de África.

O amieiro forma associações simbióticas com *Frankia alni*, bactéria fixadora de azoto. Esta associação, que promove o aumento da fertilidade do solo, permitiu estabelecer esta planta como pioneira nos ecossistemas [4][5].



Figura 5. *Alnus glutinosa*.

1.5.2 - *Alyssum simplex* Rudolphi

Alyssum simplex (syn. *Alyssum minus* (L.) Roth ssp. *micranthum* (C. Meyer) Dudle; *Alyssum parviflorum* Fisch. ex M. Bieb. var. *micranthum* (C.A. Mey.) Dorn) é

uma dicotiledónea anual que ocorre em áreas perturbadas, nos sopés das colinas e campos. Surge no início da Primavera e forma grandes áreas floridas (figura 6). As flores são pequenas e amarelas e as sementes são achatadas, redondas e peludas [7]. De acordo com a Flora Ibérica, *A. simplex* ocorre em quase toda a Península Ibérica, mas em Portugal ocorre apenas em alguns dos afloramentos serpentínicos de Trás-os-Montes.



Figura 6. *Alyssum simplex* com o aspeto da flor em destaque (em cima) e o aspeto do fruto (em baixo).

1.6 - Propagação *in vitro*: micropropagação

A cultura *in vitro* de plantas refere-se ao cultivo de sementes, embriões ou fragmentos de tecido vegetal (por exemplo: calos) em tubos de ensaios ou similares de vidro (daí a origem do termo *in vitro*), sob condições assépticas e em meios nutritivos adequados, dispendo de luz, temperatura e humidade controladas, com o objetivo de obter uma rápida multiplicação de plantas, isentas de pragas e doenças [13]. Devido às limitações dos métodos convencionais na propagação de plantas, as técnicas de cultura *in vitro* constituem uma importante ferramenta, nomeadamente:

- na propagação de espécies, cuja reprodução através de métodos convencionais é difícil;
- na produção de plantas em grande escala, num curto espaço de tempo e numa pequena área;
- na produção de plantas isentas de pragas e doenças;

- na produção de mutantes, isto é, genótipos que ganharam ou perderam alguma característica;
- na produção de centenas de plantas sãs a partir de uma planta infetada por uma doença;
- na produção de plantas ao longo de todo o ano, ou seja, independentemente das condições climáticas e muitas vezes da época do ano;
- no armazenamento de plantas a baixo custo e em espaços físicos pequenos, para servirem mais tarde como pés-mãe;
- na propagação a partir de pequenas quantidades de tecido vegetal.

Existem numerosas técnicas de cultura de tecidos, mas em todas elas há um denominador comum: as condições de assepsia, o explante, o meio nutritivo e as condições ambientais. A assepsia é mantida por um conjunto de procedimentos essenciais que garantem que o explante está livre de contaminações por microorganismos que poderiam causar morte ou alterações indesejáveis no seu desenvolvimento, como o uso de álcoois e a esterilização do material de vidro e dos meios de cultura por autoclave (calor húmido) ou forno (calor seco) e das pinças e bisturis por flambagem em chama direta: bico de Bunsen com álcool na câmara de fluxo laminar. O explante é qualquer segmento oriundo de uma planta para iniciar uma cultura *in vitro*, como por exemplo um ápice caulinar ou radicular, uma gema axilar, um segmento de folha jovem, um embrião. Pode originar uma planta ou uma etapa intermediária denominada calo (uma massa de células indiferenciadas do ponto de vista organogénico e que está em contínua proliferação celular, podendo ser compacto, friável, esbranquiçado ou amarelado). O meio nutritivo é constituído por sais minerais, sacarose (fonte de carbono para alimentar a glicólise e o ciclo de Krebs, uma vez que inicialmente o explante não é completamente autotrófico), vitaminas (fatores catalíticos de rotas metabólicas), inositol (para a formação de pectinas e hemicelulose na parede celular) e substâncias gelificantes, como o ágar, necessárias pois o explante e as plantas obtidas devem ficar apoiados num suporte, para não afundarem. Existem muitos meios nutritivos, mas um dos mais comuns e eficaz é o desenvolvido por Murashige e Skoog (1962), conhecido pela abreviatura MS. Além dos componentes essenciais num meio de cultura, também podem ser incluídos hormonas ou reguladores de crescimento, fundamentais para direccionar o tipo de resposta que se pretende obter (George *et al*, 2008). As condições ambientais são muito importantes na câmara de cultura e devem

ser controladas para que as plantas se desenvolvam adequadamente, como a luz (16h luz_8h escuro; importante para a fotossíntese, fototropismo e fotomorfogênese) e a temperatura, geralmente entre os 24 e 27°C (Rathore *et al*, 2004; Barreto Cid, 2010).

A origem da técnica de micropropagação remonta ao início do século passado, quando por volta de 1902, Haberlandt, um fisiólogo vegetal austro-húngaro, decidiu manipular um sistema de cultura *in vitro* de plantas, procurando estabelecer e consolidar um sistema de micropropagação, apoiando-se na teoria da totipotência celular, na qual uma única célula, sob determinados estímulos, pode originar um indivíduo completo, via regeneração. Infelizmente, por limitações técnicas da época, os seus esforços falharam. Contudo, alguns anos mais tarde a partir dos trabalhos de Robbin (1922) e White (1934) em ponta de raízes; cultura de embriões, por La Rue (1936); cultura de calos, por Gautheret Nobécourt (1939); enriquecimento de meios nutritivos com leite de coco, por van Overbeek (1941); uso de plantas de tabaco como modelo experimental para estudo de morfogênese, por Skoog, desde 1944, e uso de meristemas apicais na obtenção de plantas livres de vírus, por Morel & Martin (1952), formaram-se as bases necessárias para que a cultura de tecidos se tornasse numa técnica muito utilizada, permitindo cada vez mais descobertas e aplicações (Barreto Cid, 2010).

A técnica de micropropagação pode apresentar, para muitas espécies vegetais, soluções para problemas como dificuldade de enraizamento e produção de mudas com maior eficiência, uniformidade e tempo reduzido. A partir de uma única matriz é possível produzir centenas de mudas idênticas à original, com todas as suas características e vantagens como mudas saudáveis de matrizes selecionadas, tamanho uniforme, melhor desempenho no campo e maior produtividade (Thomé *et al*, 2004).

De uma forma simples, a cultura de tecidos envolve três fases: isolamento da planta do seu ambiente natural, uso de técnicas assépticas para remoção e obtenção de material livre de contaminações por microorganismos e a cultura e manutenção *in vitro* num ambiente estritamente controlado (Rathore, 2004).

Durante as fases da cultura *in vitro*, as plantas crescem sob condições especiais de redução das trocas gasosas, alta humidade do ar, baixa intensidade luminosa e uso de açúcar (sacarose) como fonte de energia. Estas condições podem causar inibição da fotossíntese, estomas anormais, maior acumulação de reservas ou biomassa,

dificultando a micropropagação e a aclimatização, proporcionando perdas elevadas de plantas na transferência para as condições *ex vitro* (Borghesan, 2003).

As plantas cultivadas *in vitro* são depois enraizadas em vasos para se desenvolverem em solo e adquirirem dimensões e características para poderem ser transplantadas para outros locais. Este processo denomina-se aclimatação e consiste em retirar a plântula da condição *in vitro* e transferi-la para vasos com solo, em condições controladas de estufa, tendo por objetivo superar as dificuldades que as plântulas obtidas por cultura de tecidos enfrentam quando são removidas dos tubos de ensaio. Esse processo é crítico, pois a plântula passa de um ambiente de baixa transpiração para outro que exige maior desenvolvimento, podendo ocorrer stresse hídrico, ocorre a passagem de um estado heterotrófico para outro autotrófico, a disponibilidade de sais é diferente e, finalmente, a planta sai de um estado asséptico para ficar sujeita ao ataque de microorganismos saprófitos e eventualmente patogênicos (Gratapaglia & Machado, 1990; Maciel, 2000).

A. pintodasilvae é uma planta de pequeno porte onde as técnicas convencionais de propagação vegetativa são de difícil aplicação. O recurso às metodologias de propagação *in vitro* pode ser um precioso auxiliar quer na sua propagação quer no estabelecimento de protocolos que melhor permitam compreender os mecanismos de tolerância desta espécie aos metais pesados (Ferreira, 2008).

1.7 – *Porcellio dilatatus*

Isópodes terrestres são bons representantes do grupo de macrodecompositores do solo, e habitam a camada superior do solo (Calhôa *et al*, 2012). A sua atividade saprófita contribui para a fragmentação da matéria orgânica, principalmente folhas condicionadas, aumentando a área de ataque para os decompositores (como os fungos e bactérias, promovendo a degradação microbiana), o que constitui uma importante função no processo de decomposição. A atividade destes organismos aumenta a reciclagem dos nutrientes essenciais, os quais possuem uma grande importância na manutenção da fertilidade do solo (Caseiro *et al*, 1999; Calhôa *et al*, 2012).

Estas características ecológicas, associadas com uma captura fácil no terreno e manutenção nas culturas de laboratório, tornam os isópodes terrestres bons candidatos para testes em organismos, tanto em estudos puramente ecológicos como

ecotoxicológicos (Caseiro *et al*, 1999). Além disso, estes organismos têm grande capacidade para tolerar altos níveis de metais pesados, tornando-os num ótimo modelo para estudos de bioacumulação, como é o caso do presente estudo. Os Isopoda mostram-se, assim, organismos chave para a monitorização ambiental (Calhõa *et al*, 2006, Calhõa *et al*, 2012).

A acumulação dos metais nos isópodes ocorre devido à adoção de uma estratégia de tolerância, acumulando e imobilizando estes metais em órgãos denominados hepatopâncreas, em vez de diminuir a absorção ou aumentar a excreção (Correia *et al*, 2008, Calhõa *et al*, 2011).

A escolha de *P. dilatatus* Brandt para este tipo de estudos é baseada na representatividade desta espécie no Sul da Europa. O género *Porcellio* tem, essencialmente, uma distribuição ocidental e *P. dilatatus* é particularmente bem representado nas ilhas atlânticas (Açores, Madeira, Canárias), Península Ibérica e nos países do Norte de África (Marrocos, Algéria, Tunísia).



Figura 7. *Porcellio dilatatus* ocorre principalmente nas ilhas atlânticas, Península Ibérica e nos países do Norte de África.

P. dilatatus pertence à Ordem Isopoda, uma das maiores ordens de crustáceos, sendo a maioria das 5000 espécies habitantes de ambientes marinhos. No entanto, é nesta ordem que se encontra o maior grupo de crustáceos verdadeiramente terrestres, membros da sub-ordem Oniscidea, conhecidos vulgarmente por bichos-da-conta (*pillbugs*), devido à capacidade de se enrolarem sobre si próprios em situações de perigo adquirindo uma forma esférica, o que lhes fornece proteção e auxílio na redução da perda de água por evaporação, já que respiram por brânquias.

A maioria dos isópodes mede entre 5 a 15mm e possui uma coloração acinzentada. São pequenos animais de corpo comprido, achatado dorsoventralmente, e preferem locais húmidos, debaixo das pedras ou dos detritos vegetais de que se alimentam. Podem ser encontrados em muitos biomas em todo o mundo, incluindo florestas temperadas, florestas tropicais, e pastagens ^[10].



Figura 8. *Porcellio dilatatus* [fotos da autora].

Os isópodes acasalam durante todo o ano, com especial atividade na Primavera. As fêmeas põem os ovos, até a um máximo de 200, que transportam numa bolsa por debaixo do corpo. Os ovos eclodem entre três a sete semanas e os jovens são de cor branca, permanecendo na bolsa durante seis a oito semanas, até serem capazes de cuidar de si próprios. Pode haver uma a duas gerações por ano, com indivíduos que vivem até aos três anos, dependendo das condições meteorológicas ^{[11][12]}.

Como a maioria dos crustáceos, o corpo está dividido em três regiões: cabeça, tórax e abdómen (figura 9). Nos isópodes, o primeiro segmento do tórax está fundido com a cabeça e cada um dos restantes sete segmentos possui um par de patas. Possuem dois pares de antenas e uma boca formada por quatro mandíbulas. Os olhos são compostos. As primeiras antenas são normalmente utilizadas de forma química sensitiva e as segundas antenas são tácteis ^[9].

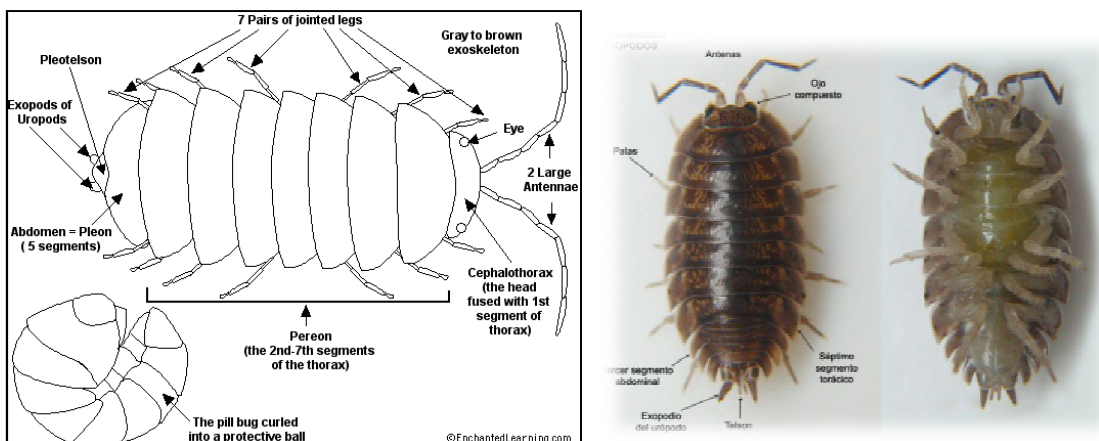


Figura 9. Representação esquemática do corpo de *Porcellio dilatatus* (à esquerda) e detalhe do corpo (à direita).

Os isópodes são funcionalmente descritos como saprófitas, sendo considerados como decompositores primários, pois atuam preferencialmente na fragmentação da matéria vegetal, principalmente na matéria condicionada. São também considerados coprófagos, pois ingerem as suas próprias fezes e as fezes de outros animais. A coprofagia resulta de uma redução na relação C/N e maior atividade microbiana (Correia *et al*, 2008).

1.8 - Objetivo

Para avaliar se a hiperacumulação de níquel em *A. pintodasilvae* fornece uma defesa elementar contra a ação herbívora de *P. dilatatus*, pretende-se estudar a preferência alimentar e a performance deste detritívoro quando sujeito a dieta de folhas condicionadas de *A. pintodasilvae* colhidas em populações naturais e obtidas *in vitro*, e em face de outras espécies não-acumuladoras, *A. simplex* e *A. glutinosa*.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para a realização deste trabalho experimental, foram utilizadas três espécies vegetais, *A. pintodasilvae* (Brassicaceae), cujo efeito em *P. dilatatus* se pretende estudar, *A. simplex* (Brassicaceae), não hiperacumuladora, e *A. glutinosa* (Betulaceae), utilizada como controlo positivo, na medida em que esta planta foi considerada como alimento ótimo para porcélios, permitindo boas taxas de crescimento e de reprodução em cultura (Sousa *et al.*, 1998; Caseiro *et al.*, 2000).

2.1 - Colheita e Condicionamento das folhas

Os indivíduos de *A. pintodasilvae* foram recolhidos na área serpentina de Alimonde, Bragança e os indivíduos de *A. simplex* foram recolhidos na área serpentina de Carrzedo, em Julho de 2009. As folhas de *A. glutinosa* foram colhidas de exemplares adultos em Coimbra, no Parque Mondego, junto ao rio. Todas as amostras foram recolhidas antes da abscisão.

As folhas das amostras de *A. pintodasilvae* e *A. simplex* recolhidas foram secas no laboratório, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Cerca de um mês antes do início dos ensaios, procedeu-se ao condicionamento das folhas na Mata do Jardim Botânico da UC, durante 30 dias, em saquinhos de rede fina, colocados na manta morta. As folhas de *A. glutinosa* foram condicionadas apenas durante 15 dias. Depois, foram guardados a 4°C, até serem utilizados (Gonçalves *et al.* 2007).

O condicionamento das folhas é utilizado para permitir a degradação das defesas hidrossolúveis e o condicionamento microbiano necessário para tornar as folhas palatáveis para os isópodes (Sousa, 2003).

2.2 - Determinação da concentração de Níquel no material vegetal

A concentração de níquel no material vegetal foi determinada antes do início do condicionamento.

Para a quantificação do níquel total procedeu-se de acordo com o manual de métodos analíticos do equipamento de absorção atómica com chama (*Perkin Elmer AAnalyst 100*). Uma sub-amostra de 100mg foi retirada do saquinho e reduzida a pó. Depois, foi colocada num copo Teflon ao qual também se adicionou 2ml de ácido nítrico concentrado (69% v/v). Este processo, digestão ácida, foi repetido para todos os saquinhos. Os copos Teflon foram então colocados numa estufa, sob pressão, a 150°C

durante 8 horas. No final deste processo, o volume dos copos foi ajustado para 10ml com água ultrapura. A concentração de Ni foi lida por espectrofotometria de absorção atômica com chama (*Perkin Elmer Aanalyst 100*). A curva de calibração foi construída com duas concentrações conhecidas de sulfato de níquel hexahidratado ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), correspondentes a 2 e $7\mu\text{g/g}$ Ni de peso seco (Gonçalves *et al*, 2007).

As médias e os erros padrões das concentrações de Ni foram calculados no final do procedimento.

Todo o material de laboratório foi lavado com ácido nítrico a 10% (mínimo *ca* 6h) e enxaguado com água ultrapura duas vezes. Foi necessário evitar o contacto entre o material vegetal e objetos metálicos, para que não ocorressem contaminações.

2.3 – Obtenção de material *in vitro*

Este ensaio teve como objetivo a propagação *in vitro* de *A. pintodasilvae*, para ser possível a obtenção de plantas sem as concentrações de Ni características da hiperacumulação, e *A. simplex*, para a obtenção de exemplares cultivados fora do seu ambiente natural, na tentativa de saber mais sobre os seus mecanismos de defesa contra ataques bióticos.

2.3.1 - Cultura *in vitro* de *Alyssum simplex*

Sementes de indivíduos de *A. simplex*, colhidos em Carrazedo, foram colocadas a germinar, mas não ocorreu germinação. Vários métodos de germinação foram testados, como a germinação em papel vegetal, germinação em meio MS, tratamento no frio das sementes antes de serem coloc

adas a germinar em meio MS, isolamento dos embriões para germinarem em meio MS, utilização de ácido giberélico na tentativa de estimular a germinação. Em nenhum destes métodos ocorreu germinação de *A. simplex*, sendo esta a razão pela qual não existe um tratamento *in vitro* desta planta.

2.3.2 - Cultura *in vitro* de *Alyssum pintodasilvae*

A cultura *in vitro* de *A. pintodasilvae* foi realizada a partir de sementes colhidas na população de Alimonde, Bragança. Este ensaio teve como objetivo a propagação *in vitro* de *A. pintodasilvae*, para ser possível a obtenção de plantas sem níquel.

2.3.2.1 - Recolha e esterilização das sementes

A colheita de indivíduos de *A. pintodasilvae*, em Bragança, permitiu a recolha de sementes.

As sementes foram removidas do fruto e, em seguida, esterilizadas. Para este processo, foi preparada uma solução de hipoclorito de cálcio (7,5 % p/v) – 7,5g de hipoclorito de cálcio foram diluídos em 100ml de água destilada. Esta solução foi posteriormente filtrada, à qual foram adicionadas 2 gotas de detergente Tween. As sementes foram colocadas na solução, cerca de 10 minutos, com agitação. Após este tempo, as sementes foram lavadas três vezes com água destilada e, de seguida, foram colocadas a germinar.

2.3.2.2 - Preparação dos meios de cultura

Para a cultura *in vitro* utilizou-se o meio MS. É um dos meios de cultura para plantas mais utilizado em ensaios *in vitro* sendo, geralmente, elaborado a partir de soluções stock de macronutrientes (20x), micronutrientes (100x), mio-inositol (50x), FeEDTA (40x) e vitaminas (50x), e cuja composição está indicada na **Tabela I**.

Tabela I – Composição do meio base MS utilizado nos ensaios de cultura *in vitro* de *Alyssum pintodasilvae*.

Meio MS (Murashige&Skoog, 1962)	
Sacarose (p/v)	2,5%* (mg/L)
Macronutrientes	(mg/L)
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	(mg/L)
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Mio-inositol	100 mg/L
Compostos Orgânicos	(mg/L)
Glicina	2
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Tiamina	0,5

*Na formulação original do meio MS a concentração utilizada é de 3%.

As soluções stock de macronutrientes e FeEDTA foram mantidas a cerca de 4°C e as soluções de vitaminas, mio-inositol e micronutrientes foram mantidas a cerca de -20°C.

Na preparação dos meios de cultura, os componentes já referidos foram adicionados ao volume requerido assim como a fonte de carbono utilizada, sacarose, na concentração de 2,5% (p/v). Em seguida, ajustou-se o pH para 5,7 pela adição de KOH 0,01N – 1N. Por último, foi adicionado agar (Food Grade E-406), na concentração de 0,7% (p/v), e ajustou-se o volume final dos meios. O meio MS foi preparado numa placa de aquecimento para facilitar a dissolução do agar. O meio foi distribuído por tubos de ensaio e esterilizado por autoclavagem a 121°C, à pressão de 1atm., cerca de 20min.

Todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados numa câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação dos meios de cultura.

2.3.2.3 - Germinação das sementes

Sementes esterilizadas de *A. pintodasilvae* foram inoculadas nos tubos de ensaio com meio MS, durante 3 semanas na estufa sem luz direta incidente (figura 10). Após este período, a maior parte das sementes germinou e os ápices das plântulas foram excisados e utilizados com inóculo para a multiplicação *in vitro*.



Figura 10. À esquerda, sementes de *A. pintodasilvae* em meio MS. À direita, plântulas de *A. pintodasilvae* germinadas em meio MS, após 3 semanas [fotos da autora].

2.3.2.4 - Estabelecimento das culturas e Propagação *in vitro*

Para induzir a proliferação, foi utilizada citocinina BA (benziladenina) – um regulador de crescimento conhecido pelo seu papel no desenvolvimento meristemático, que aumenta a indução da proliferação de rebentos a partir dos ápices.

A citocinina BA foi adicionada ao meio MS na concentração de 4,40µM. 122 plântulas foram explantadas para os tubos de ensaio e colocadas na estufa, cerca de 4

semanas, a 25°C, num fotoperíodo de 16h luz : 8h escuro, para que ocorresse a proliferação de rebentos axilares (figura 11).



Figura 11. Plântulas de *A. pintodasilvae* em meio MS com citocinina BA. De notar a proliferação de rebentos axilares, após 4 semanas de inoculação, na imagem à esquerda [fotos da autora].

Após 4 semanas, os rebentos axilares foram separados e mudados para meio de enraizamento, meio MS com as concentrações de macronutrientes e FeEDTA reduzidas a metade e sacarose a 2,5%. 93 plântulas foram explantadas para os tubos de ensaio e 5 caixas de cultura (figura 12). As plântulas foram mantidas na estufa, durante cerca de 4 semanas (figura 13).



Figura 12. Plântulas de *A. pintodasilvae* em meio de enraizamento: meio MS com as concentrações de macronutrientes e FeEDTA reduzidas a metade [fotos da autora].



Figura 13. Desenvolvimento de raiz em plântulas de *A. pintodasilvae* após 4 semanas em meio de enraizamento [fotos da autora].

Após 4 semanas, as plântulas enraizadas foram cuidadosamente removidas dos tubos de ensaio ou caixas, o agar removido das raízes e colocadas em vasos com solo.

O solo utilizado foi recolhido no Jardim Botânico de Coimbra e foi autoclavado a 121°C e 1 atm., durante 20 minutos. Posteriormente, o solo autoclavado foi colocado em 25 vasos de plástico. Os vasos foram colocados a embeber durante 24 horas, antes da transferência das plântulas (figura 14).



Figura 14. Transferência das plântulas de *A. pintodasilvae* para vasos com terra de jardim [fotos da autora].

2.3.2.5 - Aclimação das plantas obtidas *in vitro*

Os vasos foram colocados numa estufa com condições de humidade, luminosidade (16h luz : 8h escuro) e temperatura controlada (25°C), durante 8 semanas (figura 15).



Figura 15. Indivíduos de *A. pintodasilvae* em aclimação, após 8 semanas de aclimação [foto da autora].

No final dos ensaios, os indivíduos foram excisados e secos, sendo posteriormente colocados a condicionarem, por 30 dias, na mata do Jardim Botânico.

2.4 - Obtenção e manutenção de *Porcellio dilatatus*

Os indivíduos de *P. dilatatus* foram recolhidos numa zona agrícola em Carregosa, Oliveira de Azeméis, tendo sido alimentados com folhas condicionadas de *Alnus glutinosa* e mantidos a uma temperatura de cerca de 22°C e fotoperíodo de 16h de luz.

2.5 - Ação da dieta de *Alyssum pintodassilvae*, *Alyssum simplex* e *Alnus glutinosa* em *Porcellio dilatatus*

Nos ensaios com *P. dilatatus* foram utilizadas caixas de Petri de plástico com 13mm de altura e 5,5cm de diâmetro, as quais asseguravam a ventilação apropriada para o isópode. O fundo de cada caixa foi coberto com uma mistura de gesso de Paris com carvão ativado (Sousa, 2003). A mistura foi pulverizada com água, para fornecer humidade ao isópode.

Foram efetuados 5 tratamentos:

1. *Alyssum pintodassilvae* Alimonde
2. *Alyssum simplex* Carrazedo
3. *Alyssum pintodassilvae* cultivado *in vitro*
4. *Alnus glutinosa*
5. Jejum

À exceção do tratamento em jejum, realizado para perceber se os isópodes morreram por evitar o alimento ou por ingeri-lo, em cada réplica dos restantes tratamentos foram colocados 100mg de folhas condicionadas; cada caixa continha uma espécie de planta e um isópode. Foram preparadas 12 réplicas de cada tratamento. As folhas de *A. glutinosa* foram seccionadas devido às suas dimensões, muito superiores às folhas de *Alyssum*. Os isópodes foram alimentados com as folhas uma vez que é este órgão que apresenta as maiores concentrações de Ni nas plantas hiperacumuladoras de Brassicaceae, principalmente o género *Alyssum* (Bani *et al*, 2010).

Os isópodes foram pesados e distribuídos aleatoriamente pelas caixas, apenas um porcélion por réplica. Durante o ensaio, com duração de 32 dias, as caixas foram mantidas a uma temperatura constante de cerca de 25°C e fotoperíodo de 16h luz:8h escuro. A humidade nas caixas foi mantida pulverizando com água sempre que necessário. A adição de alimento, devidamente pesado, ocorreu quando se justificou, evitando assim que o isópode fosse sujeito a períodos de fome. Ao longo do ensaio, procedeu-se ao registo da mortalidade, da pesagem dos isópodes e das fezes produzidas, de oito em oito dias. As fezes foram recolhidas semanalmente. No final do ensaio foi pesado o material foliar restante, assim como os isópodes sobreviventes.

Os seguintes parâmetros foram determinados:

- % Mortalidade e % Sobrevivência;
- Quantidade Total de folhas consumidas (QFC);
- Variação de Peso dos isópodes (Wgh): Peso final – Peso inicial;

- Índice de Fagodepressão/ Fagoestimulação: $P(ds)_i = QFC(T)/QFC(C)$; sendo T o tratamento e C o controle, tomando como controle *Alnus glutinosa*.

A normalidade e a homogeneidade foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene, respectivamente, para a quantidade de folhas consumidas (QFC) e para a variação de peso (Wgh). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de ANOVA de uma via, seguida do teste de Fisher LSD. A mortalidade e sobrevivência foram analisadas pelo teste de sobrevivência de Kaplan-Meier, seguido do teste de Logrank. O nível de significância selecionado foi sempre $\alpha < 0,05$. O tratamento estatístico dos dados foi efetuado com o programa SPSS 21.0 (SPSS 2013).

RESULTADOS
e
DISCUSSÃO

3.1 - Determinação da concentração de Ni no material vegetal

A concentração de Ni encontrada nas folhas de *Alyssum pintodasilvae* colhidas em Alimonde foi de $9287,17 \pm 529$ $\mu\text{g/g}$ (média \pm erro padrão) e nas folhas de *Alyssum simplex* colhidas em Carrazedo foi de $65,148 \pm 26,7$ $\mu\text{g/g}$ (média \pm erro padrão).

As concentrações determinadas confirmam o *status* de hiperacumuladora de *A. pintodasilvae*, de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriormente publicados e que demonstraram a hiperacumulação em *A. pintodasilvae* (Meneses de Sequeira & Pinto da Silva, 1992; Peterson *et al*, 2003; Gonçalves *et al*, 2007). Os estudos relativos a *A. simplex* são escassos (Brooks and Radford, 1978; Vilas Boas, 2010), sendo que o presente estudo se junta aos poucos existentes que descrevem o *status* de não-acumuladora de *A. simplex*.

3.2 – Obtenção de material *in vitro*

O ensaio de propagação *in vitro* foi efectuado com o objetivo de obter *A. pintodasilvae* sem Ni, uma vez que a cultura *in vitro* é uma metodologia utilizada para produzir plantas em larga escala.

As condições de propagação *in vitro* de *A. pintodasilvae* foram otimizadas por Ferreira (2008), pelo que neste ensaio se seguiram os protocolos descritos nesse trabalho.

Nas condições testadas, as sementes mostraram boa capacidade germinativa, na ordem dos 70%. A adição de citocinina BA ao meio de cultura dos ápices induziu a proliferação dos meristemas axilares e permitiu a obtenção de 122 plântulas que foram colocadas em meio de enraizamento. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para vasos com solo e registou-se 100% de sucesso na aclimação.

3.3 - Ação da dieta de *Alyssum pintodasilvae*, *Alyssum simplex* e *Alnus glutinosa* em *Porcellio dilatatus*

Entre os parâmetros mais usados nos testes ecotoxicológicos com isópodes (Calhã *et al*, 2011), encontram-se, neste estudo, a sobrevivência, variação de peso e quantidade de alimento consumida. Avaliar mudanças nos padrões de sobrevivência causadas pela exposição a fatores de stress é crucial para entender a estabilidade/crescimento da população e poderá refletir a função dos isópodes nos processos de decomposição e nos ciclos de nutrientes (Calhã *et al*, 2011).

No presente ensaio, verificou-se que a mortalidade de *P. dilatatus* foi maior nos indivíduos alimentados com folhas de *A. pintodasilvae* do que naqueles alimentados com as folhas das restantes plantas e nos indivíduos sujeitos a jejum (figura 16 e Tabela II). *A. glutinosa* foi utilizada como controlo positivo, uma vez que as folhas esta espécie foram consideradas como alimento ótimo para os isópodes (Sousa *et al*, 1998, Caseiro *et al*, 2000).

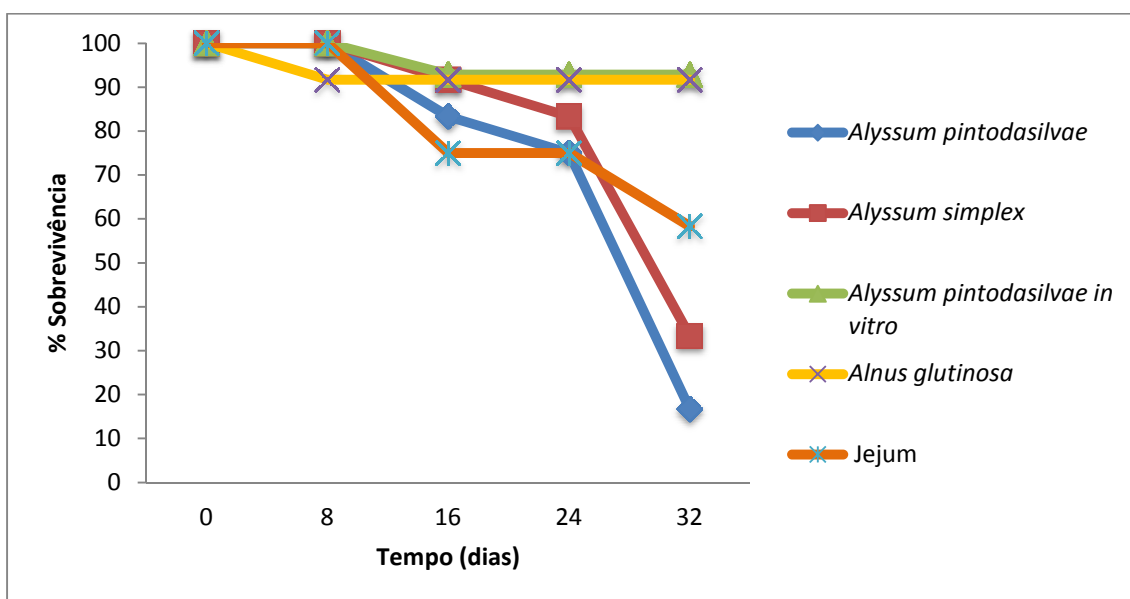


Figura 16. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier de *Porcellio dilatatus* alimentados com folhas condicionadas de *Alyssum pintodasilvae*, *Alyssum simplex*, *Alyssum pintodasilvae* cultivado *in vitro*, *Alnus glutinosa* e sujeitos a jejum. Médias de 12 repetições para cada tratamento.

Analisando o gráfico da figura 16, verifica-se que a única morte ocorrida nos indivíduos alimentados com *A. glutinosa* (8% de mortalidade) aconteceu no início do tratamento, e a única morte ocorrida no tratamento com *A. pintodasilvae in vitro* (8%) ocorreu a meio do ensaio. A mortalidade foi muito mais acentuada em *A. pintodasilvae* (83%) e foi particularmente intensa na última semana do ensaio. Este

resultado está de acordo com o estudo de Gonçalves *et al*, (2007), em que foi comparado o efeito de *A. pintodasilvae*, *Iberis procumbens* (Brassicaceae), *Micromeria juliana* (Lamiaceae) e *Alnus glutinosa* na dieta de *P. dilatatus*. No tratamento jejum, a mortalidade foi de 42% e ocorreu gradualmente ao longo do ensaio. Este resultado indica que a elevada mortalidade (83%) registada nos isópodes alimentados com *A. pintodasilvae* não ocorreu por evitarem o alimento, e sugere que seja consequência da toxicidade causada pelas folhas condicionadas que serviram de alimento a *P. dilatatus* (Boyd & Jhee, 2005; Freeman *et al*, 2007). Além disso, como já referido, a mortalidade no tratamento com *A. pintodasilvae* foi particularmente intensa na última semana do ensaio. No entanto, a quantificação do Ni existente nos isópodes no final do ensaio permitiria discriminar efetivamente o efeito tóxico pós-ingestão (Behmer, 2005). Em *A. simplex*, os indivíduos morreram maioritariamente no final do ensaio. Não sendo hiperacumuladora de Ni, os valores de mortalidade registados (67%), mais elevados que no jejum, podem ser devidos à presença de elevados teores em defesas químicas orgânicas, como compostos fenólicos ou glucosinolatos (Whittaker & Feeny, 1971; Kessler & Baldwin, 2002, Martínez-Ballesta *et al*, 2013). A presença de glucosinolatos é uma característica comum da família Brassicaceae (Tolrà *et al*, 2001). A ausência de diferenças significativas entre as duas espécies de *Alyssum*, pode indicar que *A. simplex*, não sendo hiperacumuladora, efetua um investimento em defesas químicas contra herbivoria, enquanto que a hiperacumulação de Ni em *A. pintodasilvae* actuaria como defesa elementar. Em Gonçalves *et al*, (2007), não foram detetadas diferenças significativas nas concentrações de compostos fenólicos entre *A. pintodasilvae* e os restantes tratamentos, pelo que estes compostos não terão influência na performance de *P. dilatatus*. A realização de ensaios de escolha e a repetição dos ensaios de não escolha incluindo novamente o ensaio de jejum permitiriam entender melhor o mecanismo de resposta de *P. dilatatus*, principalmente a *A. simplex*. Também a quantificação dos glucosinolatos e compostos fenólicos nas duas espécies de *Alyssum* permitiria comparar a presença destes compostos e a sua função, assim como investigar a hipótese de *trade-off* para *A. pintodasilvae*, como investigado para *Thlaspi caerulescens* por Tolrà *et al*, 2001, onde os resultados obtidos no cultivo de plantas de *Thlaspi* numa solução nutritiva com concentrações de 1.5, 500 and 1000 μM Zn suportam a hipótese de *trade-off* entre o Zn e glucosinolatos na parte aérea da planta, pois as concentrações de glucosinolatos diminuiriam com a exposição às concentrações crescentes de Ni.

Na figura 17 está representado o tempo médio de sobrevivência em cada tratamento. É possível observar que o tempo médio de sobrevivência de *P. dilatatus* é significativamente menor no tratamento com *A. pintodasilvae* do que nos tratamentos com *A. glutinosa* ($Z=10,796$; $p=0,001$) e a *A. pintodasilvae in vitro* (Tabela II).

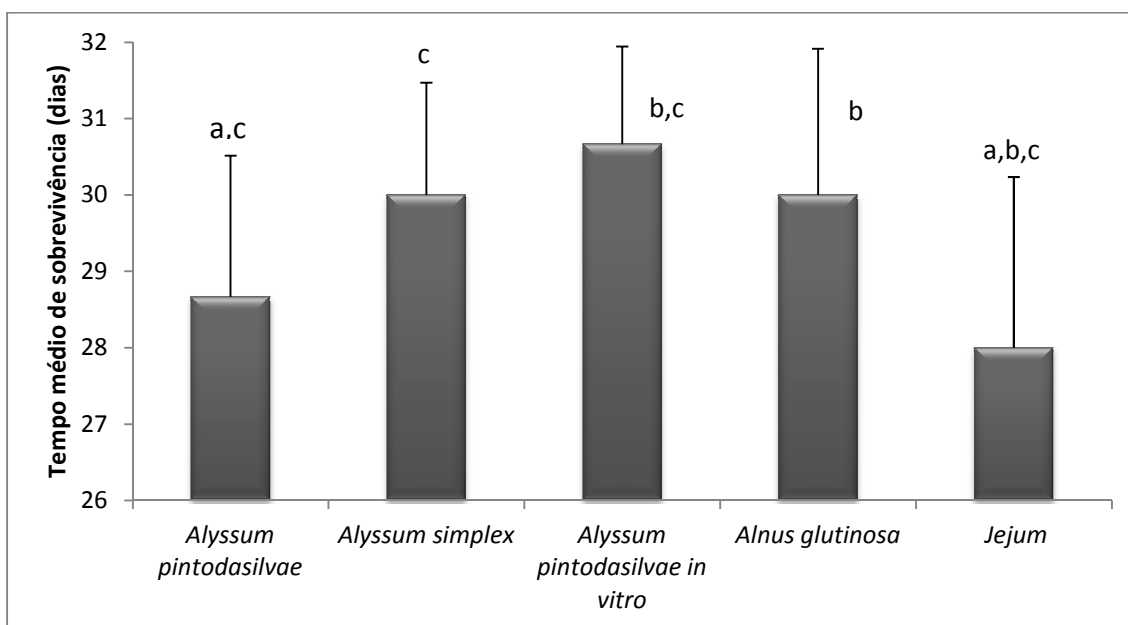


Figura 17. Tempo médio de sobrevivência de *Porcellio dilatatus* sujeito a dieta com folhas condicionadas de *Alyssum pintodasilvae*, *Alyssum simplex*, *Alyssum pintodasilvae* cultivado *in vitro*, *Alnus glutinosa* e sujeitos a jejum. Médias de 12 repetições para cada tratamento. As linhas representam os erros padrão. Letras diferentes significam que as médias são significativamente ($p < 0,05$) diferentes segundo o teste Log rank.

O tempo médio de sobrevivência de *P. dilatatus* foi significativamente diferente entre *A. pintodasilvae* e *A. pintodasilvae in vitro* ($Z=11,207$; $p=0,001$), resultado que indica a importância do Ni como defesa elementar. Na verdade, a resposta de *P. dilatatus* quando alimentado com folhas de *A. pintodasilvae* sem Ni foi semelhante à resposta a *A. glutinosa* ($Z=0,001$; $p=0,975$), espécie utilizada como controlo positivo, mostrando um tempo de sobrevivência elevado e uma % de mortalidade baixa. Este resultado demonstra a ausência de efeitos tóxicos das folhas de *A. pintodasilvae in vitro* (sem Ni) assim como preferência alimentar por parte de *P. dilatatus*. Ensaio com plantas cultivadas com concentrações intermédias de Ni nas folhas de *A. pintodasilvae*, tal como planeado inicialmente, poderiam auxiliar na compreensão do comportamento alimentar e performance dos isópodes. No entanto, a contaminação dos vasos contendo solo com diferentes concentrações de Ni impossibilitou a realização desses ensaios, pois as plantas que foram recuperadas não foram suficientes para a realização dos ensaios. Apesar do tempo médio de sobrevivência no tratamento com *A. simplex* e com *A.*

glutinosa ser semelhante, o comportamento dos isópodes durante o ensaio foi muito distinto, uma vez que em *A. simplex* a mortalidade foi mais acentuada na última semana e no amieiro os indivíduos sobreviveram quase na totalidade e, portanto, os dois tratamentos são estatisticamente diferentes ($Z=7,005$; $p=0,008$).

A análise da quantidade de folhas consumidas revelou que existem diferenças significativas ($F_{0,05(3)3,20}=1,256$; $p=0,010$) entre os tratamentos (Tabela II e Figura 18).

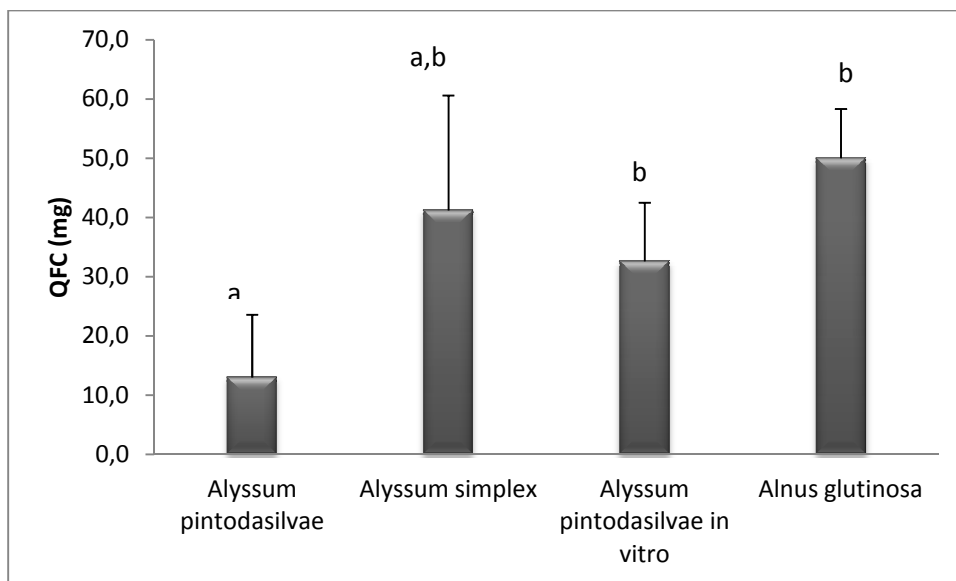


Figura 18. Quantidade de folhas consumidas de *Alyssum pintodasilvae*, de *Alyssum simplex*, de *Alyssum pintodasilvae in vitro* e de *Alnus glutinosa* por *Porcellio dilatatus* após 32 dias de ensaio. Médias de 2 repetições para *Alyssum pintodasilvae*, 4 repetições para *Alyssum simplex*, 11 repetições para *Alyssum pintodasilvae in vitro* e 10 repetições para *Alnus glutinosa*. As barras representam os erros padrão. Letras diferentes significam que as médias são significativamente diferentes ($p<0,05$), segundo o teste de Fisher LSD.

O tratamento com *A. pintodasilvae* foi o que apresentou menor quantidade de folhas consumidas, evidenciando diferenças entre o controlo positivo, *A. glutinosa*, e *A. pintodasilvae in vitro*. A diferença significativa entre os dois tratamentos de *A. pintodasilvae* mostra a importância do Ni na escolha alimentar, pois na ausência de concentrações elevadas de Ni nas folhas o comportamento alimentar dos isópodes foi muito diferente, influenciando bastante na preferência e quantidade ingerida, sugerindo que o Ni possui também um efeito inibitório no comportamento alimentar, como foi observado na % de sobrevivência, muito mais elevada em *A. pintodasilvae in vitro*. Não foram detetadas diferenças significativas entre *A. pintodasilvae* e *A. simplex*, o que sugere que a palatabilidade das folhas de ambas as plantas para os isópodes poderá ser semelhante, apesar de se poder observar no gráfico da figura 18 maior preferência por *A. simplex*. No início deste trabalho, foi colocada a hipótese de uma ação diferente

destas duas plantas sobre *P. dilatatus*, pois pensou-se *A. simplex*, não sendo hiperacumuladoras, não teria efeitos anti-herbvoros acentuados. A realização de ensaios de escolha poderiam clarificar a preferência alimentar de *P. dilatatus* em relação a estas duas plantas, na tentativa de esclarecer se a preferência observada nos isópodes é realmente semelhante, uma vez que em termos de ação sobre os isópodes, verificou-se que *A. simplex* teve um efeito menos tóxico, e portanto ocorreu maior % de sobrevivência em relação a *A. pintodasilvae*.

Foram detetadas diferenças significativas ($F_{0,05(4)4,29}=3,752$; $p=0,014$) na variação de peso (Wgh) dos isópodes entre *A. pintodasilvae* e os restantes tratamentos (figura 22 e Tabela II).

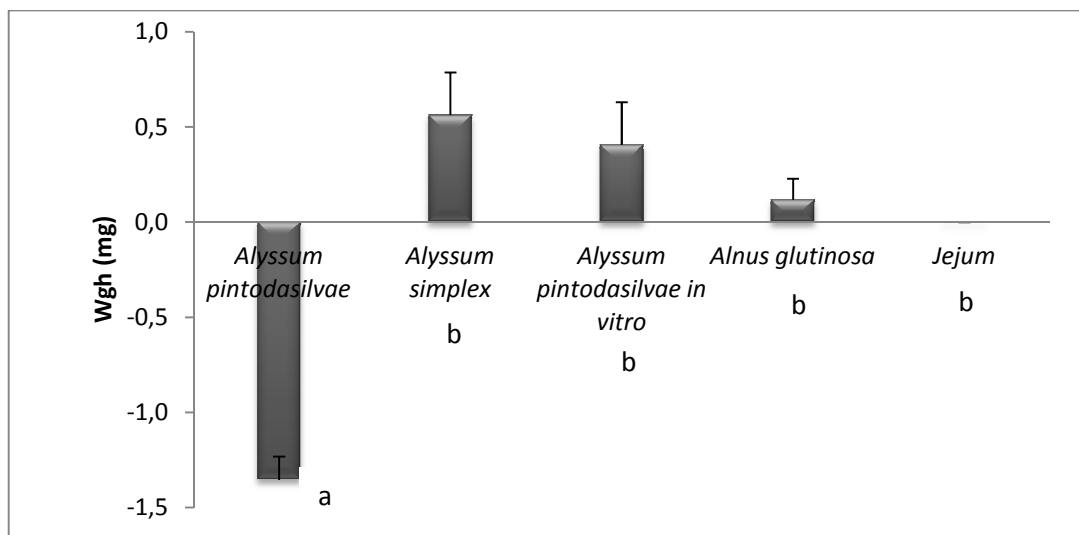


Figura 19. Variação de peso (Wgh) de *Porcellio dilatatus* sujeitos a dieta com folhas de *Alyssum pintodasilvae*, de *Alyssum simplex*, de *Alyssum pintodasilvae in vitro* e de *Alnus glutinosa*, após 32 dias de ensaio. Médias de 2 repetições para *Alyssum pintodasilvae*, 4 repetições para *Alyssum simplex* 11 repetições para *Alyssum pintodasilvae in vitro*, 10 repetições para *Alnus glutinosa* e 7 repetições para Jejum. As barras representam os erros padrão. Letras diferentes significam que as médias são significativamente diferentes ($p<0,05$), segundo o teste de Fisher LSD.

Em *A. pintodasilvae* observou-se uma acentuada perda de peso, pois foi o tratamento onde ocorreu menor consumo de folhas. Nos isópodes sujeitos a dieta com folhas de *A. pintodasilvae* sem Ni verificou-se aumento de peso. Este resultado indica que as defesas contra agentes bióticos em *A. pintodasilvae* são praticamente inexistentes quando a hiperacumulação de Ni não ocorre nesta planta, mais uma evidência da importância no uso deste elemento na proteção anti-herbivoria. O aumento de peso dos isópodes sujeitos a dieta com folhas de *A. simplex* (apesar de não terem sido evidenciadas diferenças no consumo de folhas) foi significativamente diferente de *A. pintodasilvae*, o que pode indicar que o mecanismo de defesa em *A. simplex* não é tão

eficaz como a defesa elementar de Ni na planta hiperacumuladora, permitindo aos isópodes alimentarem-se da planta e aumentar ou manter o seu peso.

O Índice de fagodepressão ou fagoestimulação ($P(ds)i$) é a relação existente entre a média da quantidade de folhas consumidas no tratamento e a média do controlo positivo, *A. glutinosa*, e varia entre 0 (máximo de inibição) e 1 (não ocorre inibição). Os valores determinados para *A. pintodasilvae* (0,26), *A. simplex* (0,82) e *A. pintodasilvae in vitro* (1,0) mostram que a fagodepressão foi mais acentuada em *A. pintodasilvae* e em *A. simplex* foi menos acentuada, e em *A. pintodasilvae in vitro* verificou-se que ocorreu fagoestimulação (figura 20 e Tabela II).

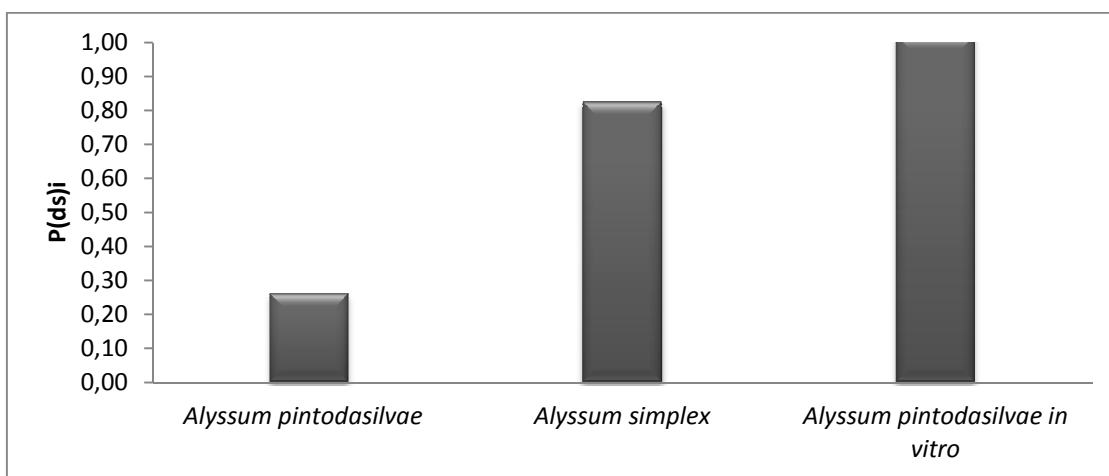


Figura 20. Índice de fagodepressão em *Porcellio dilatatus* sujeitos a dieta com folhas de *Alyssum pintodasilvae*, de *Alyssum simplex*, de *Alyssum pintodasilvae in vitro* e de *Alnus glutinosa*, após 32 dias de ensaio. Médias de 2 repetições para *Alyssum pintodasilvae* Alimonde, 4 repetições para *Alyssum simplex*, 11 repetições para *Alyssum pintodasilvae in vitro* e 10 repetições para *Alnus glutinosa*.

O presente estudo é um dos poucos realizados com o objetivo de avaliar as consequências da hiperacumulação de metais pelas plantas nos processos de decomposição (Boyd&Martens, 1998; Boyd, 2004; Gonçalves *et al*, 2007).

Em síntese, os resultados deste estudo apoiam a hipótese do Ni constituir uma defesa elementar na hiperacumuladoras *A. pintodasilvae*.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que as elevadas concentrações de Ni nas folhas de *A. pintodasilvae* exercem um efeito tóxico sobre *P. dilatatus*, atuando como uma defesa elementar contra estes isópodes detritívoros assim como se tem vindo a verificar em relação aos outros herbívoros em geral (Boyd & Martens, 1994; Boyd & Moar, 1999; Boyd & Jhee, 2005; Behmer *et al*, 2005; Jhee *et al*, 2006).

Tal como sugerido em Gonçalves *et al*, (2007), os resultados do presente estudo apontam para a hiperacumulação de Ni constituir um problema para os isópodes, sendo de esperar taxas de decomposição menores da matéria orgânica de *A. pintodasilvae*. Por outro lado, não é de descartar a existência de isópodes tolerantes aos metais em nichos de áreas metalíferas ou serpentínicas, em resultado de coevolução (Pollard, 2000; Boyd, 2004).

Utilizando duas plantas do mesmo género, inicialmente pensou-se que a ação sobre *P. dilatatus* seria muito distinta, uma vez que uma planta hiperacumula um metal e a outra planta não. No entanto, os dados obtidos evidenciam que a ação das duas plantas de *Alyssum* é algo semelhante, apesar de ter sido mostrado que *A. pintodasilvae* exerce um efeito tóxico muito mais elevado nos isópodes.

Tabela II – Mortalidade, Tempo médio de sobrevivência, quantidade de folhas consumidas (QFC), Índice de fagodepressão/estimulação (P(ds)i) e variação de peso (Wg) de *Porcellio dilatatus* quando sujeitos a folhas condicionadas de *Alyssum pintodasilvae* colhido em Alimonde e cultivado *in vitro*, *Alyssum simplex* e *Alnus glutinosa*.

	<i>Alyssum pintodasilvae</i>	<i>Alyssum simplex</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	<i>Alyssum pintodasilvae in vitro</i>	Jejum	
Mortalidade (%)	83,33 ± 1,85	66,67 ± 1,47	8,33 ± 1,91	8,33 ± 1,28	41,67±2,24	
Tempo médio de sobrevivência	28,7 ± 1,85	30 ± 1,47	30 ± 1,91	30,7 ± 1,28	28 ± 2,254	
QFC (mg)	13,0 ± 10,6	41,2 ± 19,4	50,0 ± 8,31	50,9 ± 17,96		F _{0,05(3)3,29} = 3,752 p<0,05
Wg (mg)	-13,6 ± 12,35	5,63 ± 2,24	1,18 ± 1,04	4,07 ± 2,23	-0,2857±5,38	F _{0,05(4)4,27} = 3,752 p<0,05
P(ds)i	0,26	0,84		1,00		

CONCLUSÕES

Os indivíduos de *P. dilatatus* alimentados com folhas colhidas de uma população de *A. pintodasilvae* responderam significativamente de modo diferente que os indivíduos alimentados com as folhas dos outros tratamentos, o que indica efeitos do Ni na proteção contra herbívoros, apoiando a hipótese de defesa anti-herbivoria, atualmente mais aceita como explicação para a hiperacumulação de metais por parte das plantas.

Neste estudo pretendeu-se avaliar o efeito da hiperacumulação em organismos do nível trófico decompositor, tendo-se verificado uma elevada indução de mortalidade nos detritívoros alimentados com *A. pintodasilvae*. Este resultado é consequência dos efeitos tóxicos do Ni ocorrido após ingestão das folhas, demonstrado pelas diferenças significativas entre os dois tratamentos de *A. pintodasilvae* e pelo tratamento sujeito a jejum, que esclareceu que a morte dos isópodes se deve à ingestão das folhas.

Os resultados relativos a *A. simplex* foram inconclusivos, uma vez que não ocorreram diferenças significativamente diferentes em todos os parâmetros. No entanto, pela análise dos resultados é possível observar diferenças relativamente ao tratamento com *A. pintodasilvae* colhido na natureza. A repetição dos ensaios de não escolha com plantas de *A. pintodasilvae* cultivadas com diferentes níveis de Ni e a realização de ensaios de escolha poderiam esclarecer quanto aos mecanismos de defesa de *A. simplex*, uma vez que o seu estatuto de não acumuladora foi verificado.

Os resultados desta dissertação apoiam a hipótese de que a hiperacumulação de Ni em *A. pintodasilvae* fornece uma defesa elementar contra a ação herbívora de *P. dilatatus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, A.A. and FISHBEIN, M. 2006. Plant defense syndromes. *Ecology*. 87:S132-S149.

ALMEIDA, R.F. 2012. Plantas acumuladoras de metais pesados no solo – uma revisão. *Revista de Biotecnologia & Ciência* 2:28-46.

ALVES, S., NABAIS, C., SIMÕES GONÇALVES, MDE L., CORREIA DOS SANTOS, MM. 2011. Nickel speciation in the xylem sap of the hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* ssp. *Lusitanicum* growing on serpentine soils of northeast Portugal. *Journal of Plant Physiology* 168:1715–1722.

ALVES, S., MARIA ASCENSÃO TRANCOSO, MARIA DE LURDES SIMÕES GONÇALVES, MARGARIDA M. CORREIA DOS SANTOS. 2011. A nickel availability study in serpentinised areas of Portugal. *Geoderma* 164:155–163.

ANGLE, J.S. ALAN J. M. BAKER, STEVEN N. WHITING, RUFUS L. CHANEY. 2003. Soil moisture effects on uptake of metals by *Thlaspi*, *Alyssum* and *Berkheya*. *Plant and Soil*. 256. 325-332.

ANTONOVICS, J, A.D. BRADSHAW, R.G. TURNER. 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.* 7:1–85.

ASENSI, A., RODRÍGUEZ, N.; DÍEZ-GARRETAS, B.; AMILS, R.; FUENTE, V. DE LA. 2004. Nickel hyperaccumulation of some subspecies of *Alyssum serpyllifolium* (Brassicaceae) from ultramafic soils of Iberian Peninsula. In: Boyd RS, Baker AJM, Proctor J, editors. Ultramafic rocks: their soils, vegetation and fauna. Proceedings of the IV International Conference on Serpentine Ecology, 2003, April 21 – 26 Havana, Cuba. *Science Reviews*. 263 – 265.

BAINI, F., PITZALIS, M., TAITI, S., VIGNA TAGLIANTI, A., ZAPPAROLI, M., BOLOGNA, M.A. 2012. Effects of reforestation with *Quercus* species on selected arthropod assemblages (Isopoda Oniscidea, Chilopoda, Coleoptera Carabidae) in a Mediterranean area. *Forest Ecology and Management* 286. 183–191.

BAKER, A.J.M., & BROOKS, R.R. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution, ecology, and phytochemistry. *Biorecovery*. 1:81–126.

BANI, A., PAVLOVA D., ECHEVARRIA, G., MULLAJ, A., REEVES, R.D., MOREL, J.L. AND SULÇE, S. 2010. Nickel hyperaccumulation by the species of *Alyssum* and *Thlaspi* (Brassicaceae) from the ultramafic soils of the Balkans. *Botanica Serbica*. 34:3-14.

BARRUETO CID, LP. 2010. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Embrapa/Cenargen – Área de Biologia Celular.

BEHMER, S.T., LLOYD, C. M., RAUBENHEIMER, D., STEWART-CLARK, J., KNIGHT, J., LEIGHTON, R.S., HARPER, F.A. AND SMITH, J.A.C. 2005. Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defense against insect herbivores. *Functional Ecology*. 19:55-66.

BORGHESAN, M., MORAES, L.K.A.; MOREIRA, F.M.; LIMA DA SILVA, A. 2003. In vitro propagation and evaluation of morphophysiological parameters of grapevine rootstocks. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 38:783-789.

BOTELHO, F., SILVA, C., CRUZ, F. 2009. Epidemiologia explicada – análise de sobrevivência. *Acta Urológica* 26:33-38.

BOYD, R.S. AND MARTENS, S.N. 1998. Nickel Hyperaccumulation by *Thlaspi montanum* var. *montanum* (Brassicaceae): A Constitutive Trait. *American Journal of Botany*, 85:259–265.

BOYD, R.S. AND MARTENS, S.N. 1998. The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology* 8:1–7.

BOYD, R.S. AND MOAR, W.J. 1999. The defensive function of Ni in plants: response of the polyphagous herbivore *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to hyperaccumulator and accumulator species of *Streptanthus* (Brassicaceae). *Oecologia*. 118. 218-224.

BOYD, R.S. AND MARTENS, S.N. 1999. Aphids are unaffected by the elemental defence of the nickel hyperaccumulator *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae). *Chemoecology* 9:1–7.

BOYD, R.S., DAVIS, M.A., WALL, M.A., BALKWILL, K. 2002. Nickel defends the South African hyperaccumulator *Senecio coronatus* (Asteraceae) against *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonidae). *Chemoecology* 12:91–97.

BOYD, R.S. 2004. Ecology of metal hyperaccumulation – Comentary. *New Phytologist* 162:563–567.

BOYD, R.S. AND JHEE, E.M. 2005. A test of elemental defence against slugs by Ni in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator *Streptanthus* species. *Chemoecology* 15:179–185.

BOYD, R.S., WALL, M.A., JAFFRÉ, T. 2006. Nickel levels in arthropods associated with Ni hyperaccumulator plants from an ultramafic site in New Caledonia. *Insect Science* 13:271-277.

BOYD, R.S. DAVIS, M.A., MICHAEL A. WAL, M.A., BALKWILL, K. 2006. Metal concentrations of insects associated with the South African Ni hyperaccumulator *Berkheya coddii* (Asteraceae). *Insect Science* 13:85-102.

BOYD, R.S. 2007. The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant Soil*. 293:153-176.

BOYD, R.S. 2007. *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) tolerates high concentrations of dietary nickel. *Insect Science*. 14:201-205.

BOYD, R.S. DAVIS, M.A., MICHAEL A. WAL, M.A., BALKWILL, K. 2007. Host-herbivore studies of *Stenoscepa* sp. (Orthoptera: Pyrgomorphidae), a high-Ni herbivore of the South African Ni hyperaccumulator *Berkheya coddii* (Asteraceae). *Insect Science*. 14:133-143.

BOYD, R.S., DAVIS, M.A.; BALKW, K. 2008. Elemental patterns in Ni hyperaccumulation and non-hyperaccumulating ultramafic soil populations of *Senecio coronatus*. *South African Journal of Botany*. 74:158-162.

BOYD, S.R. 2009. High-nickel insects and nickel hyperaccumulator plants: A review. *Insect Science*. 16:19-31.

BOYD, R.S., DAVIS, M.A., MICHAEL A. WAL, M.A., BALKWILL, K. 2009. Host plant selection of *Chrysolina clathrata* (Coleoptera: Chrysomelidae) from Mpumalanga, South Africa. *Insect Science* 16:81-88.

BROOKS, RR. AND RADFORD, CC. 1978. Nickel accumulation by European species of the genus *Alyssum*. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 200:217-224.

BROOKS, RR. 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks RR, editor. Plants that hyperaccumulate heavy metals. New York, USA: CAB International. 55-94.

BROOKS, R.R. ROBINSON, B.H.; HOWES, A.W.; CHIARUCCI, A. 2001. An evaluation of *Berkheya coddii* Roessler and *Alyssum bertolonii* Desv. for phytoremediation and phytomining of nickel. *South African Journal of Science*. 97:558.

BUTLER, C.D. AND TRUMBLE, J.T. 2008. Effects of pollutants on bottom-up and top-down processes in insect-plant interactions. *Environmental Pollution*. 156:1-10.

CALHÔA, C.F., SOARES, A.M., MANN, R.M. 2006. Cadmium assimilation in the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus* – Is trophic transfer important? *Science of the Total Environment* 371:206–213.

CALHÔA, C.F., MONTEIRO, M.S., SOARES, A.M., MANN, R.M. 2011. The influence of metal speciation on the bioavailability and sub-cellular distribution of cadmium to the terrestrial isopod, *Porcellio dilatatus*. *Chemosphere* 83:531–537.

CALHÔA, C.F., SOARES, A.M., LOUREIRO, S. 2012. Effects on survival and reproduction of *Porcellio dilatatus* exposed to different Cd species. *Ecotoxicology* 21:48–55.

CALLAHAN, D.L., ROESSNER, U., DUMONTET, V., DE LIVERA, A.M., DORONILA, A., BAKER, A.J., KOLEV, S.D. 2012. Elemental and metabolite profiling of nickel hyperaccumulators from New Caledonia. *Phytochemistry* 81:80–89.

CASEIRO, I. SANTOS, S., SOUSA, J.P., NOGUEIRA, A.J., SOARES, A.M. 2000. Optimization of Culture Conditions of *Porcellio dilatatus* (Crustacea: Isopoda) for Laboratory Test Development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 47:285-291.

CHANEY, R.L., CHEN, KUANG-YU, LI, YIN-MING, ANGLE, J.S., BAKER, A.J.M. 2008. Effects of calcium on nickel tolerance and accumulation in *Alyssum* species and cabbage grown in nutrient solution. *Plant Soil* 311:131–140.

CHEN, C., HUANG, D., LIU, J. 2009. Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *Clean – soil, air, water*. 37:304 – 313.

COLEY, P.D. AND BARONE, J.A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 27:305–35.

COLEMAN, C.M., BOYD, R.S., EUBANKS, M.D. 2005. Extending the elemental defense hypothesis: dietary metal concentrations below hyperaccumulator levels could harm herbivores. *Journal of Chemical Ecology* 31:1669-81.

CORREIA, M.E.F., AQUINO, A.M. e AGUIAR-MENEZES, E.L. 2008. Aspectos ecológicos dos Isopoda terrestres. *Embrapa Agrobiologia*.

DAVIS, M.A., PRITCHARD, S.G., BOYD, R.S. AND PRIOR, S.A. 2001. Developmental and Induced Responses of Nickel-Based and Organic Defenses of the Nickel-Hyperaccumulating Shrub, *Psychotria douarrei*. *New Phytology* 150:49–58.

FERREIRA, Sandra Cristina Matos. 2008. Cultura in vitro e análise multi-loci em populações de uma hiperacumuladora de Ni (*Alyssum pintodasilvae*) das áreas serpentinicas de NE de Portugal: importância para a descontaminação de solo. Tese de Mestrado, Engenharia do Ambiente, Dep. de Engenharia Civil, Fac. de Ciências e Tecnologia, Univ. de Coimbra.

FREEMAN, J.L., QUINN, C.F., MARCUS, M.A., FAKRA, S., PILON-SMITS, E.A. 2006. Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Current Biology*. 16:2181-2192.

FREEMAN, J.L. LINDBLOM, S.D., QUINN, C.F., FAKRA, S., MARCUS, M.A., PILON-SMITS, E.A. 2007. Selenium accumulation protects plants from herbivory by Orthoptera via toxicity and deterrence. *New Phytologist* 175:490-500.

GALARDI, F., MENGONI, A., PUCCI, S., BARLETTI, L., MASSI, L., BARZANTI, R., GABBRIELLI, R., GONNELLI, C. 2007. Intra-specific differences in mineral element composition in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*: A survey of populations in nature. *Environmental and Experimental Botany*. 60:50-56.

GALEAS, M.L., KLAMPER, E.M., BENNETT, L.E., FREEMAN, J.L., KONDRATIEFF, B.C., QUINN, C.F., PILON-SMITS, E.A. 2008. Selenium hyperaccumulation reduces plant arthropod loads in the field. *New Phytologist*. 177:715-724.

GARCÍA-BARRIUSO, M., FERNÁNDEZ-CASTELLANO, C., ROCHA, J., BERNARDOS, S., AND AMICH, F. 2012. Conservation study of endemic plants in serpentine landscapes: *Antirrhinum rothmaleri* (Plantaginaceae), a serpentinophyte with a restricted geographic distribution. *Plant Biosystems*, 146: 291-301.

GEORGE, E.F., HALL, M.A., DE KLERK, GEERT-JAN. 2008. Plants propagation by tissues culture. Vol.1, *The Background Springer*.

GHADERIAN, S.M., MOHTADI, A., RAHIMINEJAD, M.R., BAKER, A.J. 2007. Nickel and other metal uptake and accumulation by species of *Alyssum* (Brassicaceae) from the ultramafics of Iran. *Environmental Pollution*. 145:293-298.

GONÇALVES, M.T., GONÇALVES, S., PORTUGAL, A., SILVA, S., SOUSA, J., FREITAS, H. 2007. Effects of nickel hyperaccumulation in *Alyssum pintodasilvae* on model arthropods representatives of two trophic levels. *Plant Soil*. 293:177-188.

GRATAPAGLIA, D. AND MACHADO, M.A. 1990. Micropropagação. In: TORRES, A.L.; CALDAS, L.S. eds. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília: ABCTP/EMBRAPA - CNPH, 89 - 164.

HOMER, F.A., MORRISON, R.S., BROOKS, R.R., CLEMENS, J., REEVES, R.D. 1991. Comparative studies of nickel, cobalt, and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. *Plant and Soil* 138:195-2115.

INGLE, R.A., MUGFORD, S.T., REES, J.D., CAMPBELL, M.M. AND SMITH, J.A.C. 2005. Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants. *The Plant Cell* 17:2089–2106.

JHEE, E.M., BOYD, R.S., EUBANKS, M.D. AND DAVIS, M.A. 2006. Nickel hyperaccumulation by *Streptanthus polygaloides* protects against the folivore *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Plant Ecology* 183:91–104.

KARBAN, R., AGRAWAL, A.A. AND MANGE, M. 1997. The benefits of induced defenses against herbivores. *Ecology* 78:1351–1355.

KAZAKOU, E., DIMITRAKOPOULOS, P.G., BAKER, A.J., REEVES, R.D., TROUMBIS, A.Y. 2008. Hypotheses, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biological Reviews*. 83:495-508.

KESSLER, A. AND BALDWIN, I.T. 2002. Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53:299-328.

KHAN, A. G., KUEK, C., CHAUDHRY, T.M., KHOO, C.S., HAYES, W.J. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 21:197-207,

KIDD, P.S AND MONTERROSO, C. 2005. Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp. lusitanicum on mine-spoil soils from Spain. *Science of the Total Environment* 336:1–11.

KIDD, P.S., BECERRA CASTRO, C., GARCÍA LESTÓN, M.D., MONTERROSO MARTÍNEZ, C. 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. *Ecosistemas* 16:26-43.

KRÄMER, U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61:517–34.

KRÄMER, U, COTTER-HOWELLS, J.D., CHARNOCK, J.M., BAKER, A.J.M., SMITH, J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379:635–38.

KRÄMER, U. PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., RASKIN, I., SALT, D.E. 2000. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* 122:1343–53.

KUPPER, H., LOMBI, E., ZHAO, F.J., MCGRATH, S.P. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212:75–84.

KUTYNIOK, M. AND MÜLLER, C. 2012. Crosstalk between above and belowground herbivores is mediated by minute metabolic responses of the host *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 63:6199–6210.

LASAT, M.M., BAKER, A.J.M., AND KOCHIAN, L.V. 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 118:875–83.

LÁZARO, J.D. KIDD, P.S., MONTERROSO MARTÍNEZ, C. 2006. A phytogeochemical study of the Trás-os-Montes region (NE Portugal): Possible species for plant-based soil remediation technologies. *Science of the Total Environment*. 354:265–277.

LOHMANN, M., SCHEU, S., MÜLLER, C. 2009. Decomposers and root feeders interactively affect plant defence in *Sinapis alba*. *Oecologia* 160:289–298.

MA, L.Q., KOMAR, K.M., TU, C., ZHANG, W., CAI, Y., KENNELLEY, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic – a hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature* 409:579–579.

MA, J.F., UENO, D., ZHAO, F.J., MCGRATH, S.P. 2005. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220:731–36.

MACIEL, A.L.R., SILVA, A.B., PASQUAL, M. 2000. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. *Ciência e Agrotecnologia*.24:9-12.

MACNAIR, M.R. 2003. The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* 40:63-105.

MARTENS, S.N. AND BOYD, R.S. 1994. The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia* 98:379-384.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M.C., MORENO, D.A., CARVAJAL, M. 2013. The Physiological Importance of Glucosinolates on Plant Response to Abiotic Stress in *Brassica*. *International Journal of Molecular Science*, 14:11607-11625.

MENEZES DE SEQUEIRA, E. AND PINTO DA SILVA, A.R. (1992) The ecology of serpentinized areas of north-east Portugal. In: Roberts BA, Proctor J (eds)

The ecology of areas with serpentinized rocks. A world view. Kluwer, Dordrecht, 169–197.

MENGGONI, A., HENK, S., JACO, V. 2010. Plants as extreme environments? Ni-resistant bacteria and Ni-hyperaccumulators of serpentine flora. *Plant Soil* 331:5–16.

MILNER, M.J. AND KOCHIAN, L.V. 2008. Investigating Heavy-metal Hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. *Annals of Botany* 102: 3–13.

NEVES, O.S.C., FERREIRA, E.V.O., CARVALHO, J.G., SOARES, C.R.F.S. 2007. Adição de níquel na solução nutritiva para o cultivo de mudas de umbuzeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 31:485-490.

NORET, N., MEERTS, P., TOLRÀ, R., POSCHENRIEDER, C., BARCELÓ, J., ESCARRE, J. 2005. Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates. *New Phytologist* 165:763–772.

NORET, N., MEERTS, P., VANHAELEN, M., DOS SANTOS, A., ESCARRÉ, J. 2006. Do metal-rich plants deter herbivores? A field test of the defense hypothesis. *Oecologia* 152:92-100.

PAES-LEME, V.B., OLIVEIRA-FILHO, E.C., CORDEIRO, M.C.R., NEGATA, T., AQUINO, F.G., MIRANDA, Z.J.G., FRAGOSO, R.R., BARROS, L.M.G., ALMEIDA, J., ANDRADE, L.R.M. 2009. Estudo do mecanismo de hiperacumulação de Ni em plantas nativas do cerrado. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 8:124.

PAKRAVAN, M., BOKAEE, Z.N., BOLOURIAN, S. 2011. A biosystematic study on the four varieties of *Alyssum minus* (Brassicaceae) in Iran. *Iranian. Journal of Botany* 17:55-62.

PALOMINO, M., KENNEDY, P.G., SIMMS, E.L. 2007. Nickel hyperaccumulation as an anti-herbivore trait: considering the role of tolerance to damage. *Plant Soil*. 293:189-195.

PETERSON, L.R., VICTORIA TRIVETT, V., BAKER, A.J.M., AGUIAR, C., POLLARD, A.J. 2003. Spread of metals through an invertebrate food chain as influenced by a plant that hyperaccumulates nickel. *Chemoecology* 13:103–108.

POLACCO, J.C., MAZZAFERA, P., TEZOTTO, T. 2013. Opinion – Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps. *Plant Science* 199–200:79–90.

POLLARD, A.J. 2000. Metal hyperaccumulation a model system for coevolutionary studies. *New Phytologist* 146:179-181.

POLLARD, A.J., POWELL, K.D., HARPER, F.A. AND SMITH, J.A.C. 2002. The Genetic Basis of Metal Hyperaccumulation in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21:539–566.

PRASAD, M.N.V. 2005. Nickelophylous plants and their significance in phytotechnologies. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:113-128.

PRASAD, M.N.V. AND FREITAS, H.M.O. 1999. Feasible biotechnological and bioremediation strategies for serpentine soils and mine spoils. *Electronic Journal of Biotechnology* 2:Issue of April 15.

PRASAD, M.N.V. AND FREITAS, H.M.O. 2003. Metal hyperaccumulation in plants: biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6:Issue of December 15.

PROCTOR, J. (1999) Toxins, nutrient shortage and droughts: the serpentine challenge. *Trends in Ecology & Evolution* 14:334–335.

REEVES, R.D. AND BAKER, A.J.M. 2000. Metal-accumulating plants. In: Raskin I. & B.D. Ensley (eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. John Wiley & Sons, New York, 193-229.

RASKIN, I., SMITH, R.D., AND SALT, D.E. 1997. Phytoextraction of metals using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 18:221-285,

RATHINASABAPATHI, B., MA, L.Q., SRIVASTAVA, M. 2006. Arsenic Hyperaccumulating Ferns and their Application to Phytoremediation of Arsenic Contaminated Sites. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Volume III*. Global Science Books, UK.

RATHINASABAPATHI, B., RANGASAMY, M., FROEBA, J., CHERRY, R.H., MCAUSLANE, H.J., CAPINERA, J.L., SRIVASTAVA, M., MA, L.Q. 2007. Arsenic hyperaccumulation in the Chinese brake fern (*Pteris vittata*) deters grasshopper (*Schistocerca americana*) herbivory. *New Phytology* 175:363-9.

RATHORE, J.S., RATHORE, V., SHEKHAWAT, N.S., SINGH, R.P., LILER, G., PHULWARIA, M. DAGLA, H.R. 2004. Micropropagation of Woody plants. *Plant Biotechnology and Molecular Markers* (Editors), *Anamaya Publishers*, New Delhi, India.

SENGAR, R.S., GUPTA, S., GAUTAM, M., SHARMA, A. AND SENGAR, K. 2008. Occurrence, uptake, accumulation and physiological responses of nickel in plants and its effects on environment. *Research Journal of Phytochemistry*. 2:44-60.

SEREGIN, I.V. and KOZHEVNIKOVA, A.D. 2006. Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53:257–277.

SPSS 2003 SPSS for Windows, Release 12.0, Chicago, IL, USA.

SOUSA, J.P., VINGADA, J.V., LOUREIRO, S., GAMA M.M., SOARES, A.M.V.M. 1998. Effects of introduced exotic tree species on growth, consumption and assimilation rates of the soil detritivore *Porcellio dilatatus* (Crustacea: Isopoda). *Applied Soil Ecology*. 9:399-403.

SOUSA, J.P. 2003. Effects of *Eucalyptus globulus* plantations on soil Collembola and on fauna mediated soil biological processes: Comparison with autochthonous forests. Tese de doutoramento em Biologia (Ecologia) apresentada à Fac. de Ciências e Tecnologia de Coimbra.

TOLDRÀ, R.P., POSCHENRIEDER, C., ALONSO, R., BARCELÓ, D. AND BARCELÓ, J. 2001. Influence of Zinc hyperaccumulation on glucosinolates in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 151:621-626.

THOMÉ, G.C.H., GRESSLER, P.D., SANTOS, G. 2004. In vitro propagation of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln., by organogenesis. *Revista brasileira de Agrociência* 10:197-202.

TRAW, M.B. AND DAWSON, T.E. 2002. Differential induction of trichomes by three herbivores of black mustard. *Oecologia* 131:526–53.

VAN DER ENT, A., ALAN J. M. BAKER, A.J.M., ROGER D. REEVES, R.R., A. JOSEPH POLLARD, A.J., SCHAT, H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362:319–334.

VERBRUGGEN, N., HERMANS, C., SCHAT, H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist* 181:759–776.

VIDAL-TORRADO, P., CARVALHO, S.G., MACIAS, F., SILVA, A.C., CALVO, R. 2006. Gênese de solos derivados de rochas ultramáficas serpentinizadas no Sudoeste de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 30:523-541.

VILAS BOAS, Liliana Andreia Faria. 2010. Defesa anti-herbivoria em *Alyssum pintodasilvae* e *Alyssum simplex*: o papel da hiperacumulação de Ni. Tese de Mestrado, Biologia, Dep. de Ciências da Vida, Fac. de Ciências e Tecnologia, Univ. de Coimbra.

V. de la FUENTE, RODRÍGUEZ, N., DÍEZ-GARRETAS, B., RUFO, L., ASENSI, A., AMILS, R. 2007. Nickel distribution in the hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* Desf. spp. from the Iberian Peninsula. *Plant Biosystems* 141:170–180.

WALL, M.A. AND BOYD, R.S. 2006. *Melanotrichus boydi* (Hemiptera: Miridae) is a specialist on the Nickel hyperaccumulator *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae). *The Southwestern Naturalist* 51:481–489.

WHITTAKER, R.H. & FEENY, P. P. 1971. Allelochemicals, chemical interactions between species. *Science* 171:757-770.

ZAO, F.J., DUNHAM, S.J., MCGRATH. S.P. 2002. Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytologist* 156:27–31.

ZAR, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice Hall International, Upper Saddle River.

e - grafia

- [1] <http://www.infoescola.com/ecologia/herbivoria/>
- [2] <http://www2.mcdaniel.edu/Biology/botf99/herbnew/aprodbc.htm>
- [3] <http://www.azibo.org/flora/flores1.html>
- [4] <http://www.bragancanet.pt/patrimonio/arvamieiro.htm>
- [5] <http://www.plant-identification.co.uk/skye/betulaceae/alnus-glutinosa.htm>
- [6] http://www.arboretum.net/final/html/ficha_202.html
- [7] <http://www.swcoloradowildflowers.com/Yellow%20Enlarged%20Photo%20Pages/alyssum%20parviflorum.htm>
- [8] http://aguiar.hvr.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_fam2.asp?familia=Brassicaceae&ID=1258
- [9] <http://www.insectos.cl/aranas/isopodos.php>
- [10] <http://www.enchantedlearning.com/subjects/invertebrates/isopod/Pillbugprintout.shtml>
- [11] <http://insects.tamu.edu/fieldguide/cimg377.html>
- [12] <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2072.html>
- [13] <http://www.microlabmadeira.com/propagacao>
- [14] <http://www.iucnredlist.org/details/161843/0>
- [15] <http://www.floravascular.com/index.php?spp=Alyssum%20serpyllifolium>
- [16] <http://www.flora-on.pt/index.php?q=Alyssum+serpyllifolium>
- [17] <http://www.menudanatura.com/2012/01/alyssum-simplex-rudolphi.html>
- [18] <http://plantas-e-pessoas.blogspot.pt/2009/06/alyssum-serpyllifolium-subsp.html>

ANEXOS

Table 1. Brassicaceae that accumulate nickel (Ni) (for details refer to Palmer et al., 2001).

Metal (mg.g ⁻¹ d.wt.)	Taxa	Distribution
1050	<i>Cardamine resedifolia</i> L.	Italy
1280	<i>Alyssum singarense</i> Boiss. and Hausskn.	Iraq
2000	<i>Thlaspi bulbosum</i> Spruner ex Boiss.	Greece
2440	<i>T. japonicum</i> H.Boissieu	Japan
3000	<i>T. epirotum</i> Halacsy	Greece
3140	<i>Pseudosempervivum sempervivum</i> Boiss and Balansa) Pobed	Turkey
3420	<i>Alyssum tenium</i> Halacsy	Greece
3960	<i>A. fallacinum</i> Hausskn	Crete
4000	<i>Thlaspi ochroleucum</i> Boiss. and Heldr.	Greece
4480	<i>Alyssum alpestre</i> L	Southern Europe
4550	<i>A. euboicum</i> Halacsy	Greece
4590	<i>A. obovatum</i> (C.A.Mey) Turez	Russia
4900	<i>A. condensatum</i> Boiss. and Hausskn.	Iraq, Syria
5530	<i>Thlaspi montanum</i> L. var. <i>montanum</i>	USA
6230	<i>Alyssum virgatum</i> Nyar.	Turkey
6600	<i>A. smolikanum</i> Nyar.	Greece
7080	<i>A. murale</i> WealdstandKit	Balkans
7290	<i>A. oxycarpum</i> Boiss. And Balansa	Turkey
7390	<i>A. giosnanum</i> Nyar.	Turkey
7600	<i>A. peltarioides</i> subsp. <i>virgatiforme</i> Nyar.T.R.Dudley)	Turkey
7700	<i>A. floribundum</i> Boiss. and Balansa	Turkey
7860	<i>A. penjwinensis</i> T.R.Dudley	Iraq
8170	<i>A. anatolicum</i> Nyar.	Turkey
9090	<i>A. akamasicum</i> B.L.Burt	Cyprus
10000	<i>A. serpyllifolium</i> Desf	Spain
10200	<i>A. bertolonii</i> subsp. <i>scutarinum</i> Nyar	Balkans
10200	<i>A. syriacum</i> Nyar.	Syria
10400	<i>A. crenulatum</i> Boiss	Turkey
10900	<i>A. callichroum</i> Boiss. And Balansa	Turkey
11400	<i>Bornmulleria</i> sp petri Greuter, Charpipn and Dittrich	Greece
11500	<i>Alyssum eriophyllum</i> , Boiss. and Hausskn.	Turkey
11700	<i>A. discolor</i> T.R.Dudley and Huber-Morath	Turkey
11800	<i>Thlaspi tymphaeum</i> Hausskn.	Greece
11900	<i>Alyssum trapeziforme</i> Nyar.	Turkey
12000	<i>Thlaspi goesingense</i> Halacsy	Greece
12400	<i>T. graecum</i> Jord	Greece
12500	<i>Alyssum heldreichii</i> Hausskn.	Greece
12500	<i>A. robertianum</i> Bernard ex Godronand Gren	Corsica
13400	<i>A. bertolonii</i> Desv.	Italy
13500	<i>A. cilicium</i> Boiss. And Balansa	Turkey
13500	<i>A. corsicum</i> Duby	Corsica
13500	<i>A. huber-morathii</i> T.R.Dudley	Turkey
13600	<i>Thlaspi kovatsii</i> Heuffel	Yugoslavia
13700	<i>Alyssum markgrafii</i> O.E.Schulz	Albania
14800	<i>Streptanthus polygaloides</i> A.Gray	USA
16200	<i>Thlaspi caeruleum</i> J.Presl	Greece
16300	<i>Alyssum chondrogynum</i> B.L.Burt	Cyprus
16500	<i>A. dubertretii</i> gomb	Turkey
16500	<i>A. carcium</i> T.R.Dudleyand Huber-Morath	Turkey
17100	<i>A. troodii</i> Boiss.	Turkey
17600	<i>Pseudosempervivum aucheri</i> (Boiss.) Pobed	Turkey
18100	<i>Alyssum constellatum</i> Boiss.	Turkey
18300	<i>Thlaspi rotundifolium</i> (L.) Gaudin var. <i>corymbosum</i> (Gay)	Central Europe
18900	<i>Alyssum samariferum</i> Boiss. and Hausskn.	Samar
18900	<i>Peltaria dumulosa</i> Post	Asia
19200	<i>Bornmuellaria glabrescens</i> (Boiss and Balansa) Cullen and TR Dudley	Turkey
19600	<i>Alyssum davisianum</i> T.R. Dudley	Turkey
20000	<i>Alyssum cassium</i> Boiss	Turkey
20800	<i>Thlaspi elegans</i> Boiss	Turkey
18300	<i>T. rotundifolium</i> (L.) Gaudin var. <i>corymbosum</i> (Gay)	Central Europe
18900	<i>A. samariferum</i> Boiss. and Hausskn	Samar
21100	<i>A. pinifolium</i> (Nyar.)T.R.Dudley	Turkey
21300	<i>Bornmuellera baldaccii</i> (Degen) Heywood	Greece
22200	<i>Alyssum pterocarpum</i> T.R Dudley	Turkey
22400	<i>A. lesbiacum</i> (P.candargy) Rech.f	Greece
23600	<i>A. cypricum</i> Nyar	Cyprus
24300	<i>A. masmenaeum</i> Boiss	Turkey
26900	<i>Thlaspi jaubertii</i> Hedge	Turkey
27300	<i>T. caeruleum</i>	Germany/Belgium
29400	<i>Alyssum argenteum</i> All	Italy
31000	<i>Thlaspi sylvium</i> (as <i>T. alpinum</i> subsp. <i>sylvium</i>)	Central Europe
31200	<i>Bornmuellaria tymphaea</i> (Hausskn.) Hausskn	Greece
34400	<i>Peltaria emarginata</i> (Boiss.) Hausskn.	Greece
35600	<i>Thlaspi oxyceras</i> (Boiss.) Hedge	Turkey, Syria
52120	<i>Thlaspi cypricum</i> Bornm.	Cyprus