

DESTACADAS DE SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRIL
ABSORÇÃO DE CÁLCIO E FÓSFORO POR RAÍZES
VAR. IAC-2)*

E. MALAVOLTA **
A.F. SOUZA *** I. CHAVES ***
G.S. TUNIN *** J.F. KEFALÁS ***
J.P. DANTAS *** J.F. FERREIRA ***
B.F. AQUINO *** G.A. CAVALCANTI ***
L.L. FOLONI *** F.O.B. MOTA ***
E.G.S. MOREIRA *** E.C. VALLE ***
F.A.M. LIMA ***

RESUMO

A absorção do cálcio e do fósforo por raízes destacadas da soja var. IAC-2 foi estudada com ajuda de traçadores. Foram verificados os efeitos da concentração iônica externa do tempo, do pH, da temperatura, da aeração e de venenos respiratórios. Os dados sugerem que a absorção do cálcio tenha se dado passivamente, sendo ativa a do fósforo. A absorção cresceu com o pH e a temperatura. Os valores das constantes de Michaelis encontrados concordam com os da literatura.

INTRODUÇÃO

Entre as numerosas revisões da literatura sobre a absorção iônica pelas plantas destacam-se algumas mais recentes pelo seu aspecto didático e abrangente: HIGINBOTHAM (1973), HODGES (1973), GAUSH (1972, pp. 61-175), NISSEN (1974), HELLER (1974), HEWITT E SMITH (1974, pp. 72-104), EPSTEIN (1975, pp. 73-125). É pertinente ao presente trabalho o seguinte resumo que diz respeito à absorção do cálcio e fósforo e aos fatores que nela influem.

* Com ajuda da FAPESP, CNEN, CAPES e BNDE. Entregue para publicação em 16/12/1976.

** Departamento de Química e CENA, ESALQ, USP, Piracicaba, SP

*** Estudantes de pós graduação em Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ.

Tempo

Dentro de limites, a absorção iônica em função do tempo obedece a uma relação linear (EPSTEIN & LEGGETT, 1954). HANDLEY & OVERSTREET (1961) e MOORE et al., (1961) observaram que o cálcio do meio externo entrava em rápido equilíbrio com o absorvido por raízes destacadas. Ensaio de curta duração conduzidos com raízes de soja por LEGGETT & GILBERT (1967) indicaram que uma grande parte do Ca está localizada na camada de células epidérmicas onde é fator de modificação da seletividade iônica e da retenção. LEGGETT et al., (1965) mostraram que a absorção de P por raízes destacadas de cevada apresentava reação linear com o tempo durante pelo menos 5 horas.

Concentração iônica externa

De um modo geral o efeito da concentração iônica externa na absorção é definido por uma hipérbole equilátera, quase sempre obedecendo à cinética michaeliana. Dependendo do elemento, uma, duas ou mais isotermas são encontradas (ver EPSTEIN, 1975, pp. 110-117). As altas concentrações externas diminuem o gradiente entre o meio externo e o interno facilitando a absorção, mas, principalmente garantindo a operação de um número maior de moléculas do carregador. HAGEN & HOPKINS (1955) confirmaram a existência de dois sítios para a absorção do P. Os valores da constante de Michaelis, Km, para o $H_2PO_4^-$ variam entre 10^{-5} e 10^{-6} . Em folhas de cafeeiro CRUZ (1973) encontrou Km da ordem de $10^{-4}M$ para o Ca. SALSAC (1966, 1969) mostrou que, nas baixas concentrações, as raízes destacadas duma planta calcícola, *Vicia faba* absorvem mais Ca que as duma calcífuga como *Lupinus luteus*; em doses altas, o contrário se verifica; a velocidade de absorção, mais ou menos constante nas duas espécies até 50 mM, se eleva em seguida mais na calcífuga que na calcícola.

pH

O efeito direto do pH sobre a absorção iônica se faz sentir particularmente em valores muito baixos (3,0 — 4,0) ou acima da neutralidade (8,0 — 9,0): nesses extremos diminui a absorção de Ca e de P podendo mesmo haver perda dos elementos absorvidos por desarranjos na membrana citoplasmática cuja estrutura e funcionamento são afetados. A altos valores de pH os íons OH^- e HCO_3^- podem competir com ânions e, a valores baixos, pode haver competição entre H^+ e cátions (STEWART & SUTCLIFFE, 1959).

Temperatura

Na faixa térmica 10-30°C há uma relação linear entre temperatura e velocidade de absorção. HANDLEY & OVERSTREET (1961) mostraram que a 2°C caía consideravelmente a absorção do Ca.

Arejamento e venenos respiratórios

Dada a dependência do processo ativo de absorção em relação à atividade respiratória como fornecedora de energia, é de se esperar diminuição na absorção iônica pela falta de aeração, pelos venenos respiratórios que bloqueiam a glicólise (como fluoreto) ou o transporte eletrônico (cianeto, sulfeto, monóxido de carbono) ou pelos desacopladores da fosforilação oxidativa (como o 2,4-dinitrofenol, DNP), o que, em geral, a experimentação confirma (EPSTEIN, 1975, pp. 92-93). MOORE et alii, 1961) verificaram que a absorção do Ca por raízes destacadas de cevada não era afetada pela temperatura e pelo DNP no pH 5,0 julgando-se por isso não metabólica; HANDLEY & OVERSTREET (1961) também concluíram ser passiva a absorção do Ca em porções não vacuoladas da raiz sendo ativa naquelas contendo células com vacúolos. SALSAC (1969) mostrou que as curvas de absorção de Ca por *Vicia e Lupinus* em função do tempo atingem uma patamar rapidamente que não se modifica em 12 horas ou mais e que não é influenciado nem pelo abaixamento da temperatura e nem pela adição de DNP tudo se passando como se houvesse apenas penetração no espaço livre aparente (ELA). HELLER (1974), entretanto, aponta várias provas da absorção ativa de Ca em organelas (mitocôndrios e cloroplastos). CRUZ (1973) em cortes de folhas de cafeeiro verificou diminuição na absorção de Ca pelo borbulhamento com N₂, pelo abaixamento da temperatura e pelo DNP pelo que conclui ser metabolicamente mediado o processo.

Inibidores

Considerando um íon qualquer, a presença de outro poderá aumentar, não modificar ou diminuir a sua absorção. O efeito inibitório poderá ser do tipo competitivo ou não competitivo.

Nos ensaios de EPSTEIN & LEGGETT (1954) e de MENZEL & HEALT (1955), o sódio e o magnésio não diminuirão a absorção do Ca enquanto o Sr e o Ba fizeram-no. Para FRIED & BROESHART (1967) a absorção do Ca⁺² é inibida por K⁺, Mg⁺² e Ba⁺². A absorção foliar do Ca foi estimulada por K⁺ e inibida não competitivamente por Mg⁺² (CRUZ, 1973). LOURENÇO et al., (1968) mostraram que a absorção do P é estimulada pelo Mg, enquanto LEGGETT et al. (1965) verificaram que Ca também o faz. Para FRIED & BROESHART (1967) a absorção do P é estimulada por nitrato de cálcio.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das raízes

As raízes de soja var. IAC-2 foram obtidas de acordo com a técnica descrita por MALAVOLTA (1975).

Absorção em função do tempo

O ensaio foi conduzido segundo MALAVOLTA (1975). Os períodos experimentais foram: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 e 240 minutos.

A solução de $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ marcada com P^{32} tinha a concentração de 10^{-4}M ; atividade: $2 \mu \text{ Ci}/100 \text{ ml}$ de solução.

Para estudar a absorção do Ca^{+2} a solução possuía uma concentração final igual a 5×10^{-4} e $2 \mu \text{ Ci}$ de $\text{Ca}^{45}/100 \text{ ml}$.

Este, como os demais ensaios, foram feitos em duplicata; exceto quando indicado, a temperatura era da ordem de $25\text{-}30^\circ\text{C}$.

Efeito da concentração iônica externa

Absorção do P: as concentrações usadas foram 0,01, 0,02, 0,05, 0,10, 0,20, 0,50 e 1,00 mM, sempre em presença de Mg como no ensaio anterior e nos demais.

Absorção do Ca: as concentrações foram as mesmas usadas no ensaio com P.

O período de absorção foi de 1 hora e a concentração com radioisótopos se fez como no primeiro ensaio, o mesmo acontecendo nos demais.

Efeitos do pH

As soluções tiveram o pH ajustado a 3,0 e 6,0 empregando-se HCl 0,1N e NaOH 0,1N.

Período de absorção: 1 hora

Efeito da temperatura

As soluções foram mantidas a 0°C e a 35°C empregando-se respectivamente gelo e um banho de temperatura constante.

Período de absorção: 1 hora

Efeito de veneno respiratório

Foi usado KCN numa concentração final de $5 \times 10^{-3}M$.
Período de absorção: 1 hora

Efeito dos outros íons

A absorção do Ca^{+2} foi acompanhada em presença e ausência de KCl e $MgCl_2$ (concentração final: $10^{-2}M$); a do $H_2PO_4^-$ o foi na ausência e presença de KNO_3 (concentração final $10^{-2}M$).

Período de absorção: 1 hora

Contagem

Terminado o período de absorção as raízes eram lavadas durante 1 minuto em água corrente e depois recebiam 3 lavagens com água destilada. Eram em seguida secas ligeiramente entre folhas de papel absorvente, transferidas para cápsulas de vidro, secas em estufa a $70-80^\circ C$ e contadas usando-se tubo G-M de janela fina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Absorção em função do tempo

Os dados encontram-se na Figura 1 que revela um comportamento diferente dos dois íons. A quantidade de Ca^{+2} absorvida cresce até 45 minutos aproximadamente e depois tende a se estabilizar dando um quadro idêntico ao encontrado por SALSAC (1969) e que em função de dados adicionais foi interpretado como penetração no ELA, conforme já se fez referência. Enquanto isso, a curva descritiva da absorção do $H_2PO_4^-$ não mostrava tendência assintótica nem mesmo no período máximo de absorção que foi de 4 horas, indicando não saturação dos compartimentos e a operação dos mecanismos passivos e ativo, conforme era de se esperar.

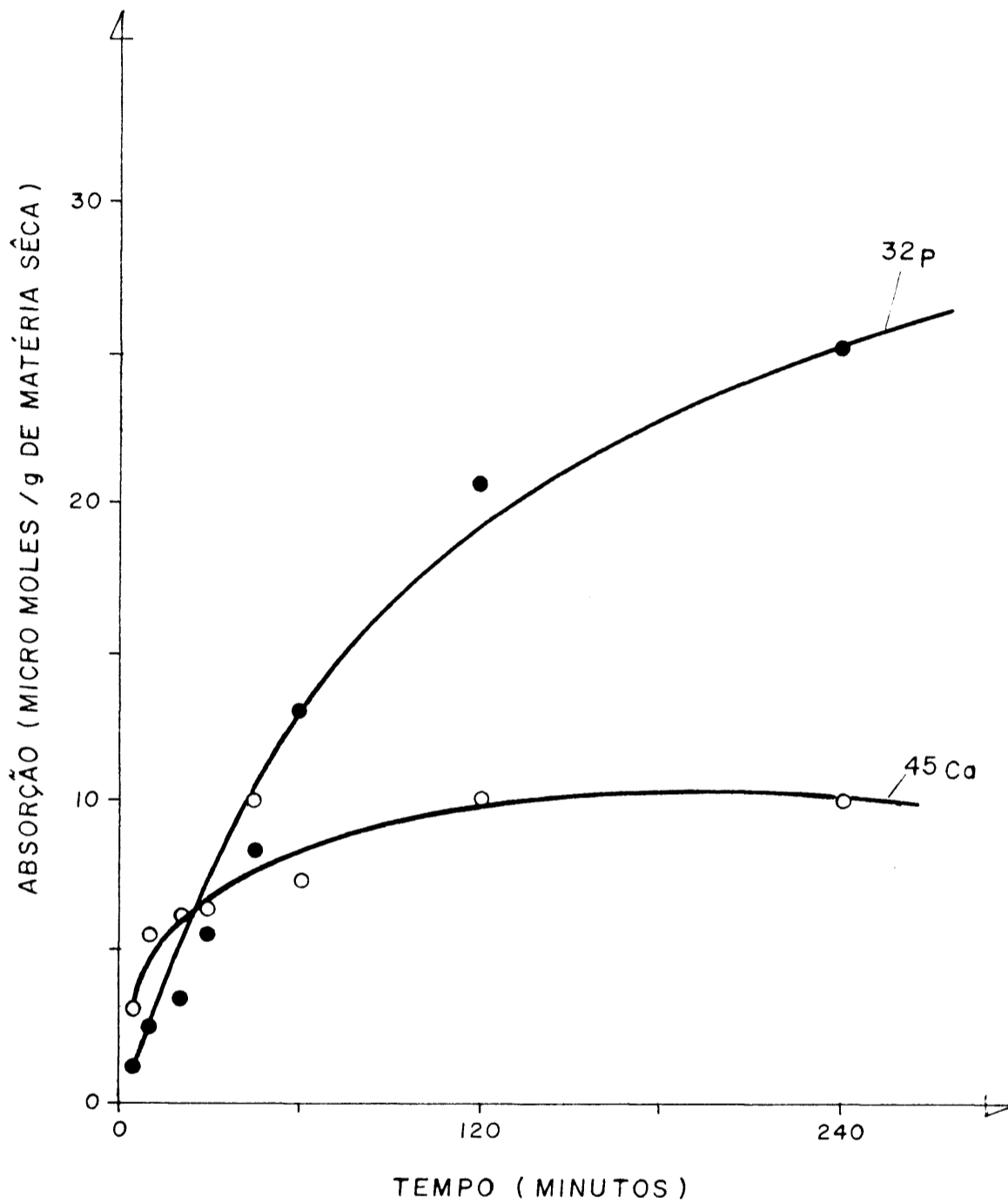


Fig. 1 — Influência do tempo na absorção do cálcio e do fósforo

Concentração iônica externa

A obediência à cinética michaeliana é aparente na Figura 2, no caso dos dois íons. O emprego da transformação de Lineaver & Burk deu os seguintes resultados:

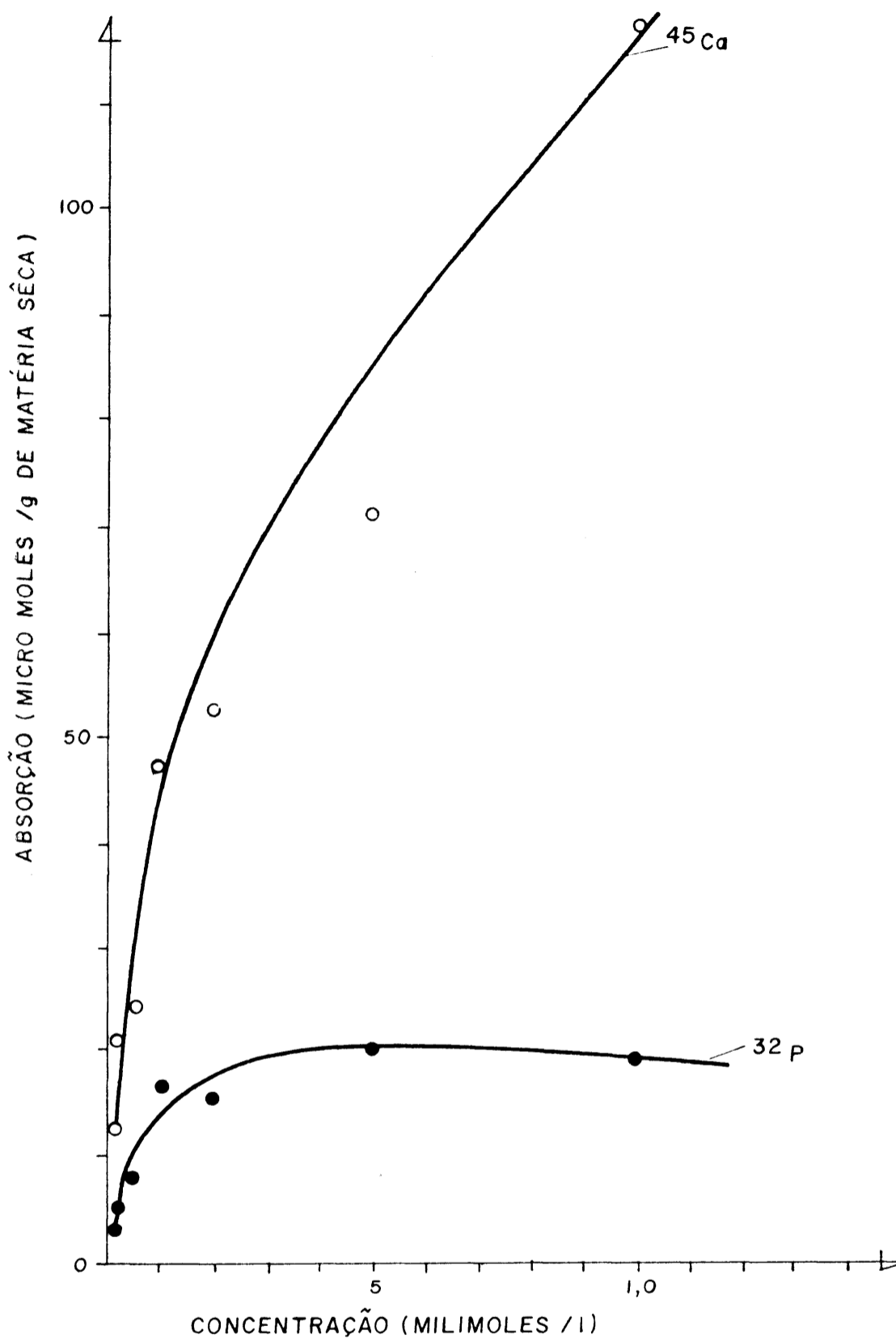


Fig. 2 — Influência da concentração iônica externa na absorção do cálcio e do fósforo

Para o Ca^{+2} — $y = 0,022197 + 0,007096 x$
 $r = 0,977^{***}$ (significativo a 0,1%);

Para o $H_2PO_4^-$ — $y = 0,103245 + 0,004560 x$
 $r = 0,978^{***}$ (significativo a 0,1%).

O alto valor de "r" nos dois casos sugere a operação de mecanismos simples de absorção. Calculou-se o valor da constante de Michaelis e de Vmax, sendo encontrados:

$$\text{Para o } Ca^{+2}: \quad V_{max} = 35 \mu \text{ moles/g x hora}$$

$$\quad \quad \quad K_m = 2,3 \times 10^{-4}M$$

$$\text{Para o } H_2PO_4^-: \quad V_{max} = 9 \mu \text{ moles/g x hora}$$

$$\quad \quad \quad K_m = 4,2 \times 10^{-5}M$$

Efeito do pH

A Tabela 1 fornece os dados obtidos no ensaio sobre o efeito do pH na absorção. Vê-se que no caso dos dois íons o efeito foi significativo a 1% de probabilidade. A elevação de 3 unidades de pH aumentou em 7 vezes a absorção do cálcio e em 3 a do fosfato. Na verdade o efeito da elevação do pH deve ser interpretado como criação de condições favoráveis para a absorção que não existem, como se viu, em pH 3,0 conforme se lê na literatura.

Tabela 1 — Efeito do pH na absorção do cálcio e do fósforo por raízes destacadas de soja

pH	μ moles absorvidos / matéria seca	
	Cálcio	Fosfato
3,0	40,6	10,0
	41,7	9,3
3,6	307,6	34,6
	293,5	28,4
F	1363,13**	47,81**
Dms	30,35	13,7
CV	4,1%	15,4%

** Significativo a 1%

Temperatura

Em números relativos o efeito da temperatura na absorção do cálcio e do fósforo pode ser visto na Tabela 2. A análise estatística dos dados originais mostrou significância ao nível de 5% no caso do P e ausência de significância para a variação na absorção do Ca nos dois tratamentos.

Tabela 2 — Efeito da temperatura na absorção do cálcio e do fósforo por raízes destacadas de soja

Temperatura	Valores relativos	
	Cálcio	Fosfato
0°C	100	100
35°C	394	112
35°C/0°C	~ 4	~ 1

Venenos respiratórios

O efeito do cianeto (Tabela 3) se fez sentir de modo significativo (5% de probabilidade) tão somente na absorção do íon fosfato que foi inibida em exatamente 50%. A natureza do efeito, conhecido desde os trabalhos clássicos de LUNDEGARDH (1939) e de ROBERTSON &

Tabela 3 — Efeito do veneno respiratório sobre a absorção do cálcio e do fósforo por raízes destacadas de soja

Tratamento	Valores relativos	
	Cálcio	Fosfato
Controle	100	100
+ K CN	119	50

WILKINS (1948) foi investigada há pouco por ANDERSON et al., (1974): o envenenamento por CN^- , que causa forte despolarização da membrana, induz também rápido aumento na resistência da mesma; isto sugere que há na verdade um acoplamento mais direto de compostos de redox contendo ferro com a passagem facilitada de íons através da membrana; o veneno respiratório inibiria uma bomba eletrogênica de íons.

Efeito de outros íons

O efeito dos íons K^+ e Mg^{+2} na absorção do Ca^{+2} e de NO_3^- na do fosfato podem ser vistos na Tabela 4, usando-se números índices.

Tabela 4 — Efeito da presença de outros íons na absorção do cálcio e do fósforo por raízes destacadas de soja

Tratamento	Absorção relativa	
	Cálcio	Fosfato
Controle	100	100
+ K ⁺	120	—
+ Mg ⁺²	79	—
+ NO ₃ ⁻	—	97

A análise estatística mostrou significância (a 5%) apenas para o efeito inibitório do Mg⁺² na absorção do cálcio. Embora os dados não permitam a conclusão, é atraente sugerir que se trata de inibição do tipo competitivo dada a semelhança dos dois íons.

RESUMO E CONCLUSÕES

Foram conduzidos experimentos com raízes destacadas de soja var. IAC-2, destinados a esclarecer a natureza do(s) processo(s) de absorção de cálcio e de fósforo e a estudar os fatores externos que a influenciam, tendo sido tiradas as seguintes conclusões principais:

- (1) a absorção do cálcio não segue a cinética michaeliana usual, a evidência sendo a de operação de mecanismo(s) passivo(s);
- (2) a absorção do fósforo é metabólica, ao que parece havendo apenas um mecanismo (ou carregador) em ação;
- (3) o aumento do pH de 3,0 para 6,0 tem acentuado efeito na absorção dos dois íons;
- (4) baixa temperatura e veneno respiratório inibiram a absorção do fósforo mas não a do cálcio;
- (5) o íon magnésio diminuiu a absorção do cálcio mas o potássio não teve efeito; o íon nitrato não influenciou a absorção do fosfato.

SUMMARY

ABSORPTION OF CALCIUM AND PHOSPHORUS BY EXCISED SOYBEAN ROOTS, VAR. IAC-2

This paper deals with experiments designed to study the influence of several external factors on the uptake both of Ca^{+2} and H_2PO_4^- by excised soybean roots.

The main conclusions are as follows:

- 1) Ca uptake does not follow the usual Michaelian kinetics, the evidence suggesting the operation of passive mechanism;
- 2) P uptake is metabolic, a single mechanism being in operation;
- 3) pH has a strong effect both on Ca and P absorption;
- 4) The use both of lower temperature (0°C) and of respiratory poisons (cyanide) inhibited phosphate uptake but had no effect on calcium absorption.
- 5) The absorption of Ca^{+2} was lowered in the presence of Mg^{+2} but not in that of K^+ ; nitrate ions had no detrimental or synergistic effect on the absorption of phosphate.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, W.P.; D.L. HENDRIX & N. HIGINBOTHAM. 1974 — The effect of cyanide and carbon monoxide on the electrical potential and resistance of cell membranes. *Plant Physiol.* **54**:712-716.
- CRUZ, A.D. 1973 — Absorção do cálcio por tecidos da folha do cafeeiro (*Coffea arabica* L., var. Mundo Novo). Tese de Doutorado, ESALQ, Piracicaba.
- EPSTEIN, E. 1975 — Nutrição Mineral das Plantas — Princípios e Perspectivas. Trad. e notas de E. Malavolta. Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. e Editora da USP, São Paulo.
- EPSTEIN, E. & J.E. LEGGET. 1954 — The absorption of alkaline earth cations by barley roots: kinetics and mechanism. *Amer. J. Bot.* **41**:785-791.
- FRIED, M. & H. BROESHART. 1967 — The Soil Plant System. Academic Press. Nova Iorque e Londres.
- GAUCH, H. 1972 — Inorganic Plant Nutrition. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, P.
- HAGEN, C.E. & H.T. HOPKINS. 1955 — Ionic species in orthophosphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.* **30**:192-199.
- HANDLEY, R. & R. OVERSTREET. 1961 — Uptake of calcium and chlorine in roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **36**:766-769.

- HELLER, R. 1974 — L'Absorption Minérale chez les végétaux. Masson & Cie., Paris.
- HEWITT, E.J. & J.A. SMITH, 1974 — Plant Mineral Nutrition. The English Universities Press Ltd., Londres.
- HIGINBOTHAM, N. 1973 — The mineral absorption process in plants. *The Bot. Rev.* **39**(1):15-69.
- HODGES, T.K. 1973 — Ion absorption by plant roots. *Adv. Agron.* **25**:163-207.
- LEGGET, J.R. & W.A. GILBERT. 1967. — Localization of the Ca mediated apparent ion selectivity in the cross sectional volume by soybean roots. *Plant Physiol.* **42**:1658-1664.
- LEGGETT, J.E., R.A. GALLOWAY & H.C. GAUCH. 1965 — Calcium activation of orthophosphate absorption by barley roots. *Plant Physiol.* **40**:897-902.
- LOURENÇO, S., O.J. CROCOMO, I.R. NOGUEIRA & E. MALAVOLTA. 1968 — Kinetic studies of phosphorus uptake by excised roots of barley in the presence of magnesium. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **40**(2):171-179.
- LUNDEGARD, H. 1939 — An electro-chemical theory of salt absorption and respiration. *Nature.* **143**: 203.
- MALAVOLTA, E. 1975 — Práticas de Nutrição Mineral de Plantas. Postila mimeo., Piracicaba.
- MENZEL, R.G. & W.R. HEALD. 1955 — Distribution of potassium, rubidium, caesium calcium and strontion within plants grown in nutrient solution. *Soil Sci.* **80**:287-293.
- MOORE, D.P., L. JACOBSON & R. OVERSTREET. 1961 — Uptake of calcium by excised barley roots. *Plant. Physiol.* **36**:53-57.
- NISSEN, P. 1974 — Uptake mechanisms inorganic and organic. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**:53-79.
- ROBERTSON, R.N. & N.J. WILKINS. 1948 — Studies on the metabolism of plant cells. VII. The quantitative relation between salt accumulation and salt respiration. *Aust. J. Sci. Res. B. Biol. Sci.* **1**:17-37.
- SALSAC, L. 1966 — Absorption du calcium dans les racines de Lupin Jaune et de Féverole. *C.R. Acad. Sci., Paris.* **262**:2462-2465.
- SALSAC, L. 1969 — Caracteres particuliers de l'absorption du calcium. *Bull. Soc. Franç. Physiol. vég.* **15**:213-236.
- STEWART, F.C. & J.F. SUTCLIFFE. 1959 — Plants in relation to inorganic salts. *Plant Physiology.* II, pp. 253-478, Academic Press, Nova Iorque e Londres.