



Floresta plantada e fitorremediação: potencial do broto da espécie de *Eucalyptus* na remoção de chumbo

Gabriela Fontes Mayrinck Cupertino¹
Analder Sant'Anna Neto²
Alfredo José dos Santos Júnior²
Fabiola Martins Delatorre¹
Kamilla Crysllayne Alves da Silva²
Ananias Francisco Dias Júnior¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo (gabriela.mayrinck01@gmail.com, fabiolamdelatorre@gmail.com, ananiasjunior@gmail.com), ²Universidade de São Paulo (asneto@alumni.usp.br, alf.junior12@gmail.com, kamialves97@gmail.com)

RESUMO: *A interação entre árvores de rápido crescimento e elementos potencialmente tóxicos como o chumbo é um fator chave para determinar o potencial de uso da espécie em programas de fitorremediação. Mudanças de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* foram cultivadas sob condições controladas no meio de cultura JADS até o desenvolvimento dos explantes. Em seguida, a parte aérea do eucalipto foi exposta a 300 mg Pb L⁻¹ durante 21 dias. Uma folha foi coletada da parte superior (ponta do caule) e realizamos mapas microquímicos 2D para fósforo (P), enxofre (S), potássio (K), cálcio (Ca), manganês (Mn), Ferro (Fe) e chumbo (Pb). Esses elementos apresentaram diferentes padrões de distribuição na folha. Intensidades mais altas foram encontradas em regiões específicas (hotspot) na nervura central, margens das folhas e às vezes na ponta da folha. A concentração média de Pb foi 10 vezes maior que o teor do elemento no meio de cultura, apresentando alguns pontos críticos acima de 10.000 mg Pb Kg⁻¹. Esses resultados destacam o potencial do eucalipto em fitoextrair grandes quantidades de Pb in vitro e a capacidade de translocar o elemento para as partes superiores.*

Palavras-chave: biotecnologia, árvores de rápido crescimento, nutrição mineral

Introdução

O chumbo (Pb) é um dos elementos potencialmente tóxicos mais perigosos e tem sido amplamente liberado no meio ambiente. A fitorremediação é uma técnica de baixo custo, ambientalmente amigável e promissora que pode ajudar a remover os poluentes do solo e das águas subterrâneas. No entanto, a espécie deve apresentar algumas características específicas como absorver e translocar o elemento potencialmente tóxico em altas concentrações. Além disso, deve apresentar taxa de crescimento relativamente estável e alta tolerância ao elemento tóxico (Barker, 1987). A cultura de tecidos vegetais tem sido considerada uma importante ferramenta para pesquisas fundamentais de fitorremediação, fornecendo informações importantes sobre as relações planta-contaminante (Couselo et al., 2012). Muitos sintomas de toxicidade de ao chumbo têm sido relatados, principalmente relacionados à redução do crescimento da planta, clorose, inibição da fotossíntese, distúrbios da nutrição mineral e balanço hídrico (Sharma & Dubey, 2005). Portanto, a parte aérea de



brotos de eucalipto in vitro podem ser capazes de crescer e exportar grandes quantidades de chumbo para as partes superiores em condições de estresse. Além disso, existem alguns elementos que podem aumentar o teor de chumbo em brotos, com possíveis padrões de distribuição espacial e níveis na folha.

Várias espécies de plantas podem hiper acumular potenciais elementos tóxicos do solo. Contudo, estudos que visam investigar espécies amplamente comercializadas no setor florestal ainda são escassos, como por exemplo o eucalipto. Assim, investigamos o potencial de fitoextração de chumbo e a distribuição dos elementos na parte aérea de brotos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, amplamente plantada no Brasil, utilizando o meio de cultura suplementado com 300 mg Pb L⁻¹. Queremos a partir dos resultados fornecer insights sobre o uso do híbrido como estratégia para fitorremediação, ampliando assim a sua aplicabilidade no setor florestal.

Material e métodos

Material vegetal e condições de crescimento

Mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* (F3) foram cultivadas em câmara de crescimento sob temperatura de 26 °C e 16h de fotoperíodo utilizando o meio de cultura JADS descrito por Correia et al. (1995). Cultivamos 16 explantes de eucalipto expostos a 300 mg Pb L⁻¹ durante 21 dias. Uma folha das partes superiores dos brotos foi colhida e colocada em uma porta amostra para realizar a análise μ -XRF.

Os mapas 2D microquímicos μ -XRF e determinação da concentração de Pb

Para determinar a distribuição espacial de P, S, K, Ca, Mn, Fe e Pb nas folhas da parte aérea, usamos a técnica μ -XRF. A análise foi realizada com um espectrômetro de bancada (ORBIS PC, EDAX) no Laboratório de Instrumentação Nuclear, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (CENA/USP), Brasil. As condições operacionais usadas para realizar a análise μ -XRF foram: tubo de raios-X Rh a 40 kV e 300 μ A, detector de desvio de Si (SDD) XRF com 30 mm², tamanho do feixe de raios-X de 30 μ m, filtro de Ni de 25 μ m de espessura e sob vácuo. Os mapas 2D foram realizados usando 32 x 25 de matriz (800 pontos), 3 s de tempo de aquisição por ponto e tempo de morte menor que 10%. O limite foi utilizado para distinguir os elementos do sinal de fluorescência de raios X do ruído (Equação 1).

$$\text{Limite (cps)} = 8,45 \frac{\sqrt{BG}}{t} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: BG = fundo estimado pelo software ORBIS sob o pico característico de raios X (cps); e t = o tempo de aquisição do espectro para cada ponto (s).



Um filme fino de calibração XRF (marca MicroMatter) foi usado para calcular a sensibilidade (S) para o Pb. O fator de absorção foi determinado usando uma folha colocada em um irradiador (disco de metal Pb). A diferença entre a espessura da folha na nervura central e outras regiões f8,45i calculada usando a absorvância da matriz da amostra (disco de metal Cr). Depois disso, a concentração foliar de Pb foi calculada usando a Equação 2.

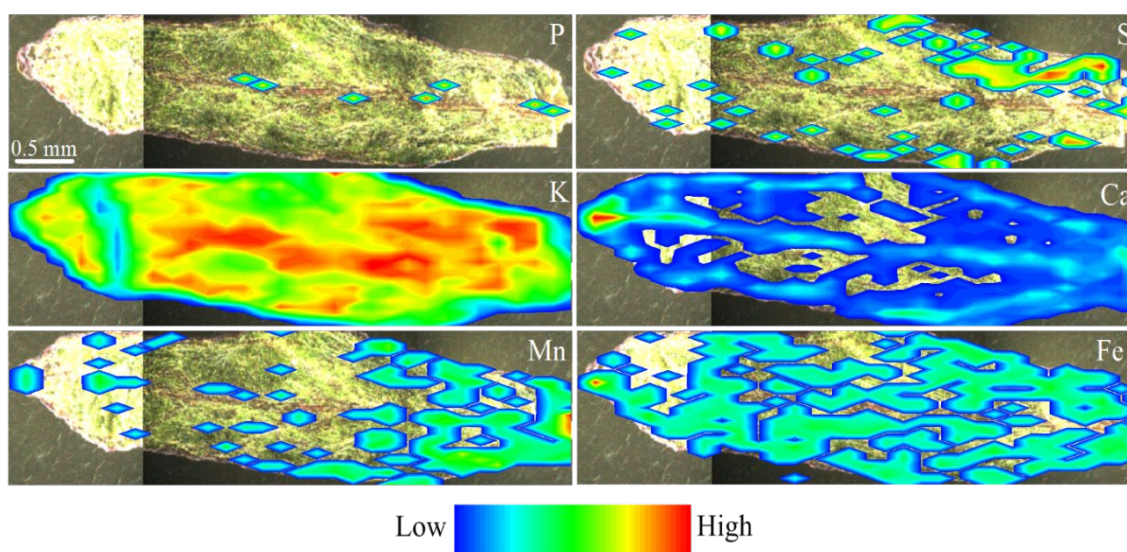
$$C = \frac{I}{sd} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: C = concentração (mg Pb Kg⁻¹); I = intensidade líquida (cps); S = sensibilidade (cps μg cm⁻²); d = densidade foliar superficial (g cm⁻²).

A correlação de Pearson foi utilizada para avaliar as tendências de distribuição espacial entre os elementos ($\alpha=0,01$).

Resultados e discussão

Os mapas microquímicos mostram a distribuição espacial (intensidade líquida) para P, S, K, Ca, Mn e Fe na folha após 21 dias de exposição ao Pb (Figura 1).



Ca, Mn e Fe na folha após 21 dias de exposição ao Pb (Figura 1). O P esteve presente apenas na região da nervura central. O S foi encontrado principalmente nas margens das folhas, porém, o elemento it esteve presente em muitos pontos da área mapeada. O K esteve presente em toda superfície foliar, com maior intensidade na nervura central, apresentando decréscimo em direção à região das margens foliares. O Ca foi encontrado principalmente na nervura central e nas margens das folhas, com as maiores intensidades na ponta das folhas. A maior intensidade de Mn foi encontrada na nervura central próxima à região do pecíolo, o elemento também esteve presente em regiões específicas. O Fe esteve presente em quase todas.



Figura 1. Mapas microquímicos (intensidades líquidas) 2D μ -XRF para P, S, K, Ca, Mn e Fe representando a distribuição espacial na folha híbrida de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* após 21 dias de exposição ao Pb.

A Figura 2A mostra o mapa de distribuição de Pb na folha do híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. A concentração média de Pb na folha foi de 3.987,79 mg kg⁻¹, no entanto, concentrações superiores a 20.000 mg Pb kg⁻¹ foram observadas em pontos críticos específicos na nervura central e margens foliares. O chumbo apresentou concentração média dez vezes maior em relação ao meio de cultura, refletindo uma grande capacidade de absorção das mudas. A concentração de Pb variou de 0,3 a 2,6% da matéria fresca foliar, mais de 0,01% preconizado ao teor desse elemento potencialmente tóxico nas folhas para ser classificado como espécie hiperacumuladora de Pb (Barker et al., 2000). Resultados semelhantes foram encontrados utilizando uma espécie hiperacumuladora de Pb (*Brassica juncea*), também associada ao agente quelante (EDTA), na qual foi observado 1,5% de Pb na parte aérea (Blaylock et al., 1997).

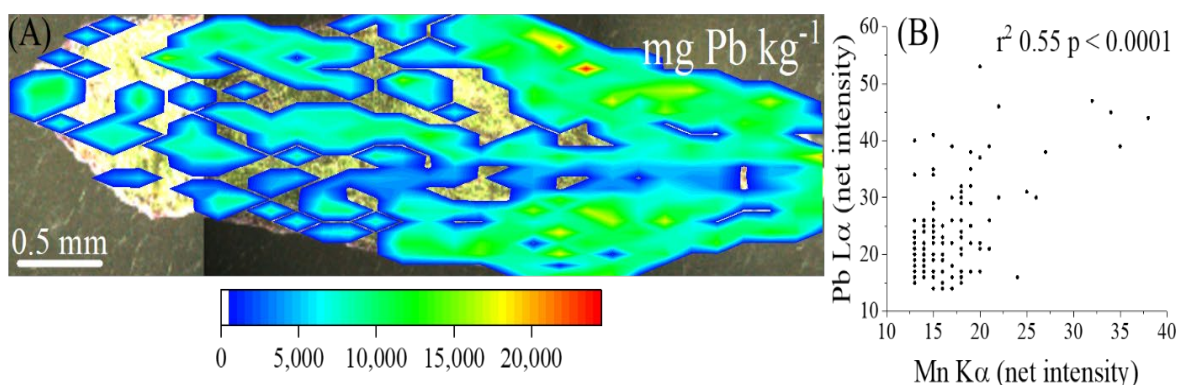
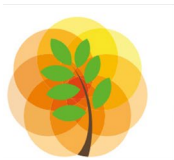


Figura 2. O mapa de Pb mostra a distribuição espacial na folha do híbrido de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* (A). A correlação de Pearson para Pb vs. Mn mostra uma correlação positiva entre os elementos (posição vs. intensidade) (B).

O Mn é um importante ativador enzimático, talvez neste caso, potencializando os processos metabólicos nas regiões onde o Pb está presente em maior concentração (Teixeira et al., 2005). Além disso, o Mn pode ter atuado na proteção do cloroplasto contra os danos do estresse oxidativo através da superóxido dismutase (Alscher et al., 2002). Além disso, é um nutriente importante na fotossíntese. Então, devido à maior produção de biomassa da parte aérea do eucalipto, espera-se uma diluição do teor de Pb, reduzindo assim seus efeitos fitotóxicos. Os demais elementos investigados não tiveram correlação significativa com o Pb.



Conclusão

A parte aérea do eucalipto apresentou grande capacidade de fitoextração do Pb para as partes superiores. P, S, K, Ca, Mn e Fe apresentaram tendências de distribuição espacial específicas, com as maiores intensidades observadas na nervura central, margens foliares e ponta. Também observamos uma correlação positiva entre Pb e Mn considerando a distribuição espacial entre eles na folha analisada. Assim, esses resultados destacam as características potenciais do híbrido de eucalipto para ser usado em programas de fitorremediação em áreas contaminadas com Pb, ampliando sua aplicabilidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao IPEF pelo fornecimento das sementes (lote: AN0373N01) do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis* e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Programa Multiusuário: 2016/19121-8) para permitir a realização da análise μ -XRF.

Referências bibliográficas

- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSSMAN, C.; YORAM KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D.; RASKIN, I. Enhanced accumulation of lead in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, v. 31, p. 860-865, 1997. <http://dx.doi.org/10.1021/es960552a>
- BARKER, A.J.M. Metal tolerance. *New Phytologist*, v. 106, p. 93-111, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04685.x>
- BARKER, A.J.M.; MCGRATH, S.P.; REEVES, R.D.; SMITH, J.A.C. Metal hyperaccumulator plants: A review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for phytoremediation of Metal-Polluted Soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, p. 85-107, 2000.
- CORREIA, D.; GONÇALVES, A.N.; COUTO, H.Y.Z.; RIBEIRO, M.C. Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro*. IPEF, Piracicaba, n. 48/49, p. 107-116, 1995.
- COUSELO, J.L.; CORREDORIA, E.; VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A. Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. *Methods in Molecular Biology*, v. 877, p.247-263, 2012. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_19
- SHARMA, P; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, p. 35-52, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202005000100004>
- TEIXEIRA, F.K.; MENEZES-BENAVENTE, L.; GALVÃO, V.C.; MARGIS-PINHEIRO, M. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. *Genetic and Molecular Biology*, v. 28, p. 529-538, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572005000400007>

