



## Avaliação da morfoanatomia foliar de plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas a fitotoxicidade de chumbo<sup>(1)</sup>.

**Paulo Ivo Silva de Medeiros<sup>(1)</sup>; Karina Patrícia Vieira da Cunha<sup>(2)</sup>, Airon José da Silva<sup>(3)</sup>; Valeska Sophia de Andrade e Silva<sup>(4)</sup>, Islayni Brenda Dantas da Costa<sup>(5)</sup>, Iane Valeska Araújo de Azevêdo<sup>(6)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Licenciado em Pedagogia e Graduando em Ecologia Bacharelado; Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Natal, Rio Grande do Norte; prof.pauloivosm@gmail.com; <sup>(2)</sup> Professora Adjunta; UFRN; <sup>(3)</sup> Professor Adjunto; Universidade Federal de Sergipe; <sup>(4)</sup> Graduanda em Ecologia Bacharelado; UFRN; <sup>(5)</sup> Graduanda em Ecologia Bacharelado; UFRN; <sup>(6)</sup> Graduanda em Ciências Biológicas Licenciatura; UFRN.

**RESUMO:** O chumbo é um potencial contaminante do solo, sendo um agravo tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana. Sua toxicidade é capaz de provocar diversas mudanças anatômicas nas estruturas das plantas, por se tratar de um elemento não-essencial. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi mostrar que o enriquecimento de solução hidropônica nutritiva com chumbo pode modificar o metabolismo e danificar a morfoanatomia de plantas de milho (*Zea mays* L.), a qual representa importante interesse econômico, sendo um potencial fitoextrator de chumbo em solo contaminado por este elemento. As sementes de milho da cultivar São José foram cultivadas em solução nutritiva com doses de 0, 40 e 160  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Pb. Após a coleta das plantas realizou-se cortes transversais da região mediana das folhas (nervura e mesofilo) e analisados os caracteres anatômicos: áreas da nervura, colênquima e floema, espessuras das epidermes abaxial e adaxial e mesofilo e diâmetro do xilema. A presença do chumbo provocou alterações significativas para os parâmetros diâmetro do xilema, área da nervura foliar e espessura da epiderme adaxial, inferindo dizer que esse aumento pode ter sido necessário para o aumento da translocação da seiva contaminada para a parte aérea, minimizando a retenção nas raízes e aumentando na epiderme. A avaliação da morfoanatomia dos tecidos vegetais é uma forma eficaz na identificação de alterações em plantas de milho contaminadas por chumbo e pode ser utilizada para explicar possíveis mecanismos de tolerâncias de plantas de milho cultivadas em ambientes contaminados por este elemento.

**Termos de indexação:** metais, contaminação e poluição.

### INTRODUÇÃO

Metais como o cobre (Cu), o chumbo (Pb) e o zinco (Zn) em altas concentrações podem ocasionar biomagnificação e bioacumulação na cadeia alimentar, podendo diminuir a produção agrícola (Santos et al., 2010). Dentre eles, o chumbo é

considerado o metal pesado com maior risco de envenenamento aos seres humanos e principalmente as crianças (Lasat, 2002), sendo um grave problema socioambiental.

O chumbo é de fácil absorção e acumulação em várias partes das plantas, mesmo não sendo um elemento essencial. Sua absorção é regulada pelo pH, tamanho de partículas, capacidade de troca catiônica (CTC) do solo, entre outras, e se dá através das membranas plasmáticas das células (Lane & Martin, 1977; Hodson, 2012). As raízes possuem a capacidade de acumular significativas quantidades e, concomitantemente, estreitar a passagem para a parte aérea (Lane & Martin, 1977). Além disso, o chumbo é capaz de provocar uma boa redução da matéria seca das plantas (Kosobrukhov et al., 2004).

O chumbo também pode ser capaz de provocar redução do crescimento e desenvolvimento da planta (Romeiro et al., 2006), escurecimento do sistema radicular e clorose (Eun et al., 2000). Romeiro et al. (2007), verificou que o decréscimo do crescimento da *C. ensiformes* é diretamente proporcional ao aumento das concentrações de chumbo aplicadas; e que plantas de espécies como essa, desenvolvidas em sistema hidropônico, são eficientes na fitoextração do Pb.

A fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas verdes para a remoção ou transformação de poluentes do meio, tornando-os menos ofensivos. Em geral, as plantas utilizadas para a fitoextração, possuem habilidade de hiperacumular metais extraídos principalmente nas partes aéreas, tolerância às altas concentrações de metal no solo, rápido crescimento, alta produção de biomassa e fácil colheita (Raskin et al., 1997). A ação da fitorremediação ocorre por assimilação direta e acumulação de metabólitos menos tóxicos ou não-tóxicos nos componentes estruturais do tecido da planta (Pires et al., 2013).

A anatomia vegetal permite averiguar a relação entre alterações fisiológicas, morfoanatômicas e adaptações de plantas sob diferentes condições ambientais, tendo sido muito relevante nesses estudos (Cunha, 2008).



Este trabalho teve como objetivo mostrar que o enriquecimento de solução nutritiva por chumbo pode modificar o metabolismo e danificar a morfoanatomia das plantas e que a crescente concentração desse metal acompanha essas mudanças morfoanatômicas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Em uma casa de vegetação, sementes de milho (*Zea mays* L.) foram esterilizadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) a 6% por dez minutos e lavadas com água destilada. Inicialmente as sementes foram germinadas entre folhas de papel toalha, com a base inferior imersa em uma solução com 0,67 mmol L<sup>-1</sup> de Cálcio (Ca) na forma de nitrato de cálcio tetrahidratado (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O) (Vilela & Anghinomi, 1984). A cultivar de milho usada no experimento foi a São José. Seis dias após a semeadura, duas plantas similares no desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular foram transferidas para vasos plásticos com seis litros de solução nutritiva. Uma lâmina de isopor contendo dois furos equidistantes foi ajustada na parte superior de cada vaso, aproximadamente um centímetro acima do nível superior da solução nutritiva.

Na primeira semana após o transplante das mudas, foi usada metade da concentração da solução nutritiva descrita abaixo. A partir da segunda semana, a concentração integral, a qual foi substituída duas vezes por semana ou quando a condutividade elétrica atingiu o nível mínimo de 0,4 dS m<sup>-1</sup>; e água destilada foi acrescida duas vezes ao dia. O pH (potencial hidrogeniônico) foi ajustado diariamente e/ou toda vez que água destilada foi adicionada aos vasos para completar os seis litros, para pH 6,0 (+/- 0,2). Este ajuste foi efetuado com soluções de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ou hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 mmol L<sup>-1</sup>.

Foi usada a solução nutritiva proposta por Clark (1975) contendo: 7,26; 0,90; 0,07; 1,8; 2,6; 0,60; 0,50 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato); NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (amônio); P (fósforo); K (potássio); Ca; Mg (magnésio); S (enxofre) e Cl (cloro), respectivamente, e 7; 2; 0,5; 19; 0,6 e 38,956; mol L<sup>-1</sup> de Mn (manganês); Zn (zinco); Cu (cobre); B (boro); Mo (molibdênio) e Fe (ferro), respectivamente.

Plantas de milho foram cultivadas em solução nutritiva com doses de Pb de 0; 40; e 160 µmol L<sup>-1</sup>. As análises de anatomia vegetal foram realizadas no Laboratório de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental (LARHISA), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sob microscópio óptico trinocular acoplado com câmera digital para posterior análise das imagens em programas de análise de imagem.

Para as análises anatômicas, após a coleta do experimento, amostras de folhas e raízes foram imediatamente fixadas em solução de FAA 50 (formol, ácido acético e álcool a 50%) por um período mínimo de 24-48 horas até a confecção das lâminas histológicas semipermanentes (Johansen, 1940). Foram realizadas secções transversais da região mediana das folhas (nervura e mesofilo) e raízes. As secções foram clarificadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 30%, neutralizadas em água acética a 1:500, lavadas em água destilada e coradas com azul de astra e safranina para identificação histológica de lignina (em vermelho) e celulose (em azul) (Bukatsch, 1972). Em seguida, as lâminas foram montadas em glicerina aquosa a 50% (Strasburger, 1924), selando-se as bordas das lamínulas com esmalte incolor.

Imagens digitais foram obtidas por meio de câmera digital acoplada a um microscópio óptico trinocular, com posterior medição dos caracteres anatômicos: diâmetro do lúmen das células do xilema, espessura do mesofilo e epidermes adaxial e abaxial, área transversal da nervura foliar, floema e colênquima, em programa de análise de imagem Image Tool (Wilcox et al., 2002). Os dados obtidos dos caracteres anatômicos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (P<0,05) utilizando o Software SAS (SAS, 1999).

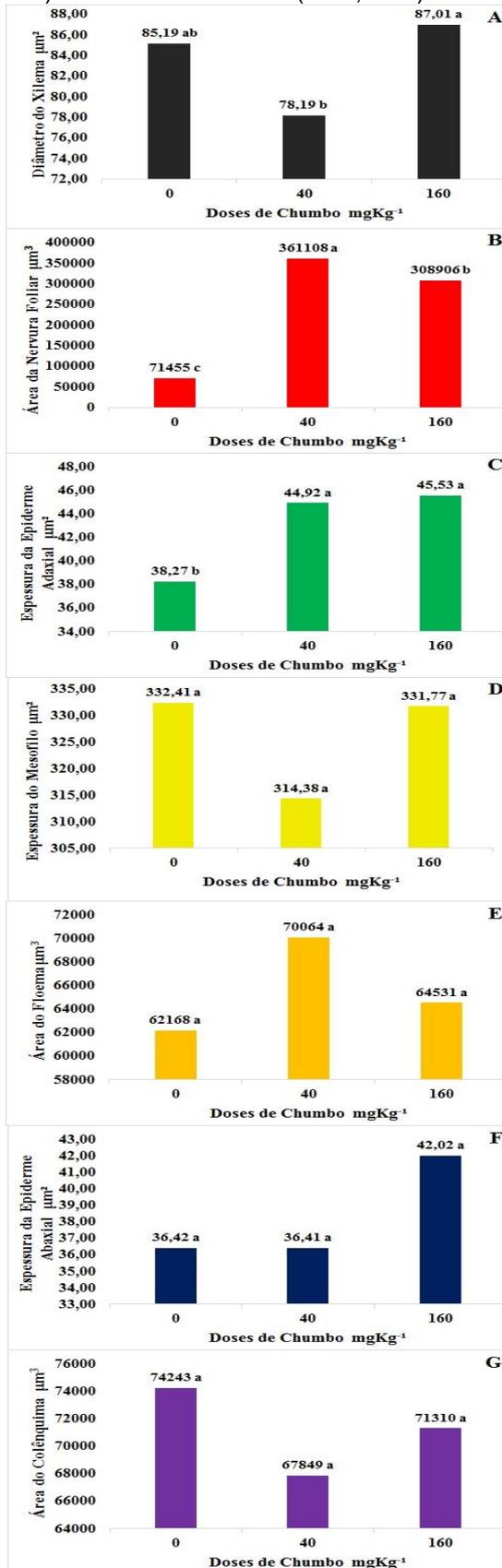
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que o chumbo provocou alterações significativas nas plantas cultivadas em solução nutritiva contaminada com chumbo nos seguintes parâmetros: diâmetro do xilema, área da nervura foliar e espessura da epiderme adaxial (**Figura 1 A, Figura 1 B e Figura 1 C**, respectivamente), porém, não foi observado diferença significativa para as variáveis: espessura do mesofilo, área do floema, espessura da epiderme abaxial e área do colênquima (**Figura 1 D, Figura 1 E, Figura 1 F e Figura 1 G**, respectivamente).

As respostas apresentadas pelo colênquima, mesofilo, epiderme, nervura, xilema e floema nesse estudo (**Figura 1**) evidencia que a capacidade de tolerar o estresse de metais pesados depende da natureza do tecido vegetal (Cunha et al., 2008). As alterações encontradas foram provocadas pela presença do Pb na solução nutritiva, pois este elemento não é essencial ao desenvolvimento das plantas. Por isto, foi possível observar que houve alterações significativas causadas por este metal as plantas de milho, com diferenças estatísticas para as seguintes variáveis: espessura da epiderme adaxial (P= 0,0327); área da nervura foliar (P=



0,0001) e diâmetro do xilema ( $P = 0,0101$ ).



**Figura 1** – Valores de média obtidos pelo Teste Tukey para as variáveis Diâmetro do Xilema (A), Área da Nervura Foliar (B), Espessura da Epiderme Adaxial (C), Espessura do Mesofilo (D), Área do Floema (E), Espessura da Epiderme Abaxial (F) e Área do Colênquima (G) para os tratamentos com 0, 40 e 160 mgKg<sup>-1</sup> de Pb. As diferentes letras (a, ab, b e c) indicam alterações estatisticamente diferentes em cada tratamento.  $P = 0,0101$ ;  $P = 0,0001$ ;  $P = 0,0327$ ;  $P = 0,2760$ ;  $P = 0,1951$ ;  $P = 0,7316$ ;  $P = 0,6638$ , respectivamente.

Conforme Sharma & Dubey (2005), o conteúdo acumulado de Pb nos órgãos vegetais tende a aumentar do caule para a folha e, por conseguinte para a raiz. O xilema, após adição de doses iniciais, apresentou aumento no seu diâmetro, o que pode estar relacionado a uma estratégia da planta em absorver e acumular água para diluir o excesso de metal no interior das células. De acordo com Sandalio et al. (2001), os metais pesados podem afetar o movimento de água na planta, reduzir o tamanho e o número de vasos de xilema e ainda alterar o balanço de hormônios, que estão intimamente relacionados à morfogênese dos tecidos. As paredes celulares funcionam como sítios de alocação de metais, desta forma, um aumento da parede celular colabora de forma positiva para uma maior retenção de metal (Wójcik et al., 2005). Para plantas de milho sob estresse por metais pesados, tem sido reportado o aumento da área do colênquima pela maior produção e concomitante depósito de lignina nesse tecido quando a planta encontra-se exposta a doses tóxicas de metais pesados como Cádmio (Cd) e Zn (Schutzendubel et al., 2001; Vollenweider et al., 2005; Cunha et al., 2008), porém, esse efeito não foi visualizado nesse trabalho onde plantas de milho foram expostas a doses tóxicas de Pb, o que mais uma vez comprova o fato de que a resposta das plantas é metal dependente (Cunha et al., 2008). A indução do metabolismo de polifenóis pelas plantas tem sido atribuída ao desbalanço oxidativo celular resultante de estresses bióticos e abióticos, dentre eles metais pesados (Schutzendubel et al., 2001). De acordo com Vollenweider et al., (2005), a indução do metabolismo de polifenóis parece ser uma estratégia da planta aumentar sítios de ligação na parede celular capazes de complexar o Cd, antes mesmo dele provocar danos oxidativos. Para o Pb, esse não parece ser um mecanismo válido, uma vez que mesmo em doses tóxicas não houve aumento da lignificação do colênquima.

## CONCLUSÕES

As alterações anatômicas das plantas de milho foram dependentes do metal em solução e qualifica Pb como um elemento não essencial e de potencial fitotóxico elevado.



As doses de chumbo não favoreceram alteração do colênquima com o acúmulo de lignina na parede celular.

### AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental (LARHISA), da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, por ter cedido o microscópio óptico trinocular para a medição dos caracteres anatômicos.

### REFERÊNCIAS

- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. Mikrokosmos. 6:255, 1972.
- CLARK, R. B. Characterization of phosphates in intact maize roots. Journal Agriculture Food Chemistry, 23:458-460, 1975.
- CUNHA, K. P. V. Silício como amenizante da fitotoxicidade de cádmio e zinco e tolerância de plantas de milho (*Zea mays* L.) cultivadas em solo contaminado (Tese). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 89f, 2008.
- CUNHA, K. P. V. et al. Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a Cd contaminated soil with and without liming. Journal of Hazardous Materials, 160:228-234, 2008.
- EUN S. O., YOUN, H. S. & LEE, Y. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. Physiologia Plantarum, 110:357-365, 2000.
- HODSON, M. J. Metal toxicity and tolerance in plants. The Biochemist, 34:28-32, 2012.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique. Mc Graw Hill, New York, 1940.
- KOSOBROUKHOV, A., KNYAZEVA, I. & MUDRIK, V. Plantago major plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. Plant Growth Regulation, 42:145-151, 2004.
- LANE, S. D. & MARTIN E. S. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. New Phytologist, 79:281-286, 1977.
- LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. Journal of Environmental Quality, 31:109-120, 2002.
- PIRES, F. R. et al. Seleção de plantas tolerantes ao tebutiuron e com potencial para fitorremediação. Revista Ceres, 50:583-594, 2013.
- RASKIN, I., SMITH, R. D. & SALT, D. E. Phytoremediation do metals: using plants to remove pollutants from the environment. Plant Biotechnology, 8:221-226, 1997.
- ROMEIRO, S. et al. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. Bragantia, 66:327-334, 2007.
- ROMEIRO, S. et al. Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18(4): 483-489, 2006.
- SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany, 52:2115-2126, 2001.
- SANTOS, G. C. G. et al. Vegetable species for phytoextraction of boron, copper, lead, manganese and zinc from contaminated soil. Scientia Agricola, 6:713-719, 2010.
- SAS Institute. Statistical analysis system. Procedure guide for personal computer. Cary, 1999.
- SCHUTZENDUBEL A. et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. Plant Physiology, 127:887-898, 2001.
- SHARMA, P. & DUBEY R. S. Lead toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17(1):35-52, 2005.
- STRASBURGER, E. Handbook of Practical Botany. MacMillan. 532, 1924.
- VILELA, L., & ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de soja afetados pela interação alumínio-fósforo. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 8:91-96, 1984.
- VOLLENWEIDER, P. et al. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.): part II microlocalization and cellular effects of cadmium. Environmental and Experimental Botany, 1-16, 2005.
- WILCOX D. B. et al. Greer Image Tool. University of Texas, Health Science Center, 2002.
- WÓJCIK, M. et al. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*. Environmental and Experimental Botany, 53(1): 163-171, 2005.