

O milho (*Zea mays* L.) como bioindicador de solo impactado por $Al_2(SO_4)_3$

Corn (*Zea mays* L.) as a bioindicator of soil impacted by $Al_2(SO_4)_3$

Jean Pierre L Ramos^{1,4,6*}, Monique Cominote^{1,4,5,6}, Ludmila S Oliveira^{1,4,5,6}, Ary G Silva^{2,5,6}, Zilma MA Cruz^{3,4,6}

1. Graduando em Ciências Biológicas; 2. Professor Titular V, Bolsista de Produtividade em Pesquisa FUNADESP; 3. Professor Titular II, Bolsista de Produtividade FUNADESP; 4. Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental e Genotoxicidade; 5. Laboratório de Ecologia Funcional; Universidade Vila Velha (UVV). Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha, ES, Brasil. CEP 29101-770.

*Autor para correspondência: jeanlouzada123@gmail.com

Resumo O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea muito difundida no Brasil e, entre todos os cultivares, é a que desperta maior interesse econômico no país. O alumínio (Al^{3+}) é um dos metais que reduzem o crescimento do vegetal, além de ser responsável por alterações fisiológicas e metabólicas. O presente estudo foi desenvolvido com plântulas, de aproximadamente 5 cm de comprimento, expostas à água (controle); e às soluções 15 mg.L^{-1} e 25 mg.L^{-1} de $Al_2(SO_4)_3$. As regas ocorreram diariamente, em volume suficiente para manter o solo úmido sem perda aparente do líquido no fundo do vaso, e foram interrompidas no 35º dia. Durante os 20 dias seguintes, os vegetais foram regados com água corrente. Durante o período experimental, correspondente a: 96 horas, 15, 25, 35, 45 e 55 dias, amostras foliares do segundo par do ramo plagiotrópico foram utilizadas para extração da Fosfatase Ácida (ACP) e ao mesmo tempo, foram realizadas a biometria do caule e determinação do peso seco das raízes. A fosfatase ácida foi inibida em ambos os tratamentos, com resposta significativa após o 25º dia ($p \leq 0.05$). A atividade enzimática foi parcialmente recuperada após suspensão do tratamento, quando comparada ao controle. O comprimento do caule não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ao longo de toda a fase experimental. O peso das raízes expostas ao alumínio foi significativamente menor quando comparados ao controle. Provavelmente, essa redução foi resultado do menor crescimento do sistema radicular fasciculado o que leva à deficiência no processo de absorção de nutrientes. Esses resultados permitem concluir que um solo impactado com sais de alumínio pode interferir no metabolismo, no processo absorptivo do vegetal e, conseqüentemente, na produção vegetal.

Palavras-chave: sulfato de alumínio, fosfatase ácida, gramínea, Poaceae.

Abstract Corn (*Zea mays* L.) is a widespread graminea in Brazil and among all cultivars, is the one of greater economic interest in

the country. Aluminum (Al^{3+}) is one of the metals which reduces plant growth, as well as is responsible for physiological and metabolic alterations. This study was carried out with seedlings about 5 cm long, exposed to water (control), and solutions 15 mg.L^{-1} and 25 mg.L^{-1} of $Al_2(SO_4)_3$. The irrigation occurred daily, and was sufficient to keep soil moisture, without apparent loss of liquid in the bottom of the pot, and were interrupted at the 35th day. During the next 20 days, the plants were wetted with tap water. During the experimental period, corresponding to: 96 hours, 15, 25, 35, 45 and 55 days, leaf samples of the second pair of plagiotrophical were used for the extraction of Acid Phosphatase (ACP), and at the same time, animals were biometrics stem and determine the dry weight of the roots. Acid phosphatase was inhibited in both treatments, with significant response after day 250 ($p \leq 0.05$). The enzymatic activity was partially recovered after discontinuation of treatment compared to the control. Stem length was not significantly different between treatments throughout the experimental phase. The weight of the roots exposed to aluminum was significantly lower when compared to the control. Probably, this reduction was due to lower growth fasciculate roots, which leads to a deficiency in the process of absorption of nutrients. These results suggest that a soil affected with aluminum salts may interfere with the metabolism in the absorptive process plant and, consequently, the production plant.

Keywords: aluminium sulphate, acid phosphatase, grass, Poaceae.

Introdução

No Brasil, o milho (*Zea mays* L.) é o mais conhecido das espécies de Poaceae (Gramineae) e largamente utilizado como

matéria prima em diversos complexos agro-industriais (Galbiatti *et al.*, 2008). De acordo com Fancelli (2003), a espécie apresenta elevado potencial produtivo, porém seu cultivo necessita ser planejado devido sua acentuada sensibilidade a estresse, que influencia no desempenho da planta.

As interações do milho, no aspecto ecológico e etnobiológico, são fundamentais para o entendimento do comportamento da planta quando expostas a estímulos que simulam os agentes bióticos e abióticos. Isto contribui para a minimização do estresse no sistema produtivo (Francielli, 2003). O alumínio, na sua formulação Al^{3+} , é o principal responsável pelos impactos fisiológicos no organismo, além de ser dependente de pH, concentrações de sais, compostos orgânicos, temperatura e espécie vegetal (Machado, 1997; Salvador *et al.*, 2000).

De acordo com Scheffer-Basso *et al.* (2000), os efeitos do metal se iniciam no sistema radicular, com raízes curtas e grossas devido a inibição do crescimento, o que leva à deficiência de absorção de nutrientes, especialmente do fósforo. Estudos têm mostrado que a inibição do crescimento da raiz é o sintoma mais rápido e visível dos danos no sistema radicular, o que pode induzir à deficiência hídrica e mineral como relatado por Echart (2001). Para Magalhães *et al.* (2003), solo com baixos valores de pH tornam o alumínio tóxico, o que induz aos efeitos fisiológicos e enzimáticos, afetando toda a ontogenia do vegetal. Os metais estão distribuídos por toda natureza. Nos solos, são provenientes de rochas além de outras fontes como: precipitação atmosférica, cinzas, calcário, fertilizantes químicos e adubos orgânicos.

As plantas retiram do solo os elementos minerais indispensáveis para seu crescimento. Entretanto, a quantidade de metais aplicado no solo pode representar riscos, de acordo com Tsutya (1999). Segundo Caires *et al.* (2000), a correção da acidez pode ser feita por calagem, metodologia que utiliza a aplicação superficial de calcário com elevação do pH, aumento do Ca^{2+} e redução do Al^{3+} . Entretanto, de acordo com Freitas *et al.* (2006), a calagem só corrige as camadas superficiais do solo permanecendo o subsolo ácido, que continua a interferir nas raízes das plantas sensíveis ao Alumínio, inclusive na absorção e movimentação de fósforo, cálcio, magnésio e molibdênio.

O Al^{3+} é um ligante metálico com preferência por doadores de oxigênio além da elevada afinidade por grupos carboxilas e fosfato, ligando-se aos componentes da parede celular. Existem ainda evidências de que o metal é transportado através da membrana plasmática da raiz atingindo o interior das células. O alumínio pode interagir com os ácidos nucléicos e inibir a mitose nas células do meristema apical da raiz, e esse é um dos prováveis motivos da interferência no desenvolvimento vegetal (Scheffer-Basso *et al.*, 2000). O potencial do Al^{3+} em interagir com sistemas que usam Mg^{2+} ou fosfatos pode inibir vários processos metabólicos reguladas por Ca^{2+} , proteínas regulatórias ligadas a GTP e hexoquinases, acarretando sérias alterações metabólicas (Echart 2001). No presente estudo, o milho foi utilizado como indicador biológico de impactos causados pelo alumínio (Al^{3+}) em solo ácido.

Métodos

Os estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Biomarcadores Ambientais e Genotoxicidade e na casa de vegetação da Universidade Vila Velha - Campus Nossa Senhora da Penha.

As sementes de milho foram germinadas em vasos plásticos contendo solo húmifero e regadas diariamente para evitar estresse hídrico. O sulfato de alumínio foi ajustado para pH 4,0 (com HCl 0,1N ou NaOH 0,1N) de forma a se encontrar como Al^{3+} . Após 10 dias de germinação, vasos com 12 plântulas de ± 5 cm de comprimento foram assim distribuídos: Controle, expostos à água; Tratamento 1, expostos à solução 15 mg.L⁻¹ de $Al_2(SO_4)_3$; e Tratamento 2, expostos à solução 25 mg.L⁻¹ de $Al_2(SO_4)_3$. O período experimental foi de 54 dias. As plântulas foram regadas, diariamente, com 500 mL das respectivas soluções de alumínio. No 34º dia foi suspensa a rega e nos 20 dias seguintes, as plantas receberam somente água corrente.

Para avaliação biométrica, o comprimento da folha e altura do caule foi estimado ao completar 96 horas, 14, 24, 34, 44 e 54 dias de aplicação das soluções. Ao mesmo tempo, duas folhas do segundo par do ramo plagiotrópico foram coletadas para as determinações enzimáticas. Ao final do tempo experimental, as raízes foram lavadas com HCl 0,1 M e água deionizada e colocadas para secagem à 105°C, para a determinação do peso seco.

A atividade da fosfatase ácida (ACP) foi acompanhada de acordo com Barred (1972), porém utilizando p-Nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato. Os tecidos foram homogeneizados em 20 mM tampão acetato de sódio, pH 5,0, em relação 1:5 p/v, e centrifugados a 15,000 g durante 15 minutos a 4°C. Amostras dos sobrenadantes foram incubadas durante 10 minutos em meio de reação contendo 20 mM tampão acetato de sódio, pH 5,0, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM pNPP. A reação foi interrompida pela adição de 1mL NaOH 1M. A formação do p-nitrofenol foi determinada, em triplicata, em 400 nm, em espectrofotômetro Amersham Biosciences, Modelo Ultrospec 2.100 pro, em triplicata. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1 μ M p-nitrofenol/mg proteína/min a 25°C.

A concentração de proteína foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951), usando albumina sérica bovina como padrão.

Resultados

O crescimento foliar durante os dias de exposição às soluções de sulfato de alumínio resultou em diferenças significativas quando relacionado ao controle. Como pode ser observado na Tabela 1, as amostras que receberam 15 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio (T_1), apresentaram desenvolvimento maior do que o controle. Porém, no quarto dia, os vegetais expostos à solução de 25 mg.L⁻¹ (T_2) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, se destacando do controle e T_1 , somente no 24º dia, a partir do qual, foi observado inibição do crescimento.

Tabela 1 Média e Desvio Padrão do crescimento foliar. Os tratamentos foram: controle, T₁ tratamento com sulfato de alumínio 15 mg.L⁻¹, T₂ tratamento com sulfato de alumínio 25 mg.L⁻¹, (n=16).

Exposição (dias)	Controle (cm)	T ₁ (cm)	T ₂ (cm)
0	11,525 ± 1,65	11,858 ± 4,39	8,85 ± 4,80
4	17,65 ± 2,24	19,592 ± 3,98	17,383 ± 3,89
14	19,883 ± 6,45	22,933 ± 5,29	22,075 ± 6,05
24	22,00 ± 6,13	25,842 ± 3,42	28,183 ± 5,52
34	21,692 ± 2,32	23,368 ± 4,01	20,802 ± 2,40

As determinações biométricas, após 10 dias de supressão dos tratamentos, demonstram crescimento acima dos observados para o controle, como pode ser constatado na Tabela 2. A inversão do crescimento ocorreu no 20º dia, quando o controle ultrapassou, em centímetros, os resultados observados para T1 e T2.

Tabela 2 Média e Desvio Padrão do crescimento, após 10 e 20 dias de supressão do tratamento, T₁ tratamento com sulfato de alumínio 15 mg.L⁻¹, T₂ tratamento com sulfato de alumínio 25 mg.L⁻¹, (n=16).

Exposição (dias)	Controle (cm)	T ₁ (cm)	T ₂ (cm)
44	27,325 ± 6,73	32,425 ± 9,67	32,40 ± 4,6
54	41,217 ± 12,31	32,733 ± 6,95	38,26 ± 6,1

Em relação ao peso seco, é possível constatar a redução da biomassa dos tratamentos quando comparado aos controles, o que pode ser observado na Tabela 3. A determinação da atividade da ACP no controle manteve-se constante. Entretanto, no início do tratamento foi possível observar maior inibição da atividade nos indivíduos expostos à concentração 25mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio.

Tabela 3 Média e Desvio Padrão do peso seco das raízes, ao final de 34 dias de exposição ao sulfato de alumínio, T₁ tratamento com sulfato de alumínio 15 mg.L⁻¹, T₂ tratamento com sulfato de alumínio 25 mg.L⁻¹, (n=16).

Controle (g)	T ₁ (g)	Peso ₂ (g)
3,16 ± 2,51	1,206 ± 0,52	1,334 ± 1,11

A partir do vigésimo quinto dia do tratamento, as atividades observadas foram reduzidas quando comparada ao controle, porém sem diferenças significativas entre os tratamentos. A enzima continuou inibida até o 35º dia do tratamento para ambas as concentrações. A partir do momento que ocorreu a supressão do tratamento, o vegetal respondeu com elevação da atividade específica, como pode ser observado na Figura 1.

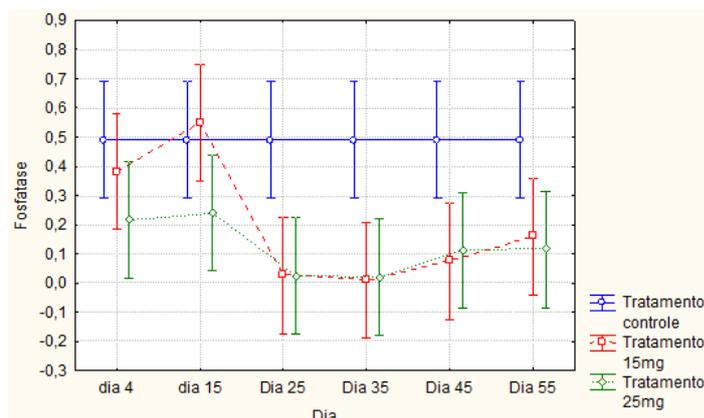


Figura 1 Atividade da Fosfatase Ácida (U/mg de proteína) em folhas de milho *Zea mays* L., expostas ao sulfato de alumínio. Uma unidade foi definida como a quantidade capaz de transformar 1µmol de substrato por minuto. As determinações foram realizadas em triplicata por folha (n=3).

Discussão

O alumínio diminui a produção de plantas economicamente viáveis, quando em solos ácidos. A taxa de tolerância varia entre espécies e esse aspecto do vegetal está relacionado aos diferentes mecanismos metabólicos utilizados. Quando exposto a esses ambientes, o crescimento da raiz é o primeiro a ser afetado o que interfere na eficiência da absorção dos nutrientes. Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de se entender a fisiologia da tolerância, por ser ainda questão não totalmente elucidada (Echart 2001).

Os resultados observados no presente estudo permitem sugerir que a diferença significativa em relação à biomassa seca está relacionada ao menor crescimento do eixo radicular das raízes laterais, o que leva à redução na absorção de nutrientes, como fosfato e potássio. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Gunary e Sutton (1967) e Bevilaqua (2007), que sugerem serem esses nutrientes, essenciais ao aumento da produção de raízes, folhas e frutos. No caso do presente estudo, provavelmente o alumínio tenha interferido ainda na absorção desses nutrientes por complexação ou competição, o que resultou na redução da biomassa seca.

O crescimento foliar, por sua vez, só apresentou inibição a partir do 24º dia, o que é possível sugerir que a interferência na biomassa seca foi mais intensa nesse período, refletindo no metabolismo vegetal. Entretanto, após a supressão do tratamento, ocorreu uma reação positiva do milho. Esses resultados permitem supor que a redução da exposição ao alumínio tenha restaurado o processo de absorção dos outros nutrientes, o que permitiu a restauração de parte de suas funções metabólicas. Outra característica observada na fase experimental foi à mudança de coloração nos tratamentos, que apresentaram aspecto arroxeadado nas folhagens (Figura 2), tanto nos Tratamento T1 e T₂. Esses resultados estão de acordo com os descritos por Rodrigues (2004), que creditaram a coloração observada como característica de deficiência de fósforo e ao acúmulo de antocianina. De acordo com

Oliveira (1979) o alumínio presente nos tecidos radiculares precipita parte do fósforo absorvido (Al-P), diminuindo a quantidade de fósforo destinado às partes aéreas.

A fosfatase ácida foi inibida, em ambos os tratamentos, com resposta significativa após o 25^o dia ($p \leq 0.05$), sem, entretanto, apresentar diferenças significativas entre os tratamentos. A atividade da enzima foi parcialmente recuperada após a suspensão do tratamento quando comparada ao controle. A inibição da enzima pode estar relacionada à reduzida concentração de fosfato, conforme relatado por Starnes *et al.* (2008). O fósforo (HPO_4^{2-}) é um componente de importantes compostos da planta, incluindo açúcares-fosfato, fosfolipídios de membranas, nucleotídeos usados como fonte de energia (ATP) e dos ácidos nucléicos. Esses resultados permitem concluir que um solo impactado com sais de alumínio pode interferir no metabolismo, no processo absorptivo do vegetal e, conseqüentemente, na produção vegetal.

O alumínio diminui a produção de plantas econômicas em solos ácidos e a taxa de tolerância varia entre espécies devido aos diferentes tipos de mecanismos utilizados. Inicialmente o crescimento da raiz é afetado e a eficiência na absorção de nutrientes é diminuída (Echart 2001). Estudos são realizados para o entendimento da fisiologia da tolerância, pois essa é uma questão ainda não elucidada. No milho, o alumínio foi um componente tóxico quando encontrado em altas concentrações afetando o crescimento natural do organismo e desregulando processos bioquímicos.

Agradecimentos

Agradecemos à UVV, à FAPES e à FUNADESP pelo apoio financeiro, e à FUNADESP pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa de Zilma MA Cruz e Ary G Silva.

Referências

- Barred AJ (1972) Lysosomal enzymes. **A Laboratory Handbook**. Amsterdam, North-Holland, pp 46-135.
- Bevilaqua GA, Schiedeck G, Schwengber JE. Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. Circular Técnica, 61 [On line]. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. Disponível em: http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/circular/es/Circular_61.pdf. Acesso em : 26/10/2011.
- Caires EF, Banzatto DA, Fonseca AF (2000) Calagem na superfície em sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 24: 161-169.
- Echart CL, Molina SC (2001) Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural** 31: 531-541.
- Freitas FA, Kopp MM, Souza RO, Zimmer PD, Carvalho FIF, Oliveira AC (2006) Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural** 36: 72-79.

- Fancelli AL (2003) Fisiologia, nutrição e adubação do milho para alto rendimento. **Departamento de Produção Vegetal** Piracicaba, ESALQ/USP.
- Gunary D, Sutton CD (1967) Soil factors affecting plant uptake of phosphate. **The Journal of Soil Science** 18: 167-173.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ Protein (1951) Measurement with the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry** 193: 265-275.
- Machado PLOA (1997) **Considerações Gerais sobre a Toxicidade do Alumínio nas Plantas**. Embrapa documento nº 2.
- Oliveira LEM (1979) Crescimento e comportamento nutricional de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*, Grantz), submetidos a níveis de alumínio. Dissertação de Mestrado: Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.
- Perez SCJGA, Prado CHBA (1993) Efeitos de diferentes tratamentos pré-germinativos e da concentração de alumínio no processo germinativo de sementes de *Copaiifera langsdorffii* desf. **Revista Brasileira de Sementes** 15: 115-118.
- Rodrigues CR, Faquin V, Trevisan D, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Rodrigues TM (2004) Nutrição mineral, crescimento e teor de óleo essencial da menta em solução nutritiva sob diferentes concentrações de fósforo e épocas de coleta. **Horticultura Brasileira** 22: 573-578.
- Salvador JO, Moreira A, Malavolta E, Cabral CP (2000) Influências do alumínio no crescimento e na acumulação de nutrientes em mudas de goiabeira. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 24:787-796.
- Sampaio LR, Severino LS, Leão AB, Sofiatti V, Beltrão NEM, Freire MAO, Silva DMA (2007) Teores de nutrientes em folhas de genótipos de mamoneira cultivados em solo com alto teor de alumínio. In: **II Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel**, Brasília.
- Scheffer-Basso SM, Agnol MD, Caetano JHS, Jacques AVA (2000) Crescimento de plântulas de *Adesmia* spp. submetidas a doses de alumínio em solução nutritiva. **Ciência Rural** 30: 217-222.
- Tsutiya MT (1999) Metais pesados: o principal fator limitante para o uso agrícola de biossólidos das estações de tratamento de esgotos. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental** Rio de Janeiro: ABES, 1999b. p.753-761.