

**KARINA PATRÍCIA VIEIRA DA CUNHA**

**SILÍCIO COMO AMENIZANTE DA FITOTOXICIDADE DE CÁDMIO E ZINCO  
E TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) CULTIVADAS EM  
SOLO CONTAMINADO**

**RECIFE – PE**

**2008**

**KARINA PATRÍCIA VIEIRA DA CUNHA**

**SILÍCIO COMO AMENIZANTE DA FITOTOXICIDADE DE CÁDMIO E ZINCO  
E TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) CULTIVADAS EM  
SOLO CONTAMINADO**

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

**RECIFE – PE**

**2008**

**KARINA PATRÍCIA VIEIRA DA CUNHA**

Tese intitulada “**SILÍCIO COMO AMENIZANTE DA FITOTOXICIDADE DE CÁDMIO E ZINCO E TOLERÂNCIA DE PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do título de Doutora, e aprovada em 19 de dezembro de 2008.

---

**Clistenes Williams Araújo do Nascimento**

Presidente da Banca Examinadora  
(Orientador)

---

**Arminda Saconi Messias**

Examinador

---

**Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel**

Examinador

---

**Mario de Andrade Lira Júnior**

Examinador

---

**Ítalo Moraes Rocha Guedes**

Examinador

*"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos."*

***Albert Einstein***

Aos meus queridos e amados pais, Fátima e Lucas, pelo amor, dedicação e apoio incondicionais

Aos meus irmãos, Márcio e Viviane, pelo companheirismo, incentivo e auxílio na busca dos meus objetivos

Ao meu querido noivo, Ernesto, pela felicidade que me trouxe, por ser meu amor e meu melhor amigo

Com todo amor e carinho,

**OFEREÇO ESTE TRABALHO**

À minha querida avó materna, Josefa Maria de Oliveira (*in memoriam*), pela riqueza de seus ensinamentos, pelo exemplo de vida, humildade e bondade, e pela fé que sempre teve em tudo que me propus a realizar

Com todo amor,

**DEDICO ESTE TRABALHO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por estar sempre ao meu lado, por iluminar meu caminho e tornar tudo possível.

À espiritualidade amiga, pelas boas inspirações, proteção e amparo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela minha formação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa para realização do Curso de Doutorado.

Ao Prof. Clistenes Williams Araújo do Nascimento, pela orientação, confiança, amizade, atenção e incentivo durante todos os momentos, e pelo grande exemplo de cientista que é.

Ao Prof. Mario de Andrade Lira Júnior pelas valiosas sugestões e esclarecimentos, e pela sempre disponível e fundamental ajuda nos assuntos ligados a estatística.

A Profa. Rejane Magalhães de Mendonça Pimentel, pela amizade e atenção, pelo apoio nas análises de anatomia vegetal, imprescindíveis à realização desse trabalho.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação, em especial à Profa. Sheila Maria Bretas Bittar pela participação no meu crescimento profissional, pela valiosa amizade e aprendizado compartilhado durante todos esses anos de estudos na UFRPE.

A todos os estagiários do Laboratório de Fertilidade do Solo/UFRPE e colegas do Grupo de Pesquisa Química Ambiental de Solos, pela convivência harmoniosa, em especial a Airon José da Silva pela alegria contagiante, pela sempre disponível e eficiente ajuda na condução dos experimentos e na realização das análises laboratoriais.

A todos os colegas do Laboratório de Fitomorfologia Funcional/LAFF, em especial aos amigos Clébio Pereira e Priscila Correa, pelo companheirismo e sincera amizade.

Aos amigos da Pós-Graduação em Ciência do Solo, Ana Cristiane, Marise, Júlio Guilherme, Cícero, Edivan, Welka, Hailson, Josângela, Rosemberg, Milton, Michelangelo, Eriberto e em especial, a duas grandes

amigas e companheiras Maria de Fátima e Caroline Biondi, pelos momentos compartilhados, pela confiança e sincera amizade oferecida.

Aos funcionários Maria do Socorro de Santana (Help) e Severino dos Ramos Bastos (Seu Noca), sempre dispostos a ajudar, pela convivência alegre e pelo carinho.

Aos meus pais, Maria de Fátima Vieira da Cunha e Lucas Pereira da Cunha, pela dedicação à minha formação e pela educação recebida em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Márcio Vieira da Cunha e Viviane Cristina Vieira da Cunha, pelo exemplo de união, confiança, compreensão e amor, bem como pelas contribuições à condução e elaboração deste trabalho.

Ao meu noivo, Ernesto Leça Pinto, pelo amor, cumplicidade, paciência, compreensão, e pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus cunhados, Débora Campos e Marcelo Anastácio, e demais familiares pelo apoio e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

**Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
Silício no solo.....	4
Silício nas plantas.....	7
Silício e mecanismos celulares de tolerância a metais pesados.....	8
Respostas morfoanatômicas de plantas expostas a metais.....	13
Sítios de acúmulo de metais e mecanismos de tolerância celular.....	14
Referências Bibliográficas.....	16
CAPÍTULO I: DISPONIBILIDADE, ACÚMULO E TOXIDAZ DE CÁDMIO E ZINCO EM MILHO CULTIVADO EM SOLO CONTAMINADO.....	23
RESUMO.....	24
SUMMARY.....	25
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
CONCLUSÕES.....	32
LITERATURA CITADA.....	32
CAPÍTULO II: SILICON ALLEVIATES THE TOXICITY OF CADMIUM AND ZINC FOR MAIZE ( <i>Zea mays</i> L.) GROWN ON A CONTAMINATED SOIL.....	41
ABSTRACT.....	43
1 Introduction.....	43
2 Material and methods.....	45
3 Results and discussion.....	47
4 References.....	51
CAPÍTULO III: SILICON EFFECTS ON METAL TOLERANCE AND STRUCTURAL CHANGES IN MAIZE ( <i>Zea mays</i> L.) GROWN ON A CADMIUM AND ZINC ENRICHED SOIL.....	58
Abstract.....	59
1. Introduction.....	59
2. Material and Methods.....	61
2.1. Pot experiment.....	61
2.2. Optical microscopy.....	62
2.3. Statistical analysis.....	62
3. Results and Discussion.....	63
3.1. Structural changes in maize leaves and roots.....	63
3.2. Localization of silica and metals in plant tissue.....	65
4. Conclusions.....	66
5. References.....	67



## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	Produção de matéria seca da parte aérea e raiz de milho submetido a doses crescentes e Cd e Zn no solo com (■) e sem (◆) calagem.....	36
<b>Figura 2.</b>	Teores de Zn e Cd na parte aérea (a) e (b) e raiz (c) e (d) de milho submetido a doses crescentes de metais no solo com (■) e (◆) sem calagem.....	37
<b>Figura 3.</b>	Sintomas visuais da toxicidade de Zn e Cd em plantas de milho cultivadas em solo contaminado com 50 mg kg <sup>-1</sup> de Zn (a) e (b); 100 mg kg <sup>-1</sup> de Zn (c) e (d); e com 20 mg kg <sup>-1</sup> de Cd (e) e (f).....	37
<b>Figura 4.</b>	Alterações estruturais no tecido vascular, células epidérmicas e colenquimáticas de folhas de milho cultivadas em solo contaminado com Cd. Folhas expostas a 20 mg kg <sup>-1</sup> de Cd, (A-C) tratamento com calagem e (G-I) tratamento sem calagem; (D-F) tratamento controle. x: xilema; cab: colênquima abaxial; cad: colênquima adaxial; eab: epiderme abaxial; ead: epiderme adaxial. Barras: 50µm.....	38
<b>Figura 5.</b>	Alterações estruturais no tecido vascular, células epidérmicas e colenquimáticas de folhas de milho cultivadas em solo contaminado com Zn. Folhas expostas a 150 mg kg <sup>-1</sup> de Zn, (a) a (c) tratamento com calagem e (g) a (i) tratamento sem calagem; (d), folha exposta a 30 mg kg <sup>-1</sup> ; (e) a (f) tratamento controle. x: xilema; cab: colênquima abaxial; cad: colênquima adaxial; eab: epiderme abaxial; ead: epiderme adaxial. Barras: 50µm.....	39
<b>Figura 6.</b>	Alterações estruturais na raiz de milho cultivada em solo contaminado com Cd e Zn, sem calagem (a) a (c) e com calagem (d) a (f). Raízes dos tratamentos controles (a) e (d), (b) e (e) raízes expostas a 20 mg kg <sup>-1</sup> de Cd e (c) e (f) a 150 mg kg <sup>-1</sup> de Zn. x: xilema; En: endoderme. Barras:	

	50µm.....	40
<b>Figure 7.</b>	Regression equations between silicon doses applied to soil and shoots and root dry matter of maize ( <i>Zea mays</i> L.) grown on a Cd and Zn-contaminated soil.....	55
<b>Figure 8.</b>	Regression equations between silicon doses applied to soil and Cd and Zn accumulation and concentration in shoots and roots of maize ( <i>Zea mays</i> L.) plants grown on a contaminated soil.....	56
<b>Figure 9.</b>	Regression equations between silicon doses applied to soil and DTPA-extractable Cd and Zn as well as metal fractions in a contaminated soil.....	57
<b>Figure 10.</b>	16. Relationship between silica doses, dry matter yield, and Cd and Zn content in maize shoots (◆) and roots (■) grown in contaminated soil with Cd and Zn. n= 3 replications.....	71
<b>Figure 11.</b>	Structural alterations and silica, Cd, and Zn localization in maize leaves grown in a contaminated soil treated with Si. Lignification of cell wall of abaxial collenchyma without (a) and with (b) application of 50 mg kg <sup>-1</sup> of Si to the soil. Silica apoplastic deposits in collenchyma (c), epidermis (d) and detailed in bulliform cell ( <i>arrow</i> , d). Silica in the symplasm mesophyll (d). Localization of Cd and Zn in collenchyma without (e) and with (f) Si application. Deposits of Cd and Zn in bulliform cells apoplasm of the adaxial surface (g) and in apoplasm of collenchyma and abaxial epidermis after Si addition (h). <i>ade</i> Adaxial epidermis, <i>abe</i> abaxial epidermis, <i>x</i> xylem, <i>ph</i> phloem, <i>bc</i> bulliform cell, <i>abc</i> abaxial collenchyma. <i>Bars</i> : 50 µm.....	72
<b>Figure 12.</b>	Silica, Cd and Zn localization in maize roots after applying Si in a soil enriched with Cd or Zn. Metals in cell wall of endodermis, xylem and symplasm of cortical parenchyma and endodermis of roots treated with 100 mg kg <sup>-1</sup> of Si (a). After applying 150 mg kg <sup>-1</sup> of Si, metal located in the endodermis symplasm (b). Cd and Zn in cell walls of epidermis (c). Silica deposits in epidermis and exodermis	

(d). Silica deposits in cell wall of endodermis and xylem (e).  
Silica into endodermis cells (f). *cp* Cortical parenchyma, *ep*  
epidermis, *ex* exodermis, *x* xylem, *f* phloem. *Bars: 50 μm.....*

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> Teores de Zn ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) pelos extratores DTPA, EDTA, Mehlich-1 (M-1) e Mehlich-3 (M-3) em solo contaminado com doses crescentes de Zn com e sem calagem.....	35
<b>Tabela 2.</b> Teores de Cd ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) pelos extratores DTPA, EDTA, Mehlich-1 (M-1) e Mehlich-3 (M-3) em solo contaminado com doses crescentes de Cd com e sem calagem.....	35
<b>Tabela 3.</b> Coeficientes de correlação linear simples entre os teores de Zn e Cd obtidos por extratores químicos e os teores na parte aérea e raiz de milho cultivados em solo com e sem calagem e contaminado com doses crescentes de Zn e Cd..	36
<b>Table 4.</b> Linear correlation coefficients between biomass, Cd and Zn concentrations in shoots (CSt) and roots (CRt), metal accumulation in shoots (ASt) and roots (ARt), Si soluble contents, Cd and Zn availability (DTPA) and soil fractions: exchangeable (Ex), organic matter (OM), and crystalline Fe oxide (CFeOx).....	54
<b>Table 5.</b> Regression equations for relationship between silica doses added to the contaminated soil with Cd or Zn and alterations in xylem diameter, thickness of mesophyll and epidermis and transversal area occupied by collenchyma, midvein and phloem in leaves maize plants.....	70
<b>Table 6.</b> Coefficients of liner correlation between anatomic characters, dry matter yield, and accumulation of metals in maize plants growth in contaminated soil with Cd or Zn treated with silica doses.....	70

## RESUMO

**Cunha, Karina Patrícia Vieira**, D. Sc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dezembro de 2008. **Silício como amenizante da fitotoxicidade de cádmio e zinco e tolerância de plantas de milho (*Zea mays* L.) cultivadas em solo contaminado.** Orientador: Clístenes Williams Araújo do Nascimento.

Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos do Si na amenização da toxicidade de Cd e Zn tanto no solo como na planta, além de estudar os mecanismos de tolerância desenvolvidos por plantas de milho submetidas à toxicidade de Cd e Zn no solo. Para tanto, dois experimentos foram realizados em casa de vegetação, utilizando amostras superficiais (0–20 cm) de um Argissolo Vermelho-Amarelo. O primeiro experimento, um ensaio preliminar, teve a finalidade principal de determinar níveis tóxicos de Cd e Zn para plantas de milho. Doses equivalentes aos níveis tóxicos de Cd e Zn, determinados no ensaio preliminar, foram aplicadas ao solo no segundo experimento visando avaliar o efeito do Si na amenização da toxicidade de Cd e Zn no solo e na planta. No primeiro experimento, foram estudadas: (a) a eficiência de diferentes extratores (DTPA, EDTA, Mehlich-1 e Mehlich-3) na avaliação da disponibilidade de Cd e Zn para plantas de milho cultivadas em solo corrigido e não corrigido com calcário; (b) o efeito da aplicação de Cd (0, 1, 3, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>) e Zn (0, 10, 30, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>) no crescimento e acúmulo desses metais em plantas de milho, e (c) sintomas visuais de toxidez e alterações anatômicas em folhas e raízes de milho expostas a esses metais. Correlações altamente significativas foram encontradas entre todos os extratores testados e os teores de metais absorvidos pelas plantas. O aumento das doses de metais promoveu redução da produção de biomassa, além de aumentar o conteúdo destes metais nas plantas. Os níveis críticos tóxicos de Cd para o Argissolo variaram de 8,7 a 13,1 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto para Zn esses valores situaram-se entre 74,1 e 110,7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para solos com e sem calagem, dependendo do extrator considerado. Os sintomas visuais

de toxidez foram clorose internerval e marginal, associada à necrose no ápice e margens das folhas, encarquilhamento e enrolamento de folhas. No segundo experimento, foram estudados: (a) efeito da aplicação de Si na biodisponibilidade de Cd e Zn, e sua distribuição entre as frações do solo; (b) efeito da aplicação de doses crescente de Si (0, 50, 100, 150, 200 mg kg<sup>-1</sup>) no crescimento de milho em solo contaminado com 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cd e Zn, respectivamente; e (c) a relação do acúmulo e da distribuição celular de sílica, Cd e Zn com a tolerância e as alterações estruturais observadas em plantas de milho. A redução dos efeitos tóxicos de Cd e Zn foram independentes do efeito do silicato de cálcio sobre o pH do solo. As plantas de milho tratadas com Si apresentaram não apenas aumento da produção de biomassa como também da absorção e acumulação de metais nos tecidos vegetais. Alterações estruturais significativas foram observadas em folhas e raízes de milho submetidas ao estresse de Cd e Zn após aplicação de Si, indicando que a ação amenizante do Si pode ser atribuído não somente a imobilização de Cd e Zn no solo, mas também a efeitos na planta.

## ABSTRACT

**Cunha, Karina Patrícia Vieira**, D. Sc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dezembro de 2008. **Silicon amelioration of cadmium and zinc toxicities and tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc contaminated soil** Adviser: Clístenes Williams Araújo do Nascimento.

This work was carried out to investigate silicon amelioration of Cd and Zn toxicities in both the soil and in plant, in addition to studying the mechanisms of tolerance developed by maize plants subjected to toxicity of Cd and Zn in soil. To that end, two experiments were conducted in a greenhouse, using surface samples (0-20 cm) of a Typic Kandiudult soil. The first experiment, a preliminary test, had the primary aim of determining toxic levels of Cd and Zn to maize plants, which were used in the experiment to evaluate the silicon amelioration of Cd and Zn toxicities. In the first experiment were studied: (a) the soil Cd and Zn availability to maize plants with and without liming, using the DTPA, EDTA, Mehlich-1, and Mehlich-3 extractants; (b) The effect of Cd and Zn doses on plant growth and metal accumulation in maize; and (c) toxicity symptoms and anatomical changes in leaves and roots exposed to Cd and zinc. Highly significant correlations were found between all extractants tested and metal plant contents. The metal addition to soil reduced biomass production and increased Cd and Zn plant contents. The critical toxicity value for Cd in soil varied from 8.7 to 13.1 mg kg<sup>-1</sup>, whereas for Zn this value lied between 74.1 to 110.7 mg kg<sup>-1</sup>, depending on liming and extractant type. Interveinal and marginal chlorosis together with necrosis in the leaf apex and along the margins, shriveling and curling were the most common symptoms in zinc and cadmium-damaged plants. In the second experiment were studied: (a) effect of Si on the bioavailability of Cd and Zn, and its distribution among the fractions of soil, (b) effect of increasing doses of Si (0, 50, 100, 150, 200 mg kg<sup>-1</sup>) in the growth of maize in soil contaminated with 10 mg kg<sup>-1</sup> of Cd and 100 mg kg<sup>-1</sup> of Zn, (c) the relationship between accumulation and distribution of cellular silica,

Cd and Zn with tolerance and the structural changes observed in maize plants. The reduction of the toxic effects of Cd and Zn were independent of the effect of calcium silicate on the soil pH. The results showed that the maize plants treated with Si presented not only biomass increasing but also higher metal accumulation. Significant structural alterations were also observed as a result of Si application, indicating that the ameliorating effect of Si can be attributed not only to the retention of Cd and Zn in soil but also to the effects on plant.



## INTRODUÇÃO

No decorrer dos últimos anos, o crescimento populacional e o desenvolvimento de atividades econômicas como mineração, industrialização e práticas agrícolas têm contribuído para a degradação do ambiente, sendo responsáveis pela introdução de contaminantes em solos (Accioly e Siqueira, 2000). Dentre as diferentes substâncias e elementos que podem contaminar o solo, os metais pesados têm merecido especial atenção, devido a sua alta persistência e toxicidade aos organismos vivos. Embora seja alvo de controvérsias, o termo “metal pesado” é comumente usado para designar um grupo heterogêneo de elementos que incluem metais, semimetais e não metais, cuja densidade atômica é maior que  $6 \text{ g cm}^{-3}$  (Alloway, 1990). Alguns metais pesados, como Fe, Mn, Zn, Cu e Mo são essenciais para o crescimento das plantas, enquanto outros, como Pb, Cd, Hg e Cr, não têm função biológica conhecida.

A contaminação do solo com metais pesados é um problema global e o desenvolvimento de técnicas de remediação desses solos é de grande interesse. Plantas podem ser uma alternativa, especialmente pela técnica de fitoextração. Esse processo está baseado no princípio de que as plantas absorvem naturalmente elementos necessários ao seu desenvolvimento, e, pelas mesmas vias, metais pesados (Cunningham e Ow, 1996), transferindo-os do solo para a parte aérea, a qual pode ser removida da área poluída (Nascimento e Xing, 2006).

Ao longo das últimas décadas, muitos trabalhos têm apontado a fitoextração como uma técnica bastante promissora para recuperação de solos contaminados (Cunningham e Ow, 1996; Lasat, 2000; Nascimento e Xing, 2006). Esta alternativa apresenta como principais vantagens a redução de custos e a possibilidade de recuperar extensas áreas contaminadas. O resíduo gerado no processo de fitoextração (tecido vegetal) pode ser processado com segurança, sendo o volume de material tóxico produzido, uma fração do que é gerado por outras técnicas de remediação (Accioly e Siqueira, 2000).

Quanto aos limites da fitoextração, pode-se citar como mais importante o fato de sua aplicação ser dependente do nível de contaminação local, visto que os solos com alta contaminação não suportam o crescimento de plantas. Outro

aspecto é que para o desenvolvimento e aprimoramento dessa técnica devem ser considerados processos fisiológicos relacionados com absorção, transporte, acumulação e tolerância celular, que continuam sendo alvo de controvérsias.

A maior parte das plantas hiperacumuladoras de metais pesados possui crescimento endêmico, baixa penetração radicular, pouca produção de biomassa e lento desenvolvimento. Em face dessas limitações apresentadas pelas espécies hiperacumuladoras torna-se necessário buscar novas espécies que viabilizem a fitoextração. Para tanto, a avaliação das espécies quanto à capacidade de tolerar esse tipo de estresse se faz necessária. Diferentes propriedades das plantas são importantes para a fitoextração. Em geral, as seguintes características são favoráveis para a utilização de plantas como fitoextratoras: crescimento rápido, elevada produção de biomassa, competitividade e tolerância à contaminação (Lamego e Vidal, 2007).

Na busca de um fitoextrator ideal, a fim de tornar essa tecnologia economicamente viável para o tratamento de locais contaminados, tem sido incentivada a integração de diversas áreas de pesquisa. No que diz respeito, por exemplo, ao melhoramento das propriedades de acumulação de metais nas células pela engenharia genética, um melhor entendimento dos processos envolvidos na aquisição de metais do solo até as raízes, na translocação das raízes para a parte aérea, e ainda, da tolerância às altas concentrações de metais nos tecidos vegetais é requerido (Tong et al., 2005).

A toxicidade de metais precisa ser melhor estudada para verificar até que níveis as plantas podem suportá-la. A anatomia vegetal tem apresentado relevante destaque nesses estudos uma vez que permite investigar a relação entre alterações fisiológicas, morfoanatômicas e adaptações de plantas a diferentes condições ambientais.

Uma técnica auxiliar na implantação de programa de fitoextração, principalmente, em solos com elevados níveis de contaminação, pode ser a utilização de amenizantes químicos, que reduzem a biodisponibilidade dos metais e possibilitam o crescimento e desenvolvimento de plantas. Os amenizantes podem converter formas solúveis de metais pesados em formas geoquimicamente estáveis, propiciando, em muitos casos, uma imobilização durável e efetiva dos metais, evitando a lixiviação e disseminação do

contaminante. Dentre os materiais usados, destacam-se fosfatos, oxihidróxidos de Fe e Mn, materiais orgânicos, calcários e silicatos.

Recentemente, a investigação do papel do Si na amenização da toxicidade de metais às plantas tem gerado muita controvérsia quanto ao seu efeito no solo ou na planta. Isso se deve ao fato do Si promover aumento do pH do solo e conseqüente redução da biodisponibilidade e absorção dos metais pelas plantas, o que tem sido considerado, por alguns autores, o principal efeito amenizante da toxicidade da metais pelo Si. Com base no estudo morfoanatômico de plantas submetidas a estresse por metais pesados e tratadas com Si, tem sido admitido também o efeito do Si nas plantas e de seu envolvimento em processos fisiológicos importantes, que resultam em alterações estruturais e na deposição de complexos Si-Metal em seus tecidos (Neumman e Nieden, 2001; Shi et al., 2005a,b).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo geral investigar os efeitos do Si na amenização da toxicidade de Cd e Zn tanto no solo como na planta, além de estudar os mecanismos de tolerância desenvolvidos por plantas de milho submetidas à toxicidade desses metais.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Silício no solo

O silício (Si), depois do oxigênio, é o elemento mais abundante da crosta terrestre. No solo, o conteúdo de Si pode variar de <1 a 45% do peso seco. O Si está presente na solução do solo como ácido monossilícico  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ , a maior parte em forma não dissociada, a qual é prontamente disponível às plantas. Devido à dessilicatização causada pelo intenso intemperismo e lixiviação dos solos tropicais, as formas de Si mais encontradas nesses solos são quartzo, opala ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) e outras formas não-disponíveis às plantas. As formas de Si quimicamente ativas no solo são representadas pelo ácido monossilícico solúvel e fracamente adsorvido, ácido polissilícico, e compostos organo-silícicos (Matichenkov e Calvert, 2002).

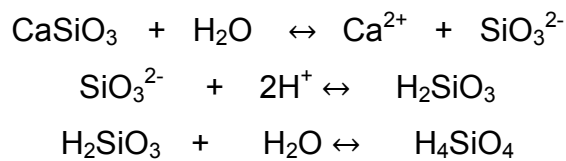
As principais fontes de ácido monossilícico para a solução do solo são: decomposição de resíduos culturais; dissociação de ácidos polissilícicos; dessorção de Si dos óxidos e hidróxidos de Fe e Al; dissolução de minerais cristalinos e não cristalinos; adição de fertilizantes silicatados; e água de irrigação. Os principais drenos incluem a precipitação do Si em solução; a polimerização de ácidos monossilícicos formando ácido polissilícico; lixiviação; adsorção em óxidos e hidróxidos de Fe e Al, além da absorção pelas plantas.

Além da intensa dessilicatização dos solos tropicais, os cultivos sucessivos retiram da solução do solo teores consideráveis de Si, por esta razão, culturas importantes no contexto nacional, como soja, milho, trigo, algodão, arroz, cana-de-açúcar e outras, tem sido beneficiadas com a fertilização silicatada, com aumentos significativos em suas produtividades (Barbosa-Filho et al., 2000; Korndörfer et al., 1999; Korndörfer et al., 2002).

Os solos tropicais, normalmente, apresentam baixo pH, alto teor de  $\text{Al}^{3+}$ , baixa saturação por bases e alta capacidade de fixação de fósforo. Particularmente nesses solos, os fertilizantes silicatados podem influenciar as culturas de duas formas: (1) melhoria das propriedades químicas e fertilidade do solo, e (2) efeito direto sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (Matichenkov e Calvert, 2002).

Os silicatos têm comportamento no solo similar ao dos carbonatos de cálcio e magnésio, sendo capazes de elevar o pH, neutralizar o Al trocável e estão associados ainda ao aumento da disponibilidade de silício (Si) solúvel e dos teores de Ca e Mg trocáveis, o que promove maior saturação por bases e menor saturação por Al (Epstein, 1999; Savant et al., 1999).

Os fertilizantes silicatados são normalmente neutros a ligeiramente alcalinos (Lindsay, 1979). De acordo com Savant et al. (1999), o efeito corretivo da acidez do solo promovida pelos silicatos acontece pelas reações dos ânions  $\text{SiO}_3^{2-}$  com os prótons  $\text{H}^+$  na solução do solo:



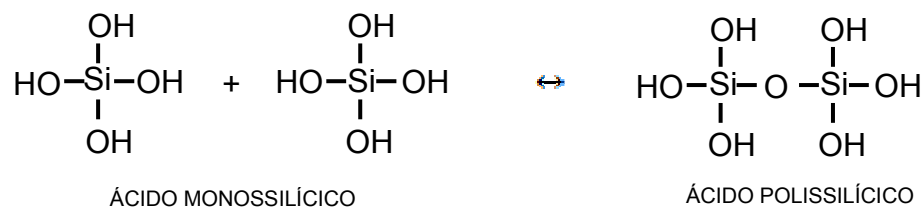
O aumento do pH de solos contaminados após tratamento com Si é reportado por vários autores como sendo o principal responsável pela imobilização e redução da biodisponibilidade de metais pesados (Accioly, 2001; Liang et al., 2005; Paim et al., 2006; Liang et al., 2007).

O pH é o principal fator determinante do balanço de cargas no solo. Em pH baixo, ocorre a predominância de cargas positivas no solo devido aos íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  ficarem adsorvidos na superfície dos colóides, o que inibe a adsorção de metais devido a repulsão entre o colóide e o metal desfavorecendo as reações de adsorção. A elevação do pH determina: (1) aumento de cargas negativas por meio de desprotonação de  $\text{H}^+$  da superfície coloidal, favorecendo as reações de adsorção e, (2) a maior precipitação de metais como hidróxidos, carbonatos e complexos orgânicos.

De maneira geral, o pH apresenta relação inversa com a biodisponibilidade de metais pesados. A elevação do pH pela aplicação de silicato promove o incremento dos sítios de adsorção do solo reduzindo os teores biodisponíveis de metais. Em adição ao aumento da adsorção, com a elevação do pH ocorre maior precipitação contribuindo para imobilização de metais no solo. De forma semelhante ao íon carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), os ânions  $\text{SiO}_3^{2-}$  combinam-se com íons  $\text{H}^+$  na solução do solo, diminuindo a atividade química por precipitação de metais na forma de hidróxidos (Paim et al., 2006).

Porém, além da precipitação na forma de hidróxidos, a adição de silício promove a precipitação de metais na forma de silicatos (Dietzel, 2000), o que é um benefício adicional muito importante e vantajoso em relação aos calcários (Paim et al., 2006).

Dietzel (2000) afirma que na faixa normal de pH do solo, a incorporação de silicatos promove a polimerização de compostos silicatados que são potenciais ligantes para a formação de complexos insolúveis com os metais pesados (silicatos de metais). De fato, o ácido silícico pode existir como moléculas isoladas, também chamada de ácido monossilícico  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ , e como polímeros, chamados de ácido polissilícico. Esses polímeros consistem de tetraedros que são ligados via ligações do tipo Si-O-Si, podendo formar sílica dimérica  $[\text{Si}_2\text{O}_3(\text{OH})_4]^{2-}$ , trimérica  $[\text{Si}_3\text{O}_5(\text{OH})_5]^{3-}$ , tetramérica  $[\text{Si}_4\text{O}_8(\text{OH})_4]^{4-}$  e assim sucessivamente. A formação de ácidos polissilícicos pode ser descrita genericamente de acordo com a equação:



A aplicação de doses maiores que  $100 \text{ mg dm}^{-3}$  de Si ao solo promove a mudança da coordenação do Si de quatro para seis, sendo esse o ponto de partida para sua polimerização e conseqüente formação de complexos insolúveis Si-metal no solo (Dietzel, 2000; Paim et al., 2006). Paim et al. (2006) constataram a presença de corpúsculos esbranquiçados sobre as partículas de solo quando houve um aumento brusco da dose de 6040 para  $13660 \text{ mg dm}^{-3}$  de Si. Além disso, a diminuição de pH, de aproximadamente 7,5 para 6,0, observada por esses autores para doses elevadas de silício ( $>8030 \text{ mg dm}^{-3}$ ), sugere uma diminuição da atividade dos ânions  $\text{SiO}_3^{2-}$  como bases e um aumento de sua participação como polímeros de Si atuando como ligantes para formação de complexos insolúveis de Si com metais no solo.

Alterações na distribuição de metais entre as frações do solo também são relatadas como efeito de Si no solo contaminado. Após tratamento do solo

com Si, Liang et al (2005) verificaram aumento dos teores de metais ligados a óxidos de Fe e concomitante redução de seus teores na fração trocável. Sommer et al (2006) relatam a sorção de polímeros de silício na superfície de óxidos de Fe e Al, sendo a estabilidade desses polímeros aumentada em  $\text{pH} < 8$  e na presença de cátions em solução, especialmente os cátions divalente, de acordo com a seguinte ordem:  $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Sr} > \text{Ca} > \text{Mg} > \text{Na} > \text{K}$  (Dietzel, 2000). Além disso, a ligação de complexos organo-silícicos à superfície de óxidos foi relatada por Sommer et al (2006) e pode ser envolvida na complexação de metais pesados no solo.

### **Silício nas plantas**

Embora não seja considerado um elemento essencial, o Si tem apresentado muitos benefícios para as plantas, principalmente no controle de doenças e na amenização de estresses salino, hídrico e de metais pesados. A amenização da fitotoxicidade por metais pesados com a aplicação de silício tem sido bem documentada (Neumman e Nieden, 2001; Shi et al., 2005a; Liang et al., 2007; Zhang et al., 2008). Porém, os mecanismos pelos quais o Si aumenta a tolerância das plantas ainda não estão completamente entendidos.

As plantas absorvem Si como ácido monossilícico  $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ , forma não dissociada presente na solução do solo em concentrações de 0,1 a 0,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e, em menor grau, como  $\text{Si}(\text{OH})_3\text{O}^-$ , forma iônica predominante em  $\text{pH} > 9$  (Epstein, 1994). A acumulação de Si nos tecidos vegetais varia consideravelmente (entre 1 a 10% do peso seco) de acordo com a espécie (Currie e Perry, 2007). Essa ampla variação na concentração de Si nos tecidos é atribuída, principalmente, a características de absorção e transporte de Si pelas plantas (Epstein, 1994). A maioria das espécies absorve Si por difusão passiva, de modo que o Si chega ao xilema e alcança a parte aérea acompanhando o fluxo de transpiração. Entretanto, espécies das famílias Poaceae, Equisetaceae e Cyperaceae, que apresentam alta acumulação de Si (>4% de Si em peso seco), absorvem Si de forma ativa (Currie e Perry, 2007). Nesse caso, o Si é absorvido via proteínas específicas de membranas, o que

garante o acúmulo de Si pela planta, independente do gradiente de concentração (Oliveira et al., 2007).

O Si absorvido pelas raízes é transportado para parte aérea e depositado intra ou extracelularmente nos tecidos vegetais como sílica amorfa hidratada ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ). Em gramíneas, como milho, arroz e sorgo, a sílica é depositada na forma de corpos silicosos, principalmente nas células epidérmicas, silicosas e buliformes, e nos estômatos e tricomas foliares (Currie e Perry, 2007). Em muitas espécies pode ser encontrada abaixo da cutícula uma densa camada formada pela deposição de sílica. A formação dessa camada tem sido de grande importância em condições de estresse biótico e abiótico, contribuindo para reduzir a perda de água por transpiração e aumentar a eficiência do uso da água (Nwugo e Huerta, 2008), servindo como uma barreira mecânica à penetração de patógenos e mastigação de herbívoros (Epstein, 1999; Savant et al., 1999).

Sabe-se que o Si age tanto no solo, por meio da redução da biodisponibilidade dos metais, como no interior das plantas. Na planta, o efeito amenizante do Si pode ser atribuído à: (1) retenção de metais nas raízes e inibição da translocação para a parte aérea (Shi et al., 2005a); (2) deposição de  $\text{SiO}_2$  no apoplasto da raiz e na superfície foliar, constituindo uma barreira ao fluxo apoplástico dos íons metálicos e ao fluxo transpiracional, respectivamente (Lux et al., 2002; Shi et al., 2005a); (3) co-precipitação de complexos Si-metal na parede celular (Neumann e Nieden, 2001); (4) compartimentalização de metais ligados a ácidos orgânicos no vacúolo (Neumann e Nieden, 2001); (5) distribuição mais homogênea de metais e formação de complexos Si-polifenóis nos tecidos (Williams e Vlamis, 1957; Horst e Marschner, 1978; Shi et al., 2005b; Maksimovic et al., 2007); e (6) redução da peroxidação dos lipídios de membrana via estimulação de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Shi et al., 2005b).

### **Silício e mecanismos celulares de tolerância a metais pesados**

A relação do Si com os mecanismos de tolerância celular a metais pesados têm sido bastante estudada. Uma das primeiras pesquisas associando



o efeito do Si à amenização da toxicidade de metais pesados foi desenvolvida por Willians e Vlamis (1957). Esses autores observaram a redução de sintomas de toxicidade de  $Mn^{2+}$  em plantas de cevada após adição de uma pequena quantidade de Si ( $357 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Si) à solução nutritiva. Embora a concentração de Mn nos tecidos foliares tenha sido a mesma entre os tratamentos com e sem Si, na ausência de Si, as plantas cultivadas foram severamente injuriadas. Utilizando Mn marcado ( $^{54}\text{Mn}$ ), esses autores observaram que, na presença do Si, o Mn apresentou distribuição mais homogênea na lâmina foliar, evitando a formação de lesões típicas da toxicidade de Mn em plantas. Posteriormente, Horst e Marschner (1978) observaram alterações semelhantes na distribuição do Mn na presença e ausência de Si em folhas de feijoeiro. Esses resultados foram também confirmados, recentemente, por Shi et al. (2005b) em plantas de pepino expostas a toxicidade de Mn e tratadas com Si. No entanto, em contraste com alguns autores (Willian e Vlamis, 1957; Horiguchi, 1987), Horst e Marschner, 1978) observaram maior acumulação de Mn nos tecidos após tratamento com Si, de modo que enquanto na ausência de Si o nível tóxico de Mn nas folhas de feijão foi de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , após sua suplementação na solução nutritiva esse nível foi elevado para mais de  $1.000 \text{ mg kg}^{-1}$  de manganês.

Mudanças na especiação e na distribuição de metais entre os compartimentos celulares são também descritos como efeito do Si nas plantas. O suprimento de Si na solução nutritiva alivia a toxicidade de Mn por aumentar a adsorção de Mn na parede celular de plantas de feijão e, conseqüentemente, diminuir a concentração de Mn solúvel no apoplasma (Horst et al., 1999; Iwasaki et al., 2002a,b). Segundo Iwasaki et al. (2002a,b), quando foram fornecidos ao mesmo tempo  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Mn e  $1,44 \text{ mmol L}^{-1}$  de Si, os sintomas de toxicidade de Mn foram aliviados sem que a concentração total de Mn na parte aérea fosse reduzida. Por outro lado, os sintomas não foram completamente aliviados quando as plantas de feijão-caupi foram apenas pré-tratadas com  $1,44 \text{ mmol L}^{-1}$  de Si e, em seguida, expostas a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Mn sem o fornecimento concomitante de Si. Esse fato indica que o Si deve estar continuamente presente no meio de cultivo durante o estresse para que haja respostas mais favoráveis. Embora o total de Mn nos tecidos tenha sido semelhante, tanto plantas pré-tratadas como aquelas com fornecimento

contínuo de Si, exibiram menores concentrações de Mn solúvel no extrato do apoplasma e maiores concentrações de Mn adsorvido a estrutura da parede celular quando comparadas às plantas sem Si (Iwasaki et al., 2002a).

Corroborando os resultados de Iwasaki et al. (2002a,b), Rogalla e Romheld (2002) verificaram que embora a absorção e concentração de Mn nas folhas de pepino não tenham sido afetadas após a adição de Si, alterações significativas na distribuição de Mn entre os compartimentos externos e internos da célula foram observadas.

É importante ressaltar que, além da mudança na distribuição celular de Mn entre apoplasma e simplasma, o Si promoveu mudança na especiação de Mn presente no apoplasma. Desse modo, o Mn solúvel, forma predominante no apoplasma na ausência de Si, passou a Mn adsorvido à parede celular após adição de Si à solução. Esse resultado é importante, uma vez que o Mn presente nas plantas tratadas com Si é menos disponível e, por isso, menos tóxico ao metabolismo celular. Dessa maneira, tanto Iwasaki et al. (2002a,b) como Rogalla e Romheld (2002) concluíram que a tolerância de Mn mediada pelo Si em plantas de pepino e feijão-caupi é uma consequência da forte ligação do Mn à parede celular e da redução da concentração de Mn no meio intracelular. Em contraste, Shi et al. (2005b), em experimento com plantas de arroz expostas a toxicidade de Cd, não verificaram alteração na distribuição de Cd entre simplasto e apoplasto de raízes de arroz expostas a  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CdSO}_4$  após tratamento com  $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$  de Si. Mesmo na presença de Si, grande parte do Cd na raiz (87%) continuou sendo localizada no meio intracelular. Essa discrepância entre os resultados foi atribuída às diferenças entre espécies em resposta a diferentes metais pesados. No entanto, Wang et al. (2000) também estudando o efeito do Si na toxicidade de Cd em plantas de arroz verificaram através da análise de EDX (Energia dispersiva de raios-x) que após tratamento com Si, o Cd passou a ser detectado predominantemente na parede celular, corroborando os resultados obtidos por Iwasaki et al. (2002a,b) e Rogalla e Romheld (2002).

O efeito do Si modificando a capacidade de ligação da parede celular propicia a precipitação de complexos Si-Metal reduzindo a concentração de metais livres nos tecidos (Wang et al., 2000; Iwasaki et al., 2002a,b; Rogalla e Romheld., 2002). De fato, vários autores têm localizado metais pesados ligados

a Si na parede celular. Zhang et al. (2008) usando a técnica de microscopia eletrônica de transmissão em associação com EDX verificaram que a distribuição foliar de Cd foi similar à distribuição de Si, sugerindo a co-precipitação desses elementos nos tecidos vegetais. Neumann e Nieden (2001) consideraram a ocorrência de precipitados de silicato de Zn no vacúolo e parede celular de folhas de *Cardaminopsis halleri*, um mecanismo de tolerância a metais pesados. De maneira semelhante, Neumann et al. (1997) verificaram que Zn foi precipitado como silicato de Zn na parede celular da epiderme de *Minuartia verna*, espécie tolerante a Zn. Esses resultados dão suporte à hipótese de que a interação Si-metal no tecido tem um papel significativo na diminuição da toxicidade de metais mediada pelo Si, corroborando o envolvimento do Si nos mecanismos de tolerância celular a metais pesados.

A co-precipitação de Si-metal na parede celular tem sido apontada como um importante mecanismo de alívio da toxicidade de metais pesados mediado pelo Si, uma vez que impede as concentrações de íons metálicos livres em sítios de alta sensibilidade à sua toxicidade, como no interior de células do mesofilo (Vollenweider et al., 2006). Embora depósitos de Si-metal possam ser detectados no citoplasma, Neumann e Nieden (2001) demonstraram que esses depósitos são instáveis e transitórios, sendo mais comuns no apoplasma. Esses autores relatam que estes silicatos são lentamente degradados de modo que a SiO<sub>2</sub> resultante é detectável como uma camada delgada sobre o tonoplasto, enquanto os metais pesados são seqüestrados por ácidos orgânicos nos vacúolos.

Os mecanismos internos pelos quais o Si aumenta a tolerância das plantas aos metais pesados são contraditórios. Enquanto alguns pesquisadores observaram que o Si aumentou a tolerância, mas diminuiu a absorção de metais (Horiguchi., 1987; Nwugo e Huerta, 2008), outros demonstraram que o Si promoveu a maior produção de biomassa, sem reduzir a absorção e acumulação de metais na parte aérea (Horst e Marschner, 1978; Horiguchi, 1988; Maksimovic et al., 2007; Rogalla e Romheld, 2002; Iwasaki et al., 2002a,b). Vale salientar, porém, que o maior crescimento de plantas tratadas com Si pode provocar efeito diluição na concentração de metais (Shi et al., 2005a).

A redução da concentração de metais na parte aérea como efeito do Si, tem sido atribuída à retenção de metais nas raízes resultado da deposição de silicatos de metais nesses tecidos (Shi et al., 2005a; Treder e Cieslinski, 2005; Zhang et al., 2008). Como exemplo desse efeito, Shi et al (2005a) relatam que 85% do total de Cd em plantas de arroz foram retidos nas raízes após adição de Si.

Em adição à deposição de  $\text{SiO}_2$  ou silicatos de metais no apoplasma radicular, alguns autores relatam que a deposição de  $\text{SiO}_2$  na superfície da epiderme foliar também contribui significativamente para reduzir a absorção e translocação de metais das raízes para a parte aérea. Com a redução do fluxo de transpiração a absorção de metais por fluxo de massa é também reduzida. Neste contexto, Zhang et al (2008) relatam a redução de 30 a 50% da concentração de Cd na parte aérea de plantas de arroz após adição de doses crescentes de Si a solução nutritiva.

Outro aspecto importante no alívio da toxicidade de metais pesados mediado pelo Si é o seu envolvimento no metabolismo e na utilização de compostos polifenóis pelas plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos. O Si aumenta a produção de polifenóis, que agem como substâncias inibidoras de patógenos, em plantas sob estresses bióticos (Epstein, 1999; Savant et al., 1999). Porém, esse efeito do Si em plantas expostas à toxicidade de metais pesados é bastante complexo. Na toxicidade por metais pesados o Si pode agir tanto estimulando como inibindo a produção de polifenóis. De acordo com Maksimovic et al. (2007), as concentrações de compostos fenólicos em folhas de pepino cultivadas com elevadas concentrações de Mn foram reduzidas após adição de Si, sugerindo a formação de compostos Si-polifenóis nas células.

Após tratamento com Si, a produção de polifenóis solúveis parece ser estimulada enquanto polifenóis insolúveis são inibidos. Kidd et al (2001) relataram maior produção de polifenóis solúveis (catecol, catequina, quercetina, curcumim) após aplicação de Si como estratégia de aumentar a complexação de Al e, assim, desintoxicar as células aumentando a tolerância de uma cultivar de milho resistente a Al.

Inanaga e Okasaka (1995) e Inanaga et al (1995) relatam que além ser depositado como sílica gel (inerte) na parede celular, o Si participa de complexos do tipo Si-fenóis-carboidratos e Si-lignina-carboidratos e

estabilizam, ainda, a ligação de pectinas-proteínas à lamela média, a semelhança do Ca. Esse envolvimento do Si nessas ligações pode justificar as alterações observadas no metabolismo dos polifenóis.

### **Respostas morfoanatômicas de plantas expostas a metais**

Por muito tempo, o interesse nas respostas de plantas ao estresse por metais pesados envolveu apenas avaliações bioquímicas e fisiológicas. Esse fato pode explicar a idéia equivocada de Marques et al. (2000), ao afirmarem que as espécies tolerantes não diferem morfologicamente das não-tolerantes ou sensíveis aos metais, mas apenas bioquímica e fisiologicamente. Atualmente, os estudos anatômicos e morfológicos estão bastante difundidos e abrangem muitas finalidades. Isso por que as considerações qualitativas e quantitativas que são possíveis com aplicações práticas de anatomia vegetal são de grande valia, tornando esses estudos mais completos e aprofundados. Geralmente, a estrutura anatômica alterada é comparada com a estrutura normal da planta e esta, pode ser utilizada como bioindicadora de adaptações ambientais e da influência destes diferentes fatores sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Em adição às avaliações morfoanatômicas e morfométricas, testes histoquímicos têm sido freqüentemente utilizados para identificação da natureza química de constituintes e metabólitos celulares de interesse específico para o estudo, por exemplo, produção de lipídios, depósitos de ligninas, taninos, sílica, além da identificação de sítios de acúmulo de metais nos tecidos (Vollenweider et al.; 2006; Seregin e Ivanov, 1997).

Esses estudos permitem a observação de diferentes alterações anatômicas e estruturais nas plantas expostas a metais pesados. Dentre essas alterações destacam-se: parede celular do xilema impregnado por material fenólico, degeneração de tubos crivados do floema, espessamento e lignificação da parede celular em tecidos de sustentação, redução da atividade cambial, redução do espaço intercelular com o aumento do tamanho de células do parênquima paliçádico, aumento do tamanho dos vacúolos, condensação do citoplasma, severa plasmólise, condensação de cromatinas, desorganização

estrutural de cloroplastos, ruptura da membrana nuclear, mitocondrial e da membrana plasmática através da peroxidação de lipídios (Vollenweider et al., 2006; Vitória et al., 2006).

A restrição do desenvolvimento radicular é um sintoma, freqüentemente, encontrado em resposta à toxicidade de metais (Sanità di Toppi e Gabbrielli, 1999; Sharma e Dubey, 2005; Shi et al., 2005a). A raiz é o primeiro órgão vegetal a ter contato com o metal. Alterações estruturais nas raízes têm sido associadas à estratégia de defesa e ativação de mecanismos de tolerância (Vázquez et al., 2007). Reduções no diâmetro médio, tamanho de células corticais, espaço intercelular, e aumento do espessamento e lignificação da exoderme e endoderme são algumas das alterações estruturais verificadas em raízes de plantas submetidas ao estresse por metais pesados (Shi et al., 2005a; Sharma e Dubey, 2005). Seregin e Ivanov (2001) sugerem que as paredes celulares da endoderme e periciclo de raízes cultivadas em solo contaminado apresentam uma estrutura e composição que praticamente inibem o transporte apoplástico de íons metálicos no cilindro central. O espessamento da endoderme e das estrias de Caspary impõem uma barreira física efetiva à absorção de metais, em especial, Cd, Pb e Zn (Sharma e Dubey, 2005), contribuindo para a manutenção dos processos fisiológicos vitais da parte aérea.

A lignificação das paredes celulares de plantas sob estresse de metais pesados tem sido bastante estudada, mostrando uma estreita relação com o estresse oxidativo celular (Schützendübel et al., 2001; Díaz et al., 2001; Chaoui e Ferjani, 2005). Em consequência da toxicidade de Ni, polifenóis solúveis aumentaram em folhas de trigo (Pandolfini et al., 1992) e em feijão exposto a Cd (Fuhrer, 1982). Acúmulo de lignina foi observado após tratamento com Cd e Cu em folhas de ervilha (Chaoui e Ferjani, 2005) e em folhas de pimenta como resposta ao estresse de Cu (Díaz et al., 2001).

### **Sítios de acúmulo de metais e mecanismos de tolerância celular**

As plantas possuem mecanismos para regular a acumulação de metais pesados seja na parede celular ou no interior das células. Tais mecanismos

ditam sua capacidade de tolerância e sobrevivência nos ambientes contaminados. O estudo morfoanatômico de plantas expostas ao estresse por metais pesados tem auxiliado os estudos de identificação de sítios de acúmulo de metais nos tecidos vegetais, revelando diferentes estratégias de acumulação entre plantas tolerantes e não-tolerantes.

A tolerância das plantas aos metais pesados é constantemente associada à compartimentalização no vacúolo (Sanita di Toppi e Gabbrielli, 1999; Tong et al., 2004). Porém, a ligação à parede celular também é relatada como um importante mecanismo de tolerância e desintoxicação celular no estresse por metais pesados, principalmente em espécies não hiperacumuladoras (Seregin e Ivanov, 1997; Schützendübel et al., 2001; Vollenweider et al., 2006). Embora sejam mecanismos diferentes, ambos favorecem a redução das concentrações de metais livres no citoplasma.

Quando comparada a compartimentalização vacuolar, menor importância é dada à imobilização de metais na parede celular, o que tem subestimado sua participação nos eventos celulares de tolerância. Isso pode ser atribuído ao fato dos resultados a cerca da localização de metais na célula serem controversos, evidenciando alta dependência da idade e espécie vegetal, do metal, do nível de toxicidade e do método de detecção empregado (Belleghem et al., 2007). Na raiz, o apoplasma cortical é considerado como sítio primário de acumulação de metais pesados, mesmo em plantas hiperacumuladoras tais como, *Arabidopsis halleri* e *Thlaspi caerulescens* (Belleghem et al., 2007; Vázquez et al., 2007). A localização de metais no simplasma é mais comum em tecidos foliares. Neste aspecto, Vázquez et al. (2007) afirmam que a parede celular das raízes é o principal sítio de ligação de Cd em *Lupinus albus*, de modo que pequena parte do Cd foi localizado no vacúolo de células do córtex, enquanto que nas folhas, o Cd foi localizado apenas no meio intracelular, especialmente nos vacúolos.

Metais pesados também têm sido localizados no citoplasma, no entanto, em contraste ao bem estudado seqüestro vacuolar e apoplástico, pouco é entendido a cerca da função da precipitação/quelação citoplasmática com relação ao controle da toxicidade citoplasmática dos metais (Belleghem et al., 2007). No citoplasma, a localização de Cd, Ni e Cu em cloroplastos, mitocôndrias e núcleo têm sido associados a efeitos degenerativos de

membranas biológicas, reduções da atividade fotossintética, respiratória e enzimáticas, contribuindo, ainda, para o estresse oxidativo responsável pela peroxidação de lipídios e morte celular (Vitória et al., 2006).

A capacidade de acumular e tolerar o estresse de metais pesados depende também da natureza do tecido vegetal. Células epidérmicas, tricomas, glândulas e tecidos de suporte podem desintoxicar mais metais que o mesofilo (Vollenweider et al., 2006).

Com base em alterações estruturais e respostas fisiológicas de plantas a presença de metais nas células, tem sido sugerida a interação de metais com várias rotas metabólicas importantes na ativação e manutenção de mecanismos de tolerância celular. Por exemplo, altos teores de peroxidases têm sido encontrados nas células lignificadas, sugerindo que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) age como molécula sinalizadora no processo de lignificação. Sabe-se que as peroxidases fornecerem  $H_2O_2$  necessário à oxidação e polimerização dos precursores da lignina, além de favorecer sua consolidação junto às proteínas e aos carboidratos da parede celular, reduzindo, ao mesmo tempo os níveis de  $H_2O_2$  da célula (Chaoui e Ferjani, 2005). De acordo Schützendübel et al. (2001), a planta sob estresse ativa o metabolismo da lignina com a finalidade de aliviar o desbalanço oxidativo celular e com isso fornece novos sítios de ligação do metal com a estrutura da parede celular.

## **Referências Bibliográficas**

ACCIOLY, A.M.A. **Amenizantes e Estratégias para Estabelecimento de Vegetação em Solos de Áreas Contaminadas por Metais Pesados**. 2001. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 170 p.

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. Contaminação Química e Biorremediação do Solo. **Tópicos de Ciência do Solo**, v.1, p. 299-351, 2000.

ALLOWAY, B.J. **Heavy metals in soils**. New York. John Wiley & Sons, 1990. 339p.



BARBOSA-FILHO, M.P.; SNYDER, G.H.; PRABHU, A.S.; DATNOFF, L.E.; KORNDÖRFER, G.H. Importância do silício para a cultura do arroz: uma revisão de literatura. **Informações agrônômicas**, São Paulo, n.89, 2000. 11p.

BELLEGHEM, F.V.; CUYPERS, A.; SEMANE, B.; SMEETS, K.; ANGRONVELD, J.; D'HAEN, J.; VALCKE, R. Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v.173, n.3, p.495–508, 2007.

CHAOUI, A.E.; FERJANI, E.E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. **Comptes rendus biologies**, v.328, n.1, p.23–31, 2005.

CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. Promises and Prospects of Phytoremediation. **Plant Physiology**, v.110, p.715-719, 1996.

CURRIE, H.A.; PERRY, C. Silica in Plants: Biological, Biochemical and Chemical Studies. **Annals of Botany**, p.1–7, 2007.

DÍAZ, J.; BERNAL, A.; POMAR, F.; MERINO, F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. **Plant Science**, v.161, p.179–188, 2001.

DIETZEL, M. Dissolution of silicates and the stability of polysilicic acid. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.64, n.19, p.3275-3281, 2000.

EPSTEIN, E. Silicon. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.641-664, 1999.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.1, p.11-17, 1994.

FUHRER, J. Early effects of excess cadmium uptake in *Phaseolus vulgaris*. **Plant, Cell e Environment**, v. 5, p.263–270, 1982.

HORIGUCHI, T. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. **Soil Science Plant Nutrition**, v.33, n.4, p.595-606, 1987.

HORIGUCHI, T. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants: IV. Effects of silicon on alleviation of manganese toxicity of rice plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.34, n.1, p.65-73, 1988.

HORST, W.J.; MARSCHNER, H. Effect of silicon on manganese tolerance of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v.50, n.1-3, p.287-303, 1978.

INANAGA, S.; OKASAKA, A. Calcium and silicon binding compounds in cell walls of rice shoots. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.41, n.1, p.103-110, 1995.

INANAGA, S.; OKASAKA, A.; TANAKA, S. Does silicon exist in association with organic compounds in rice plants? **Soil science and plant nutrition**, v.41, n.1, p.111-117, 1995.

IWASAKI, K.; MAIER, P.; FECHT, M.; HORST, W.J. Effects of silicon supply on apoplastic manganese concentrations in leaves and their relation to manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Plant and Soil**, v.238, n.2, p.281-288, 2002b.

IWASAKI, K.; MAIER, P.; FECHT, M.; HORST, W.J. Leaf apoplastic silicon enhances manganese tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Journal of Plant Physiology**, v.159, n.2, p.167-173, 2002a.

KIDD, P.S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELO, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.359, p.1339-1352, 2001.

KORNDÖRFER, G.H.; ARANTES, V.A.; CORRÊA, G.F.; SNYDER, G.H. Efeito do silicato de cálcio no teor de silício no solo e na produção de grãos de arroz de sequeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, n.3, p.635-641, 1999.

KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, H.S.; CAMARGO, M.S. **Silicatos de cálcio e magnésio**. 2. ed. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2002. 23 p. (Boletim Técnico, 1).

LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.17, p.9-18, 2007.

LASAT, M.M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazardous Substance Research**, v.2, p.5-21, 2000.

LIANG, Y.; SUN, W.; ZHU, Y-G.; CHRISTIE, P. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. **Environmental Pollution**, v.147, p.422-428, 2007.

LIANG, Y.; WONG, J.W.C.; WEI, L. Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. **Chemosphere**, v.58, p.475-483, 2005.

LINDSAY, W.L. **Chemical equilibria in soils**. New York, John Wiley & Sons, 1979. 449p.

LUX, A.; LUXOVA, M.; HATTORI, T.; INANAGA, S.; SUGIMOTO, Y. Silicification in sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars with different drought tolerance. **Physiologic Plantarum**, v.115, p.87-92. 2002.

MAKSIMOVIC, J.D.; BOGDANOVIC, J.; MAKSIMOVIC,V.; NIKOLIC, M. Silicon modulates the metabolism and utilization of phenolic compounds in cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown at excess manganese. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.170, n.6, p.739–744, 2007.

MARQUES, T.C.L.L.S.M.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p.121-132, 2000.

MATICHENKOV, V.V.; CALVERT, D.V. Silicon as a beneficial element for sugarcane. **Journal American Society of Sugarcane Technologists**, v.22, p.21-30, 2002.

NASCIMENTO, C.W.A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, v.63, n.3, p.299-311, 2006.

NEUMANN, D.; NIEDEN, U.Z. Silicon and heavy metal tolerance of higher plant. **Phytochemistry**, v.56, p.685-692, 2001.

NEUMANN, D.; ZUR NEIDEN, U.; LICHENBERGER, O.; LEOPOLD, I.; SCHWIEGER W. Heavy metal tolerance of *Minuartia verna*. **Journal Of Plant Physiology**, v.151, n.1, p.101–108, 1997.

NWUGO, C.C.; HUERTA, A.J. Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. **Plant and Soil**, 2008. DOI 10.1007/s11104-008-9659-4

OLIVEIRA, L.A.; KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, A.C. Acumulação de silício em arroz em diferentes condições de pH da rizosfera. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.685-690, 2007.

PAIM, L.A.; CARVALHO, R.; ABREU, C.M.P.; GUERREIRO, M.C. Estudo dos efeitos do silício e do fósforo na redução da disponibilidade de metais pesados em área de mineração. **Química Nova**, v.29, n.1, p.28-33, 2006.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environment**, v.15, n.6, p.719–725, 1992.

ROGALLA, H.; ROMHELD, V. Role of leaf apoplast in silicon-mediated manganese tolerance of *Cucumis sativus* L. **Plant Cell Environment**, v.25, p. 549-555, 2002.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.41, n.2, p.105-130, 1999.

SAVANT, N.K.; KORNDÖRFER, G.H.; DATNOFF, L.E.; SNYDER, G.H. Silicon nutrition and sugarcane production: a review. **Journal of Plant Nutrition**, v.22, n.12, p.1853-1903, 1999.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, O. L.; POLLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. **Plant Physiology**. v.127, n.3, p.887–892, 2001.

SEREGIN, I.V.; IVANOV, V.B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.48, n.4, p.523–544, 2001.

SEREGIN, I.V.; IVANOV, V.B. Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**. v.44, p.791–796, 1997.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.1, p.35-52, 2005.

SHI, Q.H.; BAO, Z.Y.; ZHU, Z.J.; HE, Y.; QIAN, Q.Q.; YU, J.Q. Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. **Phytochemistry**, v.66, n.13, p.1551-1559, 2005b.

SHI, X.H.; ZHANG, C.C.; WANG, H.; ZHANG, F.S. Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. **Plant and Soil**, v.272, n.1-2, p.53-60, 2005a.

SOMMER, M.; KACZOREK, D.; KUZYAKOV, Y.; BREUER, J. Silicon pools and fluxes in soils and landscapes: a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.169, n.3, p.310–329, 2006.

TONG, Y.; KNEER, R.; ZHU, Y. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for Phytoremediation. **Trends in Plants Science**, v.9, n.1, p.7-9, 2005.

TREDER, W.; CIESLINSKI, G. Effect of silicon application on cadmium uptake and distribution in strawberry plants grown on contaminated soils. **Journal of Plant Nutrition**, v.28, n.6, p.917–929, 2005.

VÁZQUEZ, S.; FERNANDEZ-PASCUALB, M.; SANCHEZ-PARDOA, B.; CARPENAA, R.O.; ZORNOZAA, P. Subcellular compartmentalization of cadmium in white lupins determined by energy-dispersive X-ray microanalysis. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p.1235-1238, 2007.

VITÓRIA, A.P.; CUNHA, M.; AZEVEDO, R.A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v.58, n.1, p.47-52, 2006.

VOLLENWEIDER, P.; COSIO, C.; GUNTARDT-GOERG, M.S.; KELLER, C. 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**, v.58, n.1-3, p.25-40, 2006.

WANG, L.; WANG, W.; CHEN, Q.; CAO, W.; LI, M.; ZHANG, F. Silicon-induced cadmium tolerance of rice seedlings. **Journal of Plant Nutrition**, v.23, n.10, p.1397–1406, 2000.

WILLIAMS, D.E.; VLAMIS, J. The effect of silicon on yield and manganese-54 uptake and distribution in the leaves of barley plants grown in culture solutions. **Plant Physiology**, v.32, n.5, p.404-409, 1957.

ZHANG, C.; WANG, L. NIE, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Long-term effects of exogenous silicon on cadmium translocation and toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v.62, p.300–307, 2008.

## **CAPÍTULO I:**

### **DISPONIBILIDADE, ACÚMULO E TOXIDEZ DE CÁDMIO E ZINCO EM MILHO CULTIVADO EM SOLO CONTAMINADO**

## DISPONIBILIDADE, ACÚMULO E TOXIDAZ DE CÁDMIO E ZINCO EM MILHO CULTIVADO EM SOLO CONTAMINADO<sup>1</sup>

### RESUMO

O crescente acúmulo de metais pesados em solos, como consequência de atividades antrópicas, tem causado grande interesse nos estudos de extratores destes elementos, bem como no estabelecimento de seus níveis tóxicos críticos em solos. Um experimento foi realizado em casa de vegetação com os objetivos de: (a) estudar a eficiência de diferentes extratores (DTPA, EDTA, Mehlich-1 e Mehlich-3) na avaliação da disponibilidade de Cd e Zn para plantas de milho cultivadas em solo corrigido e não corrigido com calcário; (b) avaliar o efeito da aplicação de Cd e Zn no crescimento e acúmulo desses metais em plantas de milho, e (c) identificar sintomas visuais de toxidez e alterações anatômicas em folhas e raízes de milho expostas a esses metais. Para tanto, plantas de milho foram cultivadas durante 30 dias em um Argissolo Vermelho-Amarelo que recebeu doses crescentes de Cd (0, 1, 3, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>) ou de Zn (0, 10, 30, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>) com ou sem uma dose de calcário necessária à elevação do pH a 6,0. Ao final do período de cultivo, as plantas foram analisadas quanto aos teores de Cd e Zn, os quais foram correlacionados com os teores desses no solo por ocasião do plantio. Correlações altamente significativas foram encontradas entre todos os extratores testados e os teores de metais absorvidos pelas plantas. O aumento das doses de metais promoveu redução da produção de biomassa, além de aumentar o conteúdo destes metais nas plantas. Os níveis críticos tóxicos de Cd para o Argissolo variaram de 8,7 a 13,1 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto para Zn esses valores situaram-se entre 74,1 e 110,7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para solos com e sem calagem, dependendo do extrator considerado. Os sintomas visuais de toxidez de Cd foram clorose, encarquilhamento e enrolamento de folhas. Para Zn, os sintomas tóxicos mais comuns foram clorose internerval e marginal, associada à necrose no ápice e margens das folhas. O aumento da lignificação das paredes celulares do colênquima, do tecido vascular e da endoderme foi associado a níveis críticos tóxicos de Cd e de Zn no solo.

Termos de indexação: metais pesados, extratores químicos, lignificação.

---

<sup>1</sup> Trabalho recebido em dezembro de 2006, aprovado para publicação em dezembro de 2007 na Revista Brasileira de Ciência do Solo



**SUMMARY: CADMIUM AND ZINC AVAILABILITY, ACCUMULATION AND TOXICITY IN MAIZE GROWN IN A CONTAMINATED SOIL**

A greenhouse experiment was carried out to evaluate: (a) the soil Cd and Zn availability to maize plants with and without liming, using the DTPA, EDTA, Mehlich-1, and Mehlich-3 extractants; (b) The effect of Cd and Zn doses on plant growth and metal accumulation in maize; and (c) toxicity symptoms and anatomical changes in leaves and roots exposed to Cd and zinc. Maize was grown for 30 days in soil contaminated with either Cd (0, 1, 3, 5, 10, 20 mg kg<sup>-1</sup>) or Zn (0, 10, 30, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup>). Highly significant correlations were found between all extractants tested and metal plant contents. The metal addition to soil reduced biomass production and increased Cd and Zn plant contents. The critical toxicity value for Cd in soil varied from 8.7 to 13.1 mg kg<sup>-1</sup>, whereas for Zn this value lied between 74.1 to 110.7 mg kg<sup>-1</sup>, depending on liming and extractant type. Interveinal and marginal chlorosis together with necrosis in the leaf apex and along the margins were observed for Zn treatments. On the other hand, leaf chlorosis, shriveling and curling were the most common symptoms in cadmium-damaged plants. Increased cell wall lignification in vascular tissues, epidermis, collenchyma, and endoderm cells were associated to critical toxicity values of Cd and Zn in soil.

Index terms: heavy metals, chemical extractants, lignification.

**INTRODUÇÃO**

O incremento nos teores de metais pesados no solo tem ocorrido nas últimas décadas principalmente como consequência de atividades humanas, com destaque para mineração, emissões industriais, uso de lodo de esgoto ou fertilizantes e pesticidas na agricultura, além da disposição de resíduos no solo.

Um dos principais fatores que afeta a disponibilidade dos metais pesados às plantas é o pH do solo, o qual apresenta, em geral, relação inversa com a disponibilidade desses elementos (Wu et al., 2006). O efeito negativo da calagem na fitodisponibilidade dos metais é devido, principalmente, ao aumento da capacidade de troca catiônica e à formação de hidróxidos e carbonatos de baixa solubilidade, como: por exemplo: Cd(OH)<sub>2</sub> K<sub>ps</sub> = 2,5 x 10<sup>-14</sup>; Zn(OH)<sub>2</sub> K<sub>ps</sub> = 3,0 x 10<sup>-16</sup>; CdCO<sub>3</sub> K<sub>ps</sub> = 1,8 x 10<sup>-14</sup>; ZnCO<sub>3</sub> K<sub>ps</sub> = 1,0 x 10<sup>-10</sup> (Alloway, 1990).

Para avaliar a disponibilidade de Cd e Zn em solos contaminados, métodos de extração simples, que usam sais neutros ( $\text{CaCl}_2$ ), extratores ácidos (Mehlich-1; Mehlich-3) e agentes quelantes ou complexantes (DTPA; EDTA), têm sido muito utilizados. No entanto, como o teor do elemento varia com o extrator, essas extrações têm apresentado graus variados de sucesso, para diagnose de deficiência ou toxidez desses elementos para as plantas (Nascimento et al., 2002). Vale salientar, ainda, que a maioria desses extratores foi desenvolvida para avaliar a disponibilidade de micronutrientes em solos agrícolas, onde os teores de metais são relativamente baixos. Esse fato pode ser uma das razões para a dificuldade em selecionar um extrator disponível adequado para solos nos quais os metais encontram-se em níveis tóxicos às plantas.

Sintomas de toxidez de metais pesados têm sido bastante estudados em várias espécies e sob diferentes condições (Sanità di Toppi e Gabrielli, 1999). Os efeitos visíveis da exposição a altas doses de metais pesados são, em geral, descritos como redução severa do crescimento, clorose e atrofia foliar. Além desses, relata-se, ainda, para o caso do Cd, o enrolamento das folhas (Benavides et al., 2005). A necrose e a clorose foliar são descritas como sintomas de toxidez de Zn e Cd e, frequentemente, indicam distúrbios na nutrição mineral, como deficiência de Fe e redução da absorção e transporte de água e de vários elementos (Ca, Mg, K e Mn) pelas plantas (Siedlecka ; Krupa, 1996; Benavides et al., 2005).

A capacidade de tolerar o estresse de metais pesados depende da natureza do tecido vegetal. Células epidérmicas, tricomas ou glândulas podem desintoxicar mais Cd que o mesófilo (Benavides et al., 2005). Tecidos de suporte dos feixes vasculares podem também estar envolvidos na acumulação de metais pesados (Vollenweider et al., 2006). De fato, esses tecidos são ricos em sítios de ligação de metais. A microlocalização de Cd, por exemplo, tem sido relacionada com a maior produção de pectinas, ligninas, polifenóis e taninos, compostos que disponibilizam sítios de ligação na parede celular (Sanità di Toppi ; Gabrielli, 1999; Vollenweider et al., 2006). O acúmulo de polifenóis insolúveis, como a lignina na parede celular secundária, tem sido reportado em plantas expostas a metais pesados. Porém, essa lignificação das paredes tem sido associada ao estresse oxidativo celular, tido como efeito indireto da toxidez dos metais (Pandolfini et al., 1992; Schützendübel et al., 2001; Díaz et al., 2001; Chaoui ; Ferjani, 2005).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a disponibilidade de Cd e Zn para plantas de milho com e sem calagem, utilizando diferentes extratores; avaliar o efeito de doses crescentes de Cd e Zn no crescimento e acúmulo desses metais em plantas de milho e identificar sintomas visuais de toxidez e alterações anatômicas em folhas e raízes de milho expostas a esses metais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em casa de vegetação na Universidade Federal Rural de Pernambuco, utilizando amostras superficiais (0–20 cm) de um Argissolo Vermelho-Amarelo, cujas características são: pH em água = 4,9; H + Al = 2,40 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup> = 0,92 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Na<sup>+</sup> = 0,17 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup> = 0,08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>2+</sup> = 0,97 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>2+</sup> = 0,08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; P = 9 mg dm<sup>-3</sup>; CO = 3,45 g kg<sup>-1</sup>; argila = 340 g kg<sup>-1</sup>; silte = 32 g kg<sup>-1</sup>; e areia = 628 g kg<sup>-1</sup> (Embrapa, 1999).

Previamente ao cultivo do milho (*Zea mays* L.), cultivar AG 1051, o solo com ou sem calcário suficiente para elevar o pH a 6,0 recebeu doses crescentes de Cd (0, 1, 3, 5, 10 e 20 mg kg<sup>-1</sup>) e Zn (0, 10, 30, 50, 100 e 150 mg kg<sup>-1</sup>) a partir de soluções preparadas com seus respectivos cloretos. Em seguida, amostras de solo de 2 kg com a sem calagem foram acondicionadas em vasos e incubadas por um período de 30 dias com a umidade mantida em torno de 80 % da capacidade de retenção de água do solo. Após este período, amostras foram retiradas de cada vaso para determinação de pH e teores disponíveis de Cd e Zn por diferentes extratores. Durante o ensaio, os vasos foram mantidos com 80 % da capacidade de retenção de água, mediante pesagem e irrigação diárias para complementação da água perdida por evapotranspiração. Após o desbaste, duas plantas de milho por vaso foram cultivadas por 30 dias. Em seguida, as raízes e a parte aérea das plantas foram separadas, lavadas em água destilada e secas em estufa para obtenção da matéria seca. Estes materiais foram moídos em moinho tipo Willey e, após digestão nitro-perclórica (Embrapa, 1999), foram determinados os teores de Cd e Zn nos extratos por espectrofotometria de absorção atômica. Os teores de Cd e Zn no solo imediatamente antes do plantio foram também analisados por espectrofotometria de absorção atômica nas soluções obtidas com os extratores Mehlich-1 (De Filippo e Ribeiro, 1997), Mehlich-3 (Mehlich, 1984), DTPA (Lindsay e Norvell, 1978) e EDTA (Lantmann e Meurer, 1982).

O ensaio foi efetuado em blocos ao acaso em arranjo fatorial 6 x 2 x 2 (seis doses de metais, dois metais, com ou sem calagem) com três repetições, totalizando 72 unidades experimentais. Os resultados experimentais foram analisados com a aplicação do teste F à análise de variância e por meio de análises de correlação e de regressão, utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS, 1999).

Para estudar as alterações anatômicas, foram coletadas em cada planta amostras de folhas maduras e raízes, as quais foram imediatamente fixadas em solução de FAA 50 (formol, ácido acético e álcool a 50 %) por um período mínimo de 24–48 h, até à confecção de lâminas histológicas semipermanentes (Johansen, 1940).

Foram realizadas secções transversais da região mediana das folhas (nervura e mesófilo) 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 (Bukatsch, 1972). Em seguida, as lâminas foram montadas em glicerina aquosa a 50 % (Strasburger, 1924), selando-se as bordas da lamínula com esmalte incolor. Imagens foram obtidas por meio de câmera digital acoplada a um microscópio óptico, com posterior observação dos caracteres anatômicos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de milho foi influenciada significativamente pela adição das doses de Cd e Zn ao solo (Figura 1). Para o Zn, o comportamento quadrático da produção de matéria seca da parte aérea demonstra sua função na fisiologia do milho como um micronutriente (Figura 1). Verifica-se que a produção de matéria seca da parte aérea aumentou até 27,79 % com relação à testemunha, quando adicionado até 30 mg kg<sup>-1</sup> de Zn. Com base na redução de 21,74 % da produção, a dose de 100 mg kg<sup>-1</sup> de Zn provocou a maior declividade da curva de produção de biomassa. Isto equivale a teores de Zn disponível no solo variando de 74,1 a 110,7 mg kg<sup>-1</sup> para solos com e sem calagem, respectivamente (Tabela 1). Na Europa, em geral, considera-se como tóxico o teor de metal que causa a redução de 25 % no crescimento de planta (SAEFL, 1998). A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA), por outro lado, considera nível tóxico o teor de metal que provoca redução de 50 % do crescimento da planta (King, 1996).

Para o Cd, o aumento das doses foi acompanhado de redução quadrática significativa na produção de matéria seca da parte aérea (Figura 1), o que qualifica um

elemento não-essencial e de potencial fitotóxico elevado. A redução no crescimento e desenvolvimento vegetal causada pelo Cd deve-se à inibição de processos fisiológicos importantes, tais como a fotossíntese e a respiração (Benavides et al., 2005; Vollenweider et al., 2006). Para o Cd, a dose de 10 mg kg<sup>-1</sup> causou redução de cerca de 30 % da produção. Essa redução esteve associada a teores de Cd disponível no solo entre 8,7 e 13,1 mg kg<sup>-1</sup> (Tabela 2).

Os teores de metais recuperados do solo, independentemente do extrator, foram maiores para os tratamentos sem calagem (Tabelas 1 e 2). Os teores médios de Zn disponível, na ausência de calagem, foram maiores com os extratores ácidos (Mehlich-1 e Mehlich-3) seguidos pelos agentes quelantes EDTA e DTPA (Tabela 1). Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos (Nascimento et al., 2002; Araújo e Nascimento, 2005) e relacionam-se com o mecanismo de atuação dos extratores, com maior recuperação de Zn pelos extratores que atacam os colóides por dissolução ácida. O mesmo comportamento não foi observado para os tratamentos com calagem, possivelmente em razão do aumento da afinidade do Zn pelos sítios de adsorção específica no solo, o que diminuiu a capacidade extratora das soluções. Nos tratamentos com calagem, os teores de Zn determinados por DTPA e Mehlich-3 foram maiores (Tabela 1). Resultado diferente foi observado por Martins et al. (2003), que relataram a redução do Zn extraído por DTPA com a calagem, mostrando sua maior sensibilidade à mudança de pH, quando comparado a outros extratores. Tais autores, porém, trabalharam com baixos teores de Zn, refletindo essa discordância de resultados o comportamento diferenciado desses extratores em solos com teores altos de metais.

A recuperação do Cd pelos extratores ácidos foi maior que pelos agentes quelantes, independentemente da calagem (Tabela 2). É conhecida a importância do pH em controlar a adsorção de Cd (Krishnamurti e Naidu, 2003). Todavia, a diferença em magnitude do Cd disponível em tratamento com ou sem calagem não é tão grande quando comparado ao Zn (Tabelas 1 e 2). Segundo Lindsay (1979), para Pb, Cu e Zn, decréscimos de uma unidade de pH (na faixa de 4,0 a 8,0) provocam aumento de 100 vezes em suas atividades, ao passo que a atividade de Cd é pouco influenciada pelo pH, para valores de pH inferiores a 8,0.

As correlações altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre os teores de Cd e Zn nas plantas e os obtidos pelos diferentes extratores (Tabela 3) indicam a eficiência semelhante dos métodos químicos em avaliar a disponibilidade de Cd e de Zn para as plantas em solos contaminados.

Para ambos os metais, o aumento das doses foi acompanhado pelo aumento do teor do elemento na parte aérea (Figura 2), sendo a relação quadrática para o Cd e linear para o Zn, nos tratamentos sem calagem. Isto se deve ao grande potencial fitotóxico do Cd mesmo nas mais baixas doses, enquanto o Zn passa de teores adequados a fitotóxicos apenas com elevadas doses. Os teores de Cd e Zn na parte aérea diferiram significativamente de acordo com a calagem, sendo sempre maiores no solo sem calagem (Figura 2). Isto demonstra o efeito da maior disponibilidade desses metais quando o pH do solo é mais baixo, efeito mais pronunciado para o Zn, o que indica a maior afinidade do Zn pelos sítios de adsorção específicos do solo. Isso pode ser explicado pelo fato de ser o Cd um elemento altamente móvel no solo, encontrado em maior parte na fase trocável.

Os sintomas visuais de toxidez observados para o Zn foram clorose internerval e marginal seguida por necrose no ápice e margens das folhas (Figura 3). Os sintomas de toxidez de Cd mais comumente observados nas plantas durante o ensaio foram clorose, encarquilhamento e enrolamento das folhas, inclusive com secamento destas ao final do ensaio na dose mais alta de Cd, além de severa restrição no crescimento das raízes, que atingiu 94 % na dose 20 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 4).

Alterações anatômicas na célula, como lignificação das paredes celulares, foram associadas ao aumento da exposição aos metais (Figuras 4a e 4c e 5d e 5c). A desintoxicação de metais em plantas pode ser atribuída ao acúmulo de compostos polifenóis, como taninos e ligninas (Vollenweider et al., 2006). Polifenóis solúveis aumentaram em folhas de trigo em consequência da toxidez de Ni (Pandolfini et al., 1992) e em feijão exposto a Cd (Fuhrer, 1982). Acúmulo de lignina foi observado após tratamento com Cd e Cu em folhas de ervilha (Chaoui e Ferjani, 2005) e em folhas de pimenta como resposta ao estresse de Cu (Díaz et al., 2001).

A lignificação da parede celular foi mais pronunciada nos tratamentos com Cd, quando comparada à dos tratamentos com Zn (Figuras 4a e 4c vs 5d e 5c). As folhas de milho tratadas com Cd, mesmo nas doses mais baixas do elemento, apresentaram aumento na lignificação das paredes celulares. Nas folhas dos tratamentos com Zn, no entanto, expressivo aumento de lignificação foi observado apenas na dose mais alta (Figura 5a vs 5d). Resultado semelhante foi encontrado por Chaoui e Ferjani (2005) que, usando concentrações de 20 e 100 µmol L<sup>-1</sup> de Cd ou Cu, observaram que somente o Cd causou aumento da lignificação em folhas de ervilha. A não-essencialidade do Cd às plantas faz com que pequenas doses desse elemento sejam suficientes para o

desencadeamento de mecanismos celulares de defesa. Dessa forma, o efeito do Zn sobre a lignificação assemelha-se ao do Cd apenas quando em altas doses (Figura 4a e 5a).

Nos tratamentos sem calagem, o aumento das doses de metais não foi acompanhado por aumento de lignificação (Figura 4g e 5g). Isto pode ser resultado da maior absorção dos metais nos tratamentos sem calagem (Figura 2), o que leva a uma desordem maior do metabolismo dessas plantas, causando, possivelmente, a inibição da síntese de lignina nas plantas mais estressadas.

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 (Schützendübel et al., 2001; Chaoui e Ferjani, 2005). De acordo com Vollenweider et al. (2006), a indução do metabolismo de polifenóis parece ser uma estratégia da planta em aumentar sítios de ligação na parede celular capazes de complexar o Cd, antes mesmo de o metal provocar danos oxidativos.

O principal tecido a fornecer sítios de ligações ao Cd e Zn em folhas não foi o mesófilo (Figuras 4b e 5b), mas o tecido vascular, as células epidérmicas e células de colênquima com elevado grau de lignificação (Figuras 4a, 4c, 5d e 5c). Certamente, os sítios do mesófilo são altamente sensíveis aos metais (Vollenweider et al., 2006). Não se observam, dessa maneira, alterações marcantes na estrutura do mesófilo entre o tratamento-controle e os com metais (Figuras 4b e 4e, 5b e 5e).

Depósitos de ligninas também foram visíveis nas paredes celulares do xilema de raízes tratadas com Cd e Zn (Figura 6d-f). Algumas variações podem ser verificadas quando comparados tratamentos com e sem calagem, sendo a lignificação das paredes celulares do xilema das raízes menor nos tratamentos sem calagem (Figura 6b e 6c). Este fato pode indicar que a maior disponibilidade de metais em solo com menor pH restringiu o crescimento da parede celular secundária e crescimento radicular nesses tratamentos. A restrição ao crescimento radicular é um sintoma frequentemente encontrado em resposta à toxidez de metais (Sanità di Toppi e Gabbrielli, 1999; Benavides et al., 2005). É possível observar ainda a lignificação mais acentuada das estrias de Caspary nos tratamentos com calagem (Figura 6e e 6f). Essa estrutura presente na endoderme limita o movimento apoplástico do metal, restringindo sua absorção seletiva à via simplástica.

## CONCLUSÕES

1. Correlações altamente significativas foram encontradas entre os extratores testados e os teores de metais absorvidos pelas plantas, indicando eficiência semelhante para avaliação da disponibilidade desses metais em solos contaminados.
2. Os níveis críticos tóxicos de Cd no solo variaram de 8,7 a 13,1 mg kg<sup>-1</sup>, enquanto, para Zn, esses valores situaram-se entre 74,1 e 110,7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, para solos com ou sem calagem, dependendo do extrator.
3. Os sintomas visuais de toxidez de Cd foram clorose, encarquilhamento e enrolamento de folhas. Para Zn, os sintomas tóxicos mais comuns foram clorose internerval e marginal, associada à necrose no ápice e margens das folhas.
4. O aumento da lignificação das paredes celulares do colênquima, do tecido vascular e da endoderme foi associado a níveis críticos tóxicos de Cd e de Zn no solo.

## LITERATURA CITADA

ALLOWAY, B.J. Heavy metals in soils. Glasgow, Blackie Academic and Professional, 1990. 339p.

ARAÚJO, J.C.T. & NASCIMENTO, C.W.A. Fracionamento e disponibilidade de zinco por diferentes extratores em solos incubados com lodo de esgoto. R. Bras. Ci. Solo, 29:977-985, 2005.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M. & TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. Braz. J. Plant Physiol., 17:21-34, 2005.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. Mikrokosmos, 6:255, 1972.

CHAOU, A. & FERJANI, E.E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. C. R. Biol., 328:23-31, 2005.



DE FILIPPO, B.V. & RIBEIRO, A.C. Análise química do solo. Metodologia. 2.ed. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 26p.

DÍAZ, J.; BERNAL, A.; POMAR, F. & MERINO, F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci.*, 161:179-188, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de análise química dos solos, plantas e fertilizantes. Rio de Janeiro, 1999. 370p.

FUHRER, J. Early effects of excess cadmium uptake in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Environ.*, 5:263-270, 1982.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York, Mc Graw Hill, 1940. 523p.

KING, L.D. Soil heavy metals. In: ALVAREZ V., V.H.; FONTES, L.E. & FONTES, M.P. O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Universidade Federal de Viçosa, 1996. p.823-836.

KRISHNAMURTI, G.S.R. & NAIDU, R. Solid-solution equilibria of cadmium in soils. *Geoderma*, 113:17-30, 2003.

LANTMANN, A.F. & MEURER, E.J. Estudos da eficiência de extratores para avaliação do zinco disponível do solo para o milho. *R. Bras. Ci. Solo*, 6:131-135, 1982.

LINDSAY, W.L. Chemical equilibria in soil. New York, John Wiley, 1979. 439p.

LINDSAY, W.L. & NORVELL, W.A. Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42:421-428, 1978.

MARTINS, A.L.C.; BATAGLIA, O.C.; CAMARGO, O.A. & CANTARELLA, H. Produção de grãos e absorção de Cu, Fe, Mn e Zn pelo milho em solo adubado com lodo de esgoto, com e sem calcário. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:563-574, 2003.

MEHLICH, A. MEHLICH-3 Soil test extractant: A modification of Mehlich-2 extractant. *Comm. Soil Sci. Plant. Anal.*, 15:1409-1416, 1984.

NASCIMENTO, C.W.A.; FONTES, R.L.F.; NEVES, J.C.L. & MELÍCIO, A.C.F.D. Fracionamento, dessorção e extração química de zinco em Latossolos. R. Bras Ci Solo, 26:599-606, 2002.

PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R. & COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. Plant Cell Environ., 15:719-725, 1992.

SANITÀ di TOPPI, L. & GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. Environ. Exper. Bot., 41:105-130, 1999.

SAS Institute. Statistical analysis system. Procedure guide for personal computer. Cary, 1999.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, O.L.E. & POLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. Plant Physiol., 127:887-892, 2001.

SIEDLECKA, A. & KRUPA, Z. Interaction between cadmium and iron and its effects on photo-synthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. Biochem., 34:833-841, 1996.

STRASBURGER, E. Handbook of practical botany. New York, MacMillan, 1924. 532p.

SWISS AGENCY FOR THE ENVIRONMENT, FORESTS AND LANDSCAPE - SAEFL. Critical loads of acidity for forest soils – Regional-ized PROFILE model. Bern, 1998.102p. (Environmental Documentation Air/Forest, 88)

VOLLENWEIDER, P.; COSIO, C.; GUNTARDT-GOERG, M.S. & KELLER, C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. Environ. Exper. Bot., 58:1-16, 2005.

WU, J.; NORVELL, W.A. & WELCH, R.M. Kriging on highly skewed data for DTPA-extractable soil Zn with auxiliary information for pH and organic carbon. Geoderma, 134:187-199, 2006.

**Tabela 1.** Teores de Zn ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) pelos extratores DTPA, EDTA, Mehlich-1 (M-1) e Mehlich-3 (M-3) em solo contaminado com doses crescentes de Zn com e sem calagem

<b>Dose</b>	<b>DTPA</b>	<b>EDTA</b>	<b>M-1</b>	<b>M-3</b>
$\text{mg kg}^{-1}$	<b>Solo sem calagem</b>			
0	1,82	2,69	3,79	4,20
10	9,92	12,14	14,47	15,16
30	26,17	27,87	38,05	36,96
50	44,81	43,33	50,91	52,15
100	101,47	96,48	110,75	106,83
150	151,69	146,15	154,52	151,85
<b>Médias</b>	<b>55,98</b>	<b>54,77</b>	<b>62,08</b>	<b>61,19</b>
<b>CV (%)</b>	<b>1,48</b>	<b>3,33</b>	<b>4,95</b>	<b>2,46</b>
	<b>Solo com calagem</b>			
0	1,20	1,54	2,15	3,52
10	7,92	9,70	12,78	12,20
30	23,57	21,57	30,22	25,98
50	39,70	40,45	46,83	47,61
100	95,63	78,95	74,15	97,00
150	147,93	123,45	125,75	138,48
<b>Médias</b>	<b>52,66</b>	<b>45,94</b>	<b>48,65</b>	<b>54,13</b>
<b>CV (%)</b>	<b>1,44</b>	<b>4,48</b>	<b>5,53</b>	<b>2,82</b>

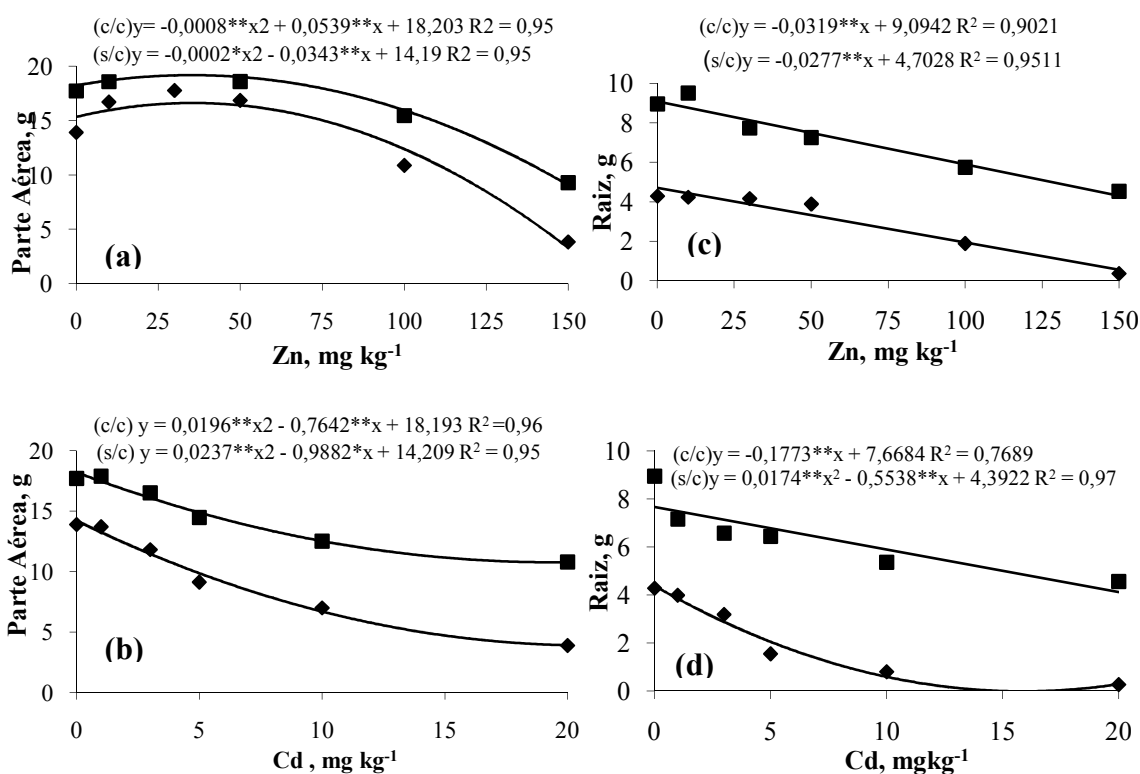
**Tabela 2.** Teores de Cd ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) pelos extratores DTPA, EDTA, Mehlich-1 (M-1) e Mehlich-3 (M-3) em solo contaminado com doses crescentes de Cd com e sem calagem

<b>Dose</b>	<b>DTPA</b>	<b>EDTA</b>	<b>M-1</b>	<b>M-3</b>
$\text{mg kg}^{-1}$	<b>Solo sem calagem</b>			
0	0,01	0,12	0,65	0,89
1	0,98	1,35	1,78	1,81
3	3,03	3,12	4,29	4,36
5	4,68	4,96	6,15	6,36
10	9,69	10,00	11,83	13,09
20	19,01	20,15	23,11	22,93
<b>Médias</b>	<b>6,23</b>	<b>6,62</b>	<b>7,97</b>	<b>8,24</b>
<b>CV (%)</b>	<b>7,37</b>	<b>4,84</b>	<b>5,73</b>	<b>6,18</b>
	<b>Solo com calagem</b>			
0	0,00	0,09	0,37	0,45
1	0,78	0,90	1,38	1,39
3	2,30	2,34	3,59	4,12
5	4,04	4,21	5,88	6,07
10	8,68	8,87	10,83	11,93
20	16,95	17,58	21,05	21,54
<b>Médias</b>	<b>5,46</b>	<b>5,66</b>	<b>7,18</b>	<b>7,58</b>
<b>CV (%)</b>	<b>11,32</b>	<b>8,86</b>	<b>5,85</b>	<b>12,54</b>

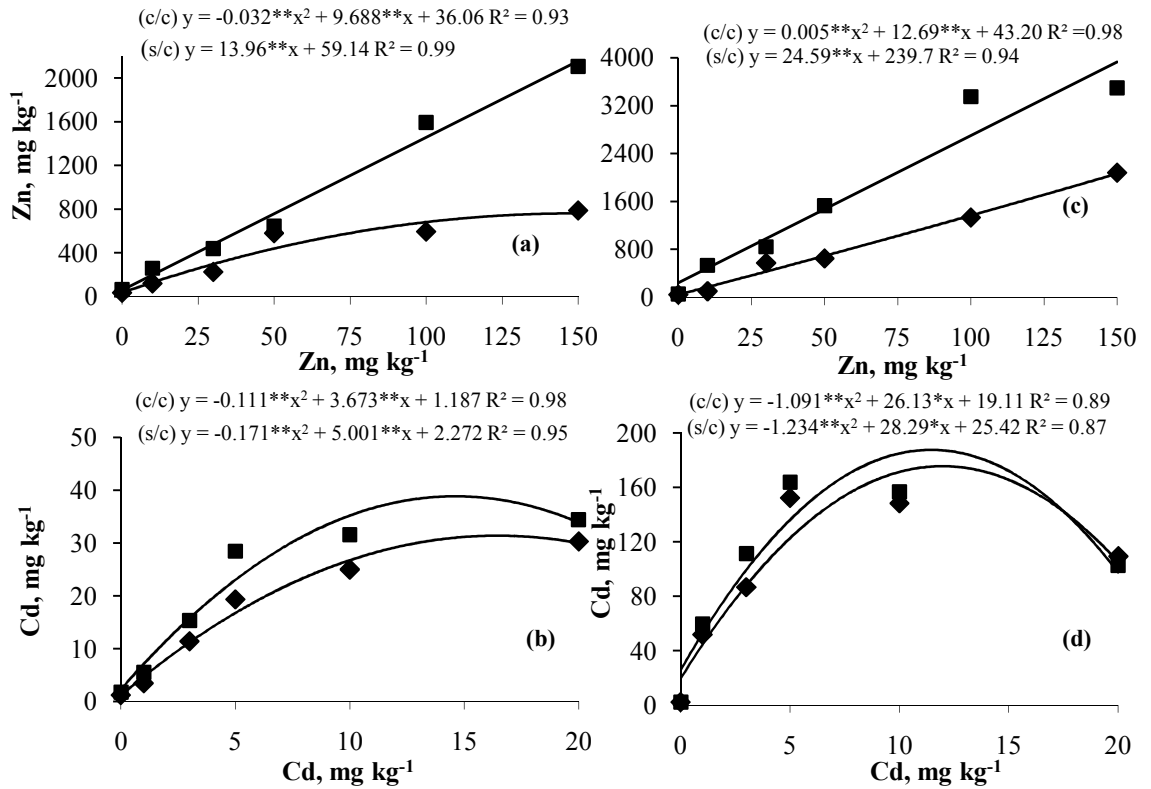
**Tabela 3.** Coeficientes de correlação linear simples entre os teores de Zn e Cd obtidos por extratores químicos e os teores na parte aérea e raiz de milho cultivados em solo com e sem calagem e contaminado com doses crescentes de Zn e Cd

	M-1	M-3	EDTA	DTPA
<b>Zn</b>				
Solo com calagem				
Parte Aérea	0,93**	0,92**	0,92**	0,90**
Raiz	0,99**	0,98**	0,99**	0,99**
Solo sem calagem				
Parte Aérea	0,99**	0,99**	0,99**	0,99**
Raiz	0,51*	0,50*	0,48*	0,48*
<b>Cd</b>				
Solo com calagem				
Parte Aérea	0,91**	0,92**	0,91**	0,91**
Raiz	0,91**	0,91**	0,91**	0,15 <sup>ns</sup>
Solo sem calagem				
Parte Aérea	0,82**	0,83**	0,79**	0,81**
Raiz	0,79**	0,81**	0,81**	0,10 <sup>ns</sup>

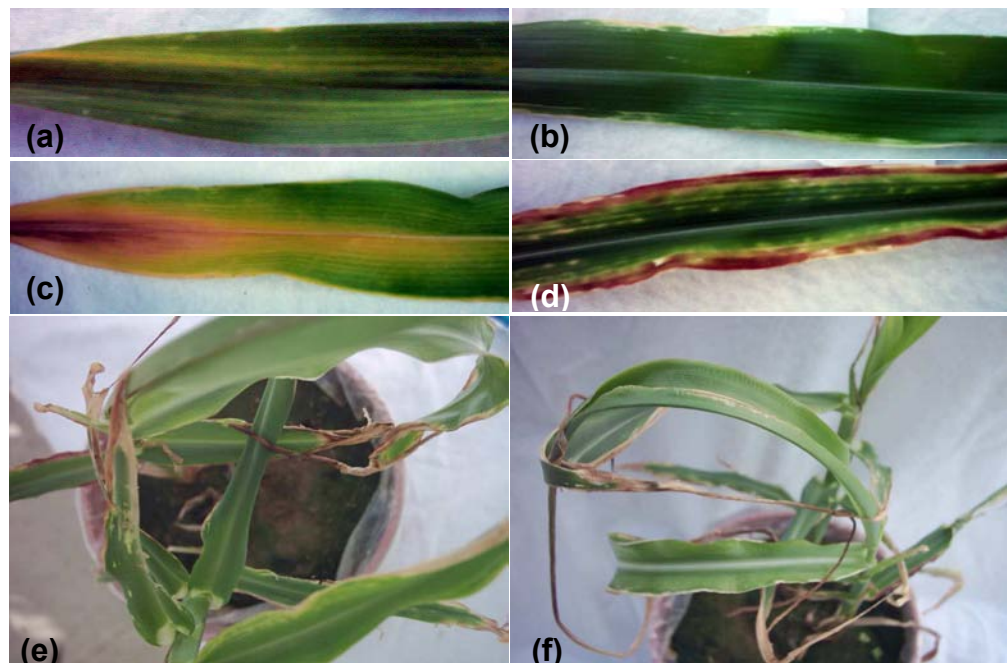
\*, \*\* e <sup>ns</sup>: significativos a 5 e <0,1%, respectivamente, e não significativo.



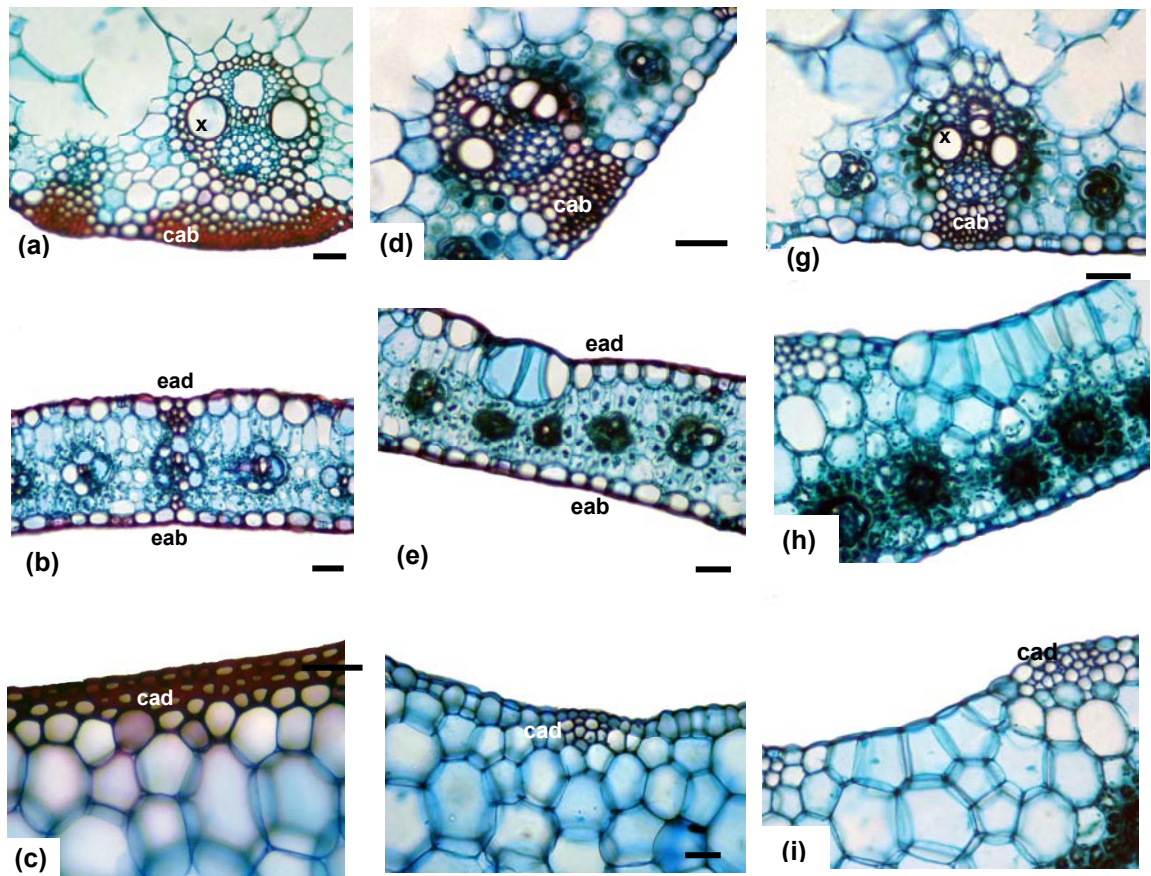
**Figura 1.** Produção de matéria seca da parte aérea e raiz de milho submetido a doses crescentes e Cd e Zn no solo com (■) e sem (◆) calagem.



**Figura 2.** Teores de Zn e Cd na parte aérea (a) e (b) e raiz (c) e (d) de milho submetido a doses crescentes de metais no solo com (■) e (◆) sem calagem.

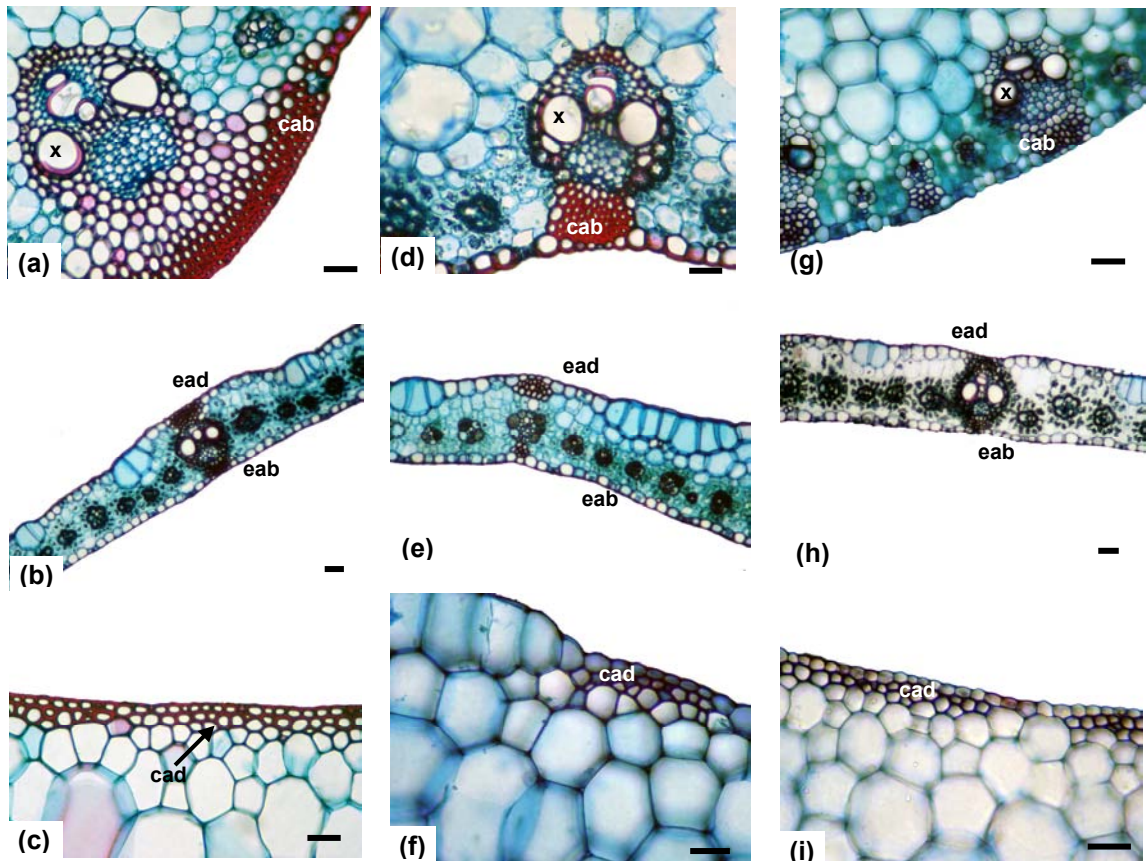


**Figura 3.** Sintomas visuais da toxicidade de Zn e Cd em plantas de milho cultivadas em solo contaminado com 50 mg kg<sup>-1</sup> de Zn (a) e (b); 100 mg kg<sup>-1</sup> de Zn (c) e (d); e com 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd (e) e (f).

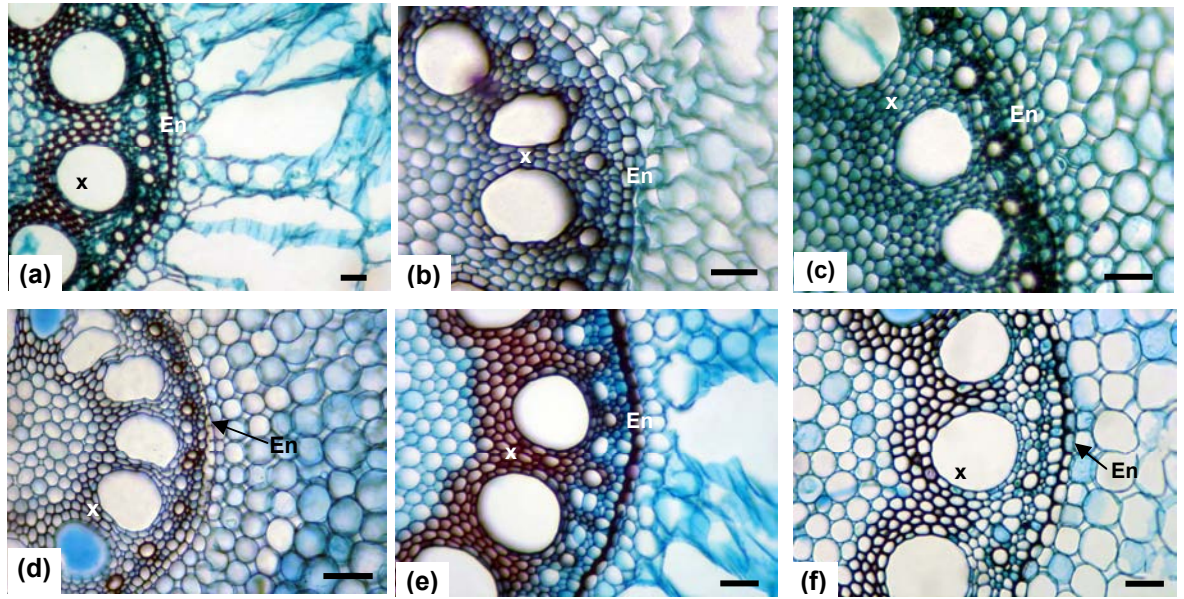


**Figura 4.** Alterações estruturais no tecido vascular, células epidérmicas e colenquimáticas de folhas de milho cultivadas em solo contaminado com Cd. Folhas expostas a  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd, (A-C) tratamento com calagem e (G-I) tratamento sem calagem; (D-F) tratamento controle. x: xilema; cab: colênquima abaxial; cad: colênquima adaxial; eab: epiderme abaxial; ead: epiderme adaxial. Barras:  $50 \mu\text{m}$ .





**Figura 5.** Alterações estruturais no tecido vascular, células epidérmicas e colenquimáticas de folhas de milho cultivadas em solo contaminado com Zn. Folhas expostas a  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn, (a) a (c) tratamento com calagem e (g) a (i) tratamento sem calagem; (d), folha exposta a  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ ; (e) a (f) tratamento controle. x: xilema; cab: colênquima abaxial; cad: colênquima adaxial; eab: epiderme abaxial; ead: epiderme adaxial. Barras:  $50 \mu\text{m}$ .



**Figura 6.** Alterações estruturais na raiz de milho cultivada em solo contaminado com Cd e Zn, sem calagem (a) a (c) e com calagem (d) a (f). Raízes dos tratamentos controles (a) e (d), (b) e (e) raízes expostas a 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd e (c) e (f) a 150 mg kg<sup>-1</sup> de Zn. x: xilema; En: endoderme. Barras: 50μm.



## **CAPÍTULO II:**

**SILICON ALLEVIATES THE TOXICITY OF CADMIUM AND ZINC FOR MAIZE  
(*Zea mays* L.) GROWN ON A CONTAMINATED SOIL**

**Silicon alleviates the toxicity of cadmium and zinc for maize  
(*Zea mays* L.) grown on a contaminated soil**

Key words: heavy metals / soil pollution / phytoremediation / soil remediation

No. of text pages: 12

No. of tables: 1

No. of figures: 3

Running title: Alleviation of Cd and Zn toxicity by Si

## ABSTRACT

Although silicon (Si) is not an essential element, it presents a close relationship with the alleviation of heavy metal toxicity to plants. This work was carried out to evaluate the effects of Si application to soil on the amelioration of metal stress to maize grown on a contaminated soil amended with Si (0, 50, 100, 150, and 200 mg kg<sup>-1</sup>) as calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>). Additionally, the cadmium (Cd) and zinc (Zn) bioavailability as well as their distribution into soil fractions was also studied. The results showed that adding Si to a Cd and Zn-contaminated soil effectively diminished the metal stress and resulted in biomass increase in comparison to metal contaminated soil not treated with Si. This relied on Cd and Zn immobilization in soil rather than on the increase of soil pH driven by calcium silicate application. Silicon altered the Cd and Zn distribution in soil fractions, decreasing the most bioavailable pools and increasing the allocation of metals into more stable fractions such as organic matter and crystalline iron oxides.

## 1 Introduction

Contamination of soils with toxic metals has often resulted from human activities, especially those related to mining, industrial emissions, disposal or leakage of industrial wastes, application of sewage sludge to agricultural soils, as well as fertilizer and pesticide use. Due to the potential toxicity and high persistence of metals, soils polluted with such elements are an environmental problem that threatens the animal and human health (*Nascimento and Xing, 2006*).

The application of silicates to immobilize metals in soil has been studied extensively. Silicon (Si) has been shown to ameliorate the deleterious effects of metals for plants grown on contaminated soils (*Chen et al., 2000; Neumann and Nieten, 2001; Liang et al., 2005; Liang et al., 2007*). Silicates are able to convert the soluble and

exchangeable fractions of metals in soil into stable chemical forms, decreasing the metal bioavailability. Such a reduction in metal bioavailability is attributed to precipitation, humification, and redox reactions (*Cheng and Hseu, 2002; Dietzel, 2000; Sommer et al., 2006*) and alleviates the metal deleterious effects on plants grown on Si-treated soil (*Neumann and Nieten, 2001; Liang et al., 2005; Liang et al., 2007; Cunha et al., 2008*).  $\text{SiO}_3^{2-}$  anions are protonated in soil solution increasing pH and decreasing metal activity owing to precipitation of metal-hydroxyl compounds. Besides, silicate addition to soil promotes polymerization of silicate composites, referred to as potential ligands to heavy metal complexes (*Dietzel, 2000; Sommer et al., 2006*).

Silicon amelioration of heavy-metal phytotoxicity is not only due to the decreased bioavailability of metals in Si-treated soils but also relies on Si effects inside the plant. Although Si is not essential to higher plants, it presents a close relationship with the amelioration of heavy-metal phytotoxicity (*Epstein, 1999; Liang et al., 2007*). The main mechanisms of Si amelioration of metal stress in plants include: (1) coprecipitation or complexation of metals with Si, (2) inhibition of metal translocation from roots to shoots, (3) compartmentation of metal ions within plants, and (4) stimulation of antioxidant systems in plants (*Neumann and Nieten 2001; Shi et al. 2005; Kirkham, 2006; Liang et al., 2007*).

Most studies dealing with Si-mediated alleviation of metal stress in plants were carried out in hydroponics. Studies on soil are necessary to integrate soil reactions and physiological responses of plants grown on contaminated soils amended with silicates. The present work aimed at studying the effects of Si application on soil pH, Cd and Zn bioavailability as well as their distribution into soil fractions. Additionally, the effects of

Si doses on maize (*Zea mays* L.) biomass and accumulation of Cd and Zn were also studied.

## 2 Material and methods

The study was carried out in a greenhouse using samples of a Typic Kandudult soil presenting the following chemical characteristics:  $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = 4.9$ ;  $\text{H}^+ + \text{Al}^{3+} = 2.40 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Al}^{3+} = 0.92 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Na}^+ = 0.17 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{K}^+ = 0.08 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Ca}^{+2} = 0.97 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{Mg}^{+2} = 0.08 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ;  $\text{P} = 9 \text{ mg dm}^{-3}$ ;  $\text{C} = 3.45 \text{ g kg}^{-1}$ ; clay =  $340 \text{ g kg}^{-1}$ ; silt =  $32 \text{ g kg}^{-1}$ ; and sand =  $628 \text{ g kg}^{-1}$ .

Chloride solutions of Cd or Zn were applied to a 2 kg soil sample in order to achieve the concentrations of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of Cd and  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  of Zn. The Cd- or Zn-amended samples were kept incubated for a 30 d period at 80% of the water-holding capacity. Then, the soil was air-dried and doses of Si (0, 50, 100, 150, 200  $\text{mg kg}^{-1}$ ) as calcium silicate ( $\text{CaSiO}_3$ ) were applied to the contaminated soil. The soil and the silicate were homogenized and incubated for an additional 30 d period at 80% of the water holding capacity. After this period, soil samples were taken from each pot in order to determine pH, DTPA-available concentration (*Lindsay and Norvell, 1978*) and Si soluble concentration (*Raij and Camargo, 1973*).

A sequential extraction procedure was performed (*Shuman, 1985; Chao and Zhou, 1983*) to assess the distribution of Cd and Zn into soil fractions after Si addition. This fractionation separated the metals in the pools: exchangeable, organic matter, amorphous iron oxide, and crystalline iron oxide. The sequential extraction consisted of the following steps:

**Exchangeable Fraction (Ex).** In 50.0 mL centrifuge tube, a mixture of 5.0 g of soil and 20.0 mL of 1 mol L<sup>-1</sup> Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> was agitated for 2 h; the mixture was then centrifuged for 10 min at 2000 g and the supernatant filtered and separated; 20.0 mL of distilled water were added; another agitation was performed for 3 min; a new centrifugation was performed, and the supernatant filtered and separated again. The two supernatants were combined and stored for analysis. The sequential extraction continued for the remaining soil sample.

**Organic Matter Fraction (OM).** 10.0 mL of NaClO, 5-6% at pH 8.5, were added to the Ex-free soil sample; the system was heated to 100°C for 30 min, and agitated periodically; thereafter, the sample was centrifuged, and the supernatant was filtered. This procedure was repeated twice, and the three separated supernatants were combined. 10.0 mL of distilled water were added to the sample in the centrifuge tube. After shaking the mixture for 3 min, it was centrifuged, filtered, and the separated supernatant was added to the three combined extracts from the NaClO extraction and stored for analysis. The sequential extraction continued for the remaining soil sample.

**Amorphous Iron Oxide Fraction (AFeOx).** 30.0 mL of NH<sub>2</sub>OH.HCl (hydroxylamine hydrochloride), 0.1 mol L<sup>-1</sup> plus HCl 0.25 mol L<sup>-1</sup>, at pH 3.0, were added to the OM-free soil sample, and the mixture was agitated for 30 min, centrifuged and filtered; the separated supernatant was stored for analysis. To continue the sequential extraction, 15.0 mL of distilled water were added to the centrifuge tube and shaken for 3 min, and the supernatant was discarded.

**Crystalline Iron Oxide Fraction (CFeOx).** 30.0 mL of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ammonium oxalate), 0.2 mol L<sup>-1</sup> + H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (oxalic acid) 0.2 mol L<sup>-1</sup> + ascorbic acid 0.01 mol L<sup>-1</sup>, at pH 3.0, were added to the AFeOx-free soil sample, the mixture was heated to 100°C for 30 min, agitated periodically, and thereafter was centrifuged and filtered; the separated supernatant was stored for analysis.

Before sowing, the samples were fertilized with all plant nutrients, except Zn for treatments containing this element. Maize seeds (*Zea mays* L.) were sown directly in the pots and thinned to two plants per pot 5 d after germination. Plants were watered to 80% of the soil water-holding capacity on a daily basis by weighing the pots and adding water to compensate for any weight loss. After a 30 d period of cultivation, the roots and shoots were collected and dried in an oven at 65°C. After drying, the plant samples were ground and digested in a mixture of HNO<sub>3</sub> : HClO<sub>4</sub> (3 : 1 v/v). The concentrations of Cd and Zn in the extracts were determined by atomic absorption spectrometry.

The experiment followed a randomized factorial block design 2 × 5 (Cd or Zn addition × 5 doses of Si), with three replications, totaling 30 experimental units. The results were analyzed by applying F test to ANOVA, and correlation and regression analyses performed by Statistical Analyses System software (SAS, 1999).

### 3 Results and discussion

There was a significant interaction ( $P \leq 0.05$ ) between doses of Si, Cd and Zn for all the characteristics tested, except soil pH. This interaction indicates that the effect of Si either in soil or plant was dependent on the metal considered. Application of Si to soil allowed a linear and highly significant increase for root and shoot biomass of maize plants (Fig. 7). This result of a Si-alleviating effect on Cd and Zn phytotoxicity may be a consequence of decreased metal availability or of detoxification within the plants. *Li et al.* (2008) reported that Si fertilizer lowered the concentrations of available Cu and Cd to rice by 56% and 18.8%, respectively. *Cheng and Hseu* (2002) found that silicate slag was effective in diminishing the exchangeable concentrations of Cd and Pb in two contaminated soils as well as decreased the concentration of such metals in Chinese cabbage plants.

The root and shoot biomass was increased 82 and 67%, respectively, by applying 200 mg kg<sup>-1</sup> of Si to soil samples contaminated with 10 mg kg<sup>-1</sup> of Cd. For the soil contaminated with 100 mg kg<sup>-1</sup> of Zn, the biomass increased 80 and 59%, respectively. The high correlation between available Si and biomass (Tab. 4) corroborates the beneficial effect of Si on plants grown under heavy metal stress. The biomass increase was also well correlated with low Cd and Zn bioavailability. As pointed out by *Liang et al* (2007), these results may be explained in terms of external mechanisms of Si-mediated metal stress alleviation. Nevertheless, internal tolerance mechanisms mediated by Si are also important (*Neumann and Nieden*, 2001; *Shi et al.* 2005; *Liang et al.*, 2005; *Cunha et al.*, 2008; *Cunha and Nascimento*, 2008).

((Figure 7))

((Table 4))

Adding up to 150 mg kg<sup>-1</sup> of Si to soil resulted in higher plant accumulation of Cd and Zn (Fig. 8). Higher doses, however, decreased the plant metal accumulation as observed earlier (*Chen et al.*, 2000; *Liang et al.*, 2005; *Shi et al.*, 2005). It is likely that the high plant biomass in Si-treated soil provokes a dilution effect on metal concentration whereby metal damages to plants may be diminished. Such an effect on biomass yield along with metal accumulation can be useful for phytoextraction technology in which reduced phytotoxicity with simultaneous metal accumulation is desirable (*Nascimento et al.*, 2006). Regarding the metal allocation in plants, 84% and 74% of Cd and Zn, respectively, were retained in roots. The Si role on lowering the metal translocation to shoots was probably accomplished due to Si deposition on cell wall forming a barrier to the apoplastic route of metals (*Shi et al.*, 2005).



((Figure 8))

DTPA extracts were not efficient in predicting the Cd availability to plants (Tab. 4). On the other hand, it estimated well the Zn-available concentration ( $r = 0.79^{**}$ ). Cd and Zn concentrations in the exchangeable fraction presented a significant correlation with Cd and Zn in plants ( $r = 0.50^*$  and  $0.73^{**}$ , respectively), suggesting that such pool is the main reservoir of readily available metals. The high DTPA correlation with Cd ( $r = 0.93^{**}$ ) and Zn ( $r = 0.77^{**}$ ) exchangeable fractions corroborates such an assumption.

The Si content in soil presented a linear and significant increase ( $P < 0.01$ ) as a function of Si doses, reaching values 50% higher than the control at the  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  dose. The addition of Si did not cause significant alterations in soil pH, which remained around 5.3. The pH increase of contaminated soils treated with Si was reported by some authors as the reason for the decreased metal bioavailability and plant uptake (*Chen et al.*, 2000; *Liang et al.*, 2005; *Liang et al.*, 2007). Despite the unchanged pH, available Cd and Zn were linearly decreased through Si application to soil (Fig. 9). This result suggests that soil pH increase did not play a major role in decreasing metal bioavailability in contaminated soils treated with Si. Co-precipitation of metal-Si complexes rather than pH elevation seemed to account for diminishing plant Cd and Zn uptake. It is worth mentioning that such contradictory results regarding Si effects on soil pH can be due to the different doses and sources of Si used. For instance, *Liang et al.* (2005) reported significant soil pH increase only for Si doses as high as  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ . Therefore, the lower doses tested in the present work allowed for isolating the Si-

mediated immobilization of metals in soil from the pH effects found by several authors (Chen et al, 2000; *Liang et al.*, 2005; *Liang et al.*, 2007).

((Figure 9))

The Cd and Zn availability to plants was decreased 24% and 41%, respectively, as a consequence of applying 200 mg kg<sup>-1</sup> of Si to soil. The application of doses higher than 100 mg dm<sup>-3</sup> of Si alters the coordination of Si from four to six. This provokes Si polymerization and hence forms insoluble complexes with soil heavy metals (*Dietzel*, 2000). The metal bioavailability decrease in the Si-amended soil was higher for Zn than for Cd as can be concluded from the respective angular coefficient values (Fig. 9). Zinc silicates are apparently less soluble than Cd silicates in soil. This is probably the cause for higher Si efficiency in reducing Zn bioavailability in soil since they form lesser soluble silicates than Cd.

Cd and Zn predominated in the soil exchangeable and organic matter fractions (Fig. 9). Even in soil samples not Si-treated, Cd bound to organic matter was the major fraction in soil whereas Zn was mainly retained in the exchangeable fraction. The higher the Si dose the lower was the Cd concentrations in exchangeable fractions (Fig. 9). Such a decrease for exchangeable Cd was paralleled by a linear increase for Cd bound to organic matter. The linear increase of Zn organic matter and crystalline Fe oxide fractions was also related to a linear reduction of the Zn-exchangeable fraction. In soil samples without Si addition, 47 and 70% of the total Cd and Zn were in the exchangeable fraction. After adding 200 mg kg<sup>-1</sup> of Si, these values decreased to 32 and

40%, respectively. The Si effect on readily available metal concentration in soil was more pronounced for Zn than for Cd (Fig. 9). This result corroborates once more the higher affinity of this metal for less available soil fractions as compared to Cd. In addition, Zn bound to crystalline Fe oxide, a fairly insoluble fraction, was increased by Si doses while Cd was not detected in the Fe oxide fraction.

The highly positive correlation (Tab. 4) between the soluble Si and Zn crystalline Fe oxide fraction suggests that Zn silicates may be co-precipitated on oxides surface. Polymerization of silicate composites has been observed at Fe oxide surfaces and complex bonds between silicic acid and the organic compounds of soil solutions are known (Sommer et al 2006). On the other hand, soluble Si seems not to influence Cd on oxide fractions, since there was no correlation between these variables. The negative and significant correlation between soluble Si and DTPA-extracted Cd and Zn (-0.82\*\* and -0.90\*\*, respectively) corroborates the Si-mediated soil immobilization of these metals. Silicon promoted a significant increase in Cd and Zn bound to organic matter (0.65\*\* and 0.80\*\*, respectively) as a result of decreased exchangeable Cd and Zn contents (-0.79\*\* and -0.84\*\*, respectively). The redistribution of Cd and Zn from exchangeable fractions to organic matter and crystalline Fe oxide fractions supports the lower bioavailability of these metals in Si-treated soils as assessed by DTPA ( $r=-0.72^{**}$  and  $-0.86^{**}$ , respectively).

#### 4 References

- Chao, T. T., Zhou, L. (1983): Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 224-232.
- Chen, H. M., Zheng, C. R., Tu, C., She, Z. G. (2000): Chemical methods and

- phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere* 41, 229–234.
- Cheng, S., Hseu, Z. (2002). *In-Situ* immobilization of cadmium and lead by different amendments in two contaminated soils. *Water Air Soil Poll.* 140, 73-84.
- Cunha, K. P. V., Nascimento, C. W. A. (2008). Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. *Water Air Soil Poll.* doi: 10.1007/s11270-008-9814-9.
- Cunha, K. P. V., Nascimento, C. W. A., Pimentel R. M. M, Ferreira, C. P. (2008). Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a cadmium contaminated soil with and without liming. *J. Hazard. Mater.* doi:10.1016/j.jhazmat.2008.02.118.
- Dietzel, M. (2000). Dissolution of silicates and the stability of polysilicic acid. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 64, 3275-3281.
- Epstein, E. (1999). Silicon. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 50, 641-664.
- Kirkham, M.B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma* 137, 19-32.
- Li, P., Wang, X., Zhang, T., Zhou, D., He, Y. (2008). Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil. *J. Environ. Sci.* 20, 449-455.
- Liang, Y., Sun, W., Zhu, Y.-G., Christie, P. (2007). Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. *Environ. Pollut.* 147, 422-428.
- Liang, Y., Wong, J. W. C., Wei, L. (2005). Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. *Chemosphere* 58, 475-483.
- Lindsay, W. L., Norvell, W. A. (1978). Development of DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421-428.
- Nascimento, C. W. A., Amarasiriwardena, D., Xing, B. (2006). Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environ. Poll.* 140, 114-123.
- Nascimento, C. W. A.; Xing, B. (2006). Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Sci. Agric.* 63, 299-311.
- Neumann, D. E., Nieren, U. Z. (2001). Silicon and heavy metal tolerance of higher plant. *Phytochemistry* 56, 685-692.

Raij, B. V., Camargo, O. A. (1973). Sílica solúvel em solos. *Bragantia* 32, 223-236.

Sas Institute (1999). Statistical analysis system. Procedure guide for personal computer. Cary.

Shi, X. H., Zhang, C. C., Wang, H., Zhang, F. S. (2005). Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. *Plant Soil* 272, 53-60.

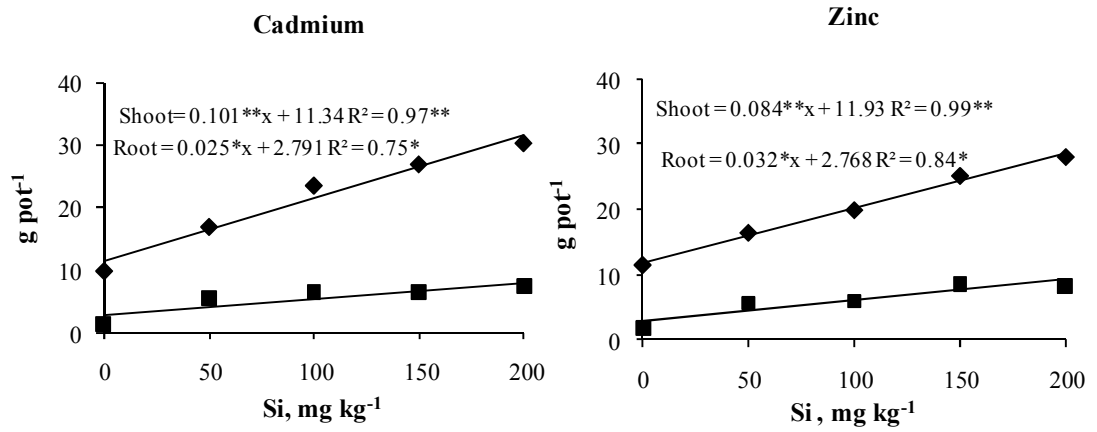
Shuman, L. M. (1985). Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.* 140, 11-22.

Sommer, M., Kaczorek, D., Kuzyakov, Y., Breuer, J. (2006). Silicon pools and fluxes in soils and landscapes: a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169, 310–329.

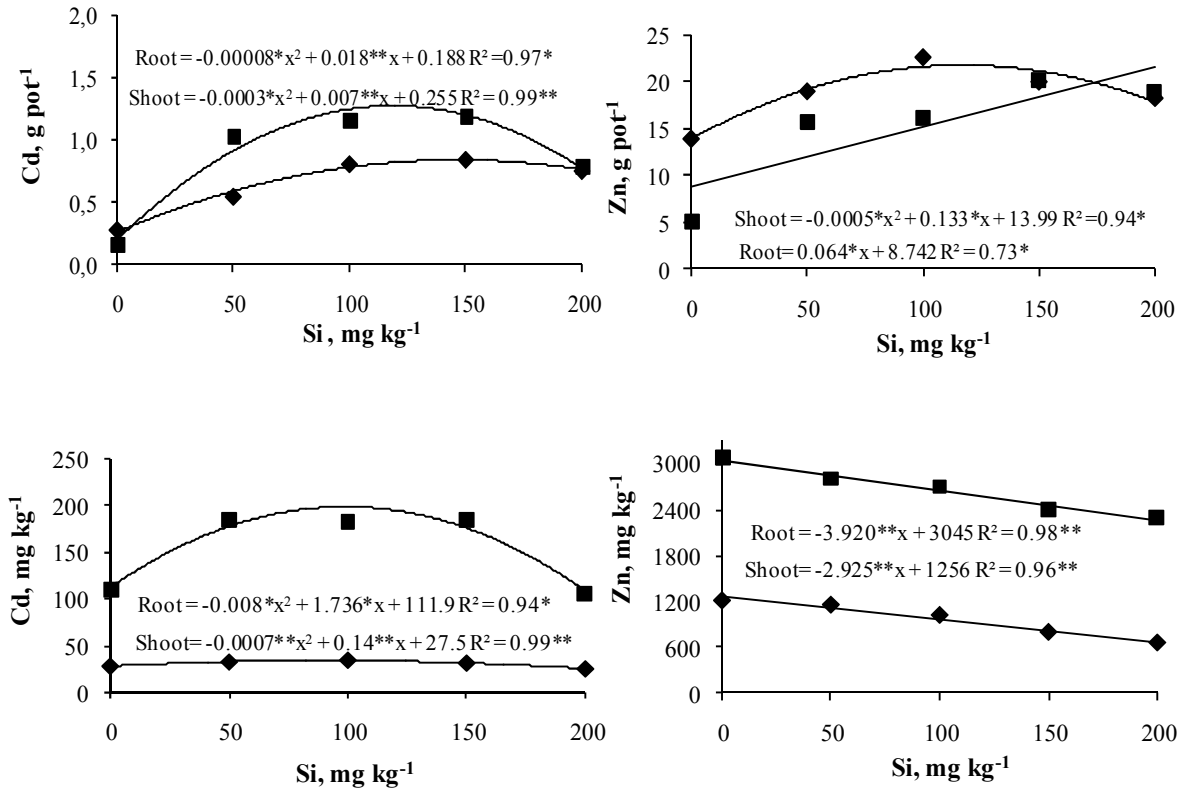
**Table 4.** Linear correlation coefficients between biomass, Cd and Zn concentrations in shoots (CSt) and roots (CRt), metal accumulation in shoots (ASt) and roots (ARt), Si soluble contents, Cd and Zn availability (DTPA) and soil fractions: exchangeable (Ex), organic matter (OM), and crystalline Fe oxide (CFeOx)

	Dry matter		Concentration		Accumulation		DTPA	Si
	Shoot	Roots	Shoot	Roots	Shoot	Roots		
	<b>Cadmium</b>							
<b>Si</b>	0.78**	0.64*	-0.17 <sup>ns</sup>	-0.18 <sup>ns</sup>	0.67**	0.30 <sup>ns</sup>	-0.82**	-
<b>Ex</b>	-0.75**	-0.61*	0.50*	0.27 <sup>ns</sup>	-0.51*	-0.22 <sup>ns</sup>	0.93**	-0.79**
<b>OM</b>	0.67**	0.37 <sup>ns</sup>	-0.42 <sup>ns</sup>	-0.33 <sup>ns</sup>	0.43 <sup>ns</sup>	0.02 <sup>ns</sup>	-0.72**	0.65**
<b>DTPA</b>	-0.88*	-0.76**	0.36 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	-0.71**	-0.47 <sup>ns</sup>	-	-0.82**
<b>CSt</b>	-0.17 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	-	0.73**	0.25 <sup>ns</sup>	0.40 <sup>ns</sup>	0.36 <sup>ns</sup>	-0.17 <sup>ns</sup>
<b>CRt</b>	0.13 <sup>ns</sup>	0.33 <sup>ns</sup>	0.73**	-	0.47 <sup>ns</sup>	0.78**	0.03 <sup>ns</sup>	-0.18 <sup>ns</sup>
<b>ASt</b>	0.90**	0.82**	0.25 <sup>ns</sup>	0.47 <sup>ns</sup>	-	0.80**	-0.71**	0.67**
<b>ARt</b>	0.62**	0.84**	0.40 <sup>ns</sup>	0.78**	0.80**	-	-0.48 <sup>ns</sup>	0.31 <sup>ns</sup>
	<b>Zinc</b>							
<b>Si</b>	0.88**	0.83**	-0.75**	-0.56**	0.39 <sup>ns</sup>	0.67**	-0.90**	-
<b>Ex</b>	-0.81**	-0.76**	0.73**	0.37 <sup>ns</sup>	-0.39 <sup>ns</sup>	-0.72**	0.77**	-0.84**
<b>OM</b>	0.84**	0.73**	-0.74**	-0.51*	0.29 <sup>ns</sup>	0.57*	-0.86**	0.80**
<b>CFeOx</b>	0.72**	0.75**	-0.49 <sup>ns</sup>	-0.46 <sup>ns</sup>	0.56*	0.66**	-0.88**	0.85**
<b>DTPA</b>	-0.89**	-0.85**	0.79**	0.46 <sup>ns</sup>	-0.36 <sup>ns</sup>	-0.74**	-	-0.90**
<b>CSt</b>	-0.86**	-0.73**	-	-	0.02 <sup>ns</sup>	-0.61*	0.79**	-0.75**
<b>CRt</b>	-0.57*	-0.55*	-	-	-0.30 <sup>ns</sup>	-0.05 <sup>ns</sup>	0.46 <sup>ns</sup>	-0.56**
<b>ASt</b>	0.64 <sup>ns</sup>	0.92**	-0.36 <sup>ns</sup>	0.97**	-	-0.82*	0.31 <sup>ns</sup>	0.83*
<b>ARt</b>	-0.67 <sup>ns</sup>	-0.95**	0.41 <sup>ns</sup>	-0.86**	-0.82*	-	-0.63 <sup>ns</sup>	-0.73*

\*, \*\* and <sup>ns</sup>: significant at  $\leq 5$  and  $\leq 0.1\%$ , and no significant, respectively.

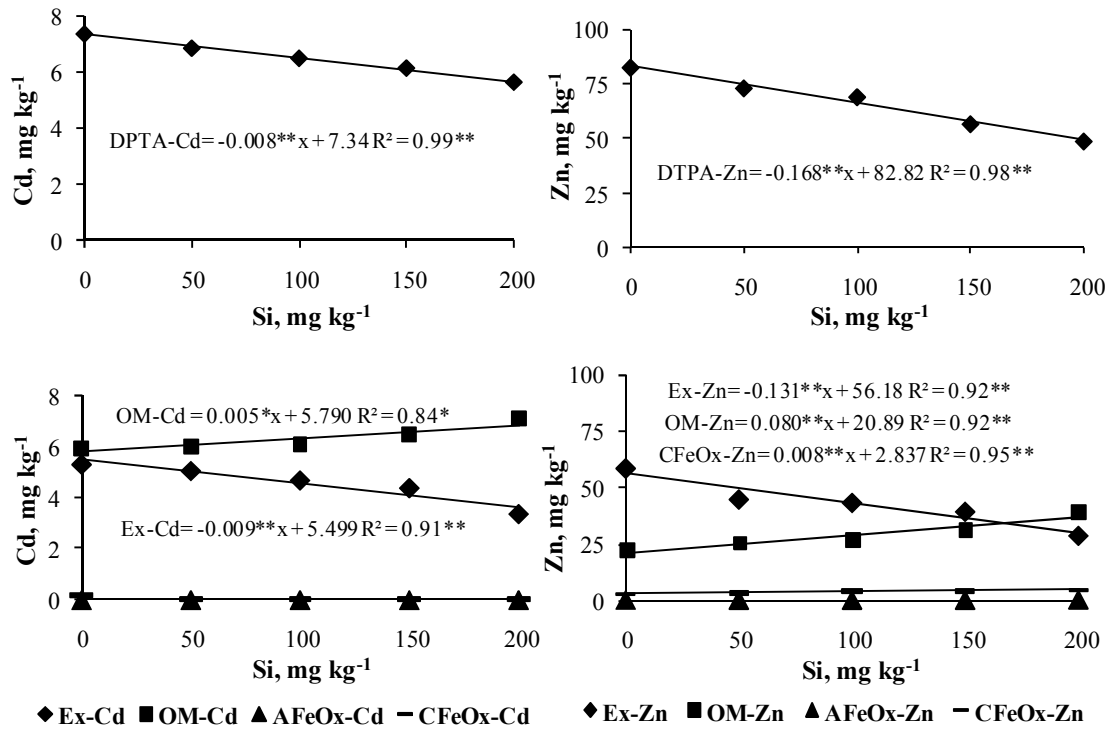


**Figure 7.** Regression equations between silicon doses applied to soil and shoots and root dry matter of maize (*Zea mays* L.) grown on a Cd and Zn-contaminated soil.



**Figure 8.** Regression equations between silicon doses applied to soil and Cd and Zn accumulation and concentration in shoots and roots of maize (*Zea mays* L.) plants grown on a contaminated soil.





**Figure 9.** Regression equations between silicon doses applied to soil and DTPA-extractable Cd and Zn as well as metal fractions in a contaminated soil.

### **CAPÍTULO III:**

#### **SILICON EFFECTS ON METAL TOLERANCE AND STRUCTURAL CHANGES IN MAIZE (*Zea mays L.*) GROWN ON A CADMIUM AND ZINC ENRICHED SOIL**

## SILICON EFFECTS ON METAL TOLERANCE AND STRUCTURAL CHANGES IN MAIZE (*Zea mays L.*) GROWN ON A CADMIUM AND ZINC ENRICHED SOIL<sup>2</sup>

### Abstract

Silicon presents a close relationship with the amelioration of heavy metals phytotoxicity. However, mechanisms of Si-mediated alleviation of metal stress remains poorly understood. This work aimed at studying the relationship between the accumulation of Si, Cd, and Zn and the tolerance and structural alterations displayed by maize plants grown on a Cd and Zn enriched soil treated with doses of Si (0, 50, 100, 150, and 200mg kg<sup>-1</sup>) as calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>). The results showed that the maize plants treated with Si presented not only biomass increasing but also higher metal accumulation. Significant structural alterations on xylem diameter, mesophyll and epidermis thickness, and transversal area occupied by collenchyma and midvein were also observed as a result of Si application. The deposition of silica in the endodermis and pericycle of roots seems to play an important role on the maize tolerance to Cd and Zn stress.

**Keywords:** heavy metals, lignin, silica, cellular detoxification, soil pollution.

### 1. Introduction

Silicon (Si) is the second most abundant element in the terrestrial crust. In soil, Si content ranges from <1 to 45%. Plants absorb Si predominately as silicic acid [Si(OH)<sub>4</sub>], a non dissociated compound present in soil solution at concentrations normally ranging from 0.1 to 0.6 mmol L<sup>-1</sup> (Epstein, 1994). The accumulation of Si in

---

<sup>2</sup> Received: 13 March 2008 Accepted: 20 July 2008 Published online: 13 August 2008 - Water, Air, and Soil Pollution

plants varies considerably from 1 to 10% of dry weight according to the species (Currie and Perry, 2007). This wide range of Si concentration is mainly due to the Si uptake and transport characteristics of each species (Epstein, 1994). The majority of species accumulate Si via passive diffusion, i.e., the element moves from xylem to shoots following the water flux driven by transpiration. However, species belonging to the families Poaceae, Equisetaceae, and Cyperaceae pose high Si accumulation (> 4 % Si dry matter) owing Si active uptake (Currie and Perry, 2007). In this case, Si is absorbed through specific membrane proteins which assure the Si accumulation in the plant regardless the concentration gradient. The Si absorbed by roots is transported to the shoots and deposited either inside or outside the plant cell as hydrated silica ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ). In gramineae species such as maize, rice, and sorghum, silica is deposited as silica bodies, mainly in the epidermis, silica cell and bulliform cells as well as in the stomata and leaf sheath (Currie and Perry, 2007).

There are increasing evidences of the Si role on ameliorating biotic and abiotic stresses (Epstein, 1999; Liang et al., 2007). Despite the mechanisms involved are still poorly understood, it is known that metal toxicity in several species can be ameliorated by Si (Liang et al., 2005; Neumann and Nieten 2001; Rogalla and Römheld, 2002; Shi, et al., 2005). The main mechanisms of Si amelioration of metal stress in plants include: (1) co-precipitation or complexation of metals with Si; (2) inhibition of metal transport from roots to shoots; (3) compartmentation of metal ions within plants; and (4) stimulation of antioxidants systems in plants (Neumann and Nieten, 2001; Gong et al., 2005; Shi et al., 2005).

The relationship between Si and tolerance to heavy metal in plants has been largely studied. For instance, Neumann and Nieten (2001) regarded the accumulation of Zn silicate in the vacuole and cell wall of *Cardaminopsis halleri* leaves as a tolerance mechanism to cope with metal toxicity. Rogalla and Römheld (2002) reported that cucumber (*Cucumis sativus*) plants treated with Si presented decreased Mn concentration in the symplast and increased Mn retention in the cell wall. However, it is worth pointing out that Si amelioration of heavy metals phytotoxicity is not only due to Si action inside the plant but also relies on the decreased bioavailability of metals in Si-treated soils. Liang et al., (2005) observed that maize dry matter production and Cd accumulation were increased by addition of  $400 \text{ mg kg}^{-1}$  of Si into the soil.

The present work aimed at studying the relationship between accumulation of Si, Cd, and Zn and the tolerance and structural alterations observed in maize plants grown on a cadmium- and zinc-enriched soil.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Pot experiment

The study was carried out in a greenhouse using samples of an Ultisol (Typic Kandiuult soil) presenting the following chemical characteristics: pH H<sub>2</sub>O=4.9; H<sup>+</sup>+Al<sup>3+</sup>=2.40 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Al<sup>3+</sup>=0.92 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Na<sup>+</sup>=0.17 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K<sup>+</sup>=0.08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Ca<sup>+2</sup>= 0.97 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; Mg<sup>+2</sup>=0.08 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; P=9 mg dm<sup>-3</sup>; C=3.45 g kg<sup>-1</sup>; clay=340 g kg<sup>-1</sup>; silt=32 g kg<sup>-1</sup>; and sand=628 g kg<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 1999).

Chloride solutions of Cd or Zn were uniformly applied to a 2-kg soil sample in order to achieve the concentrations of 10 mg kg<sup>-1</sup> of Cd and 100 mg kg<sup>-1</sup> of Zn. The Cd- or Zn-amended samples were kept incubated for a 30-day period at 80% of the water holding capacity. Then, the soil was air dried and doses of Si (0, 50, 100, 150, 200 mg kg<sup>-1</sup>) as calcium silicate (CaSiO<sub>3</sub>) were applied to the contaminated soil. The soil and the silicate were homogenized and incubated for an additional 30-day period at 80% of the water holding capacity.

Before sowing, the samples were fertilized with 250, 240, 150, and 100 mg kg<sup>-1</sup> of N, P, K, and S, respectively, as NH<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and KNO<sub>3</sub>. The micronutrients Fe (FeSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O), Mn (MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O), Zn (ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), Cu (CuSO<sub>4</sub>), B (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), and Mo (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) were applied at the 2; 4; 4; 1.5; 1; and 0.2 mg kg<sup>-1</sup> concentrations, respectively. In the contaminated soil with Zn, all the micronutrients were added, except Zn. Maize seeds (*Zea mays* L.) were sown directly in the pots and thinned to 2 plants per pot 5 days after germination. Plants were watered to 80% of the soil water holding capacity on a daily basis by weighing the pots and adding water to compensate for any weight loss. After a 30-day period of cultivation, the roots and shoots were collected and dried in an oven at 65<sup>0</sup>C. After drying, the plant samples were grounded and digested in a mixture of HNO<sub>3</sub>:HClO<sub>4</sub> (EMBRAPA, 1999). The concentrations of Cd and Zn in the extracts were determined by atomic absorption spectrometry.

## **2.2.Optical microscopy**

Samples of mature leaves were collected and immediately fixed in a FAA 50 solution (50 mL of formaldehyde 40% + 50 mL of acetic acid + 900 mL of alcohol 50%) for at least 24-48 h until preparation of semi permanent histological layers, according to Johansen (1940).

Leaf sections of the vein and mesophyll were clarified in a sodium hypochlorite 30% solution neutralized with acetic water 1:500. The sections were then washed with distilled water, stained with astra blue and safranin (Bukatsch, 1972), and mounted on glycerin 50% (Strasburger, 1924).

Sections of roots and leaves were also used to histochemical analysis for lignin with acid fluoroglucine (Kraus and Arduim, 1997) and silica through silver-amine chromate (Dayanandan, et al., 1983). For histochemical detection of Cd and Zn in leaves was used the technique developed by Seregin and Ivanov (1997), based on the ability of dithizone (30 mg dipheniltiocarbazone dissolved in 60 mL of acetone and 20 mL of distilled water) in producing a reddish color compound after reacting with cadmium and zinc.

Digital images were obtained by using a digital camera linked to an optical microscopy. The images were analyzed for lumen diameter of the xylem cells, mesophyll and epidermis thickness, transversal area of the foliar midvein, phloem and collenchyma using the software Image Tool (Wilcox et al., 2002).

## **2.3.Statistical analysis**

The experiment followed a randomized block factorial design 2 x 5 (Cd or Zn addition x 5 doses of Si), with 3 replications, totaling 30 experimental units. The results were analyzed by applying F test to ANOVA, and correlation and regression analyzes performed by Statistical Analyses System software (SAS, 1999).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Structural changes in maize leaves and roots

Adding Si to the contaminated soil with Cd or Zn promoted a linear and significant increasing in the roots and shoots dry matter yield of maize plants (Figure 10), suggesting that the Cd and Zn phytotoxicity was decreased owing Si addition to soil. On the other hand, the interaction between doses of Si and metals was not significant ( $P \leq 0.05$ ). This indicates that the Si effect of increasing the maize dry matter yield under metal stress was similar for both metals. Zn and Cd share several physical and chemical similarities: both are in the Group II of the Periodic Table; they are generally found associated to the same minerals; and they compete for the same chemical ligands. Thus, the interaction between Zn and Cd in biological systems is expected to be alike as well (Rout and Das, 2003).

The xylem diameter was linearly increased by Si addition in the Cd or Zn contaminated soil (Table 5). A decrease in the size and number xylem vessels is a common symptom of heavy metal toxicity that strongly diminishes the uptake and transport of water by plants (Barceló and Poschenrieder, 1990; Gong et al., 2005). The increase observed for the xylem diameter paralleled the highest roots and shoots biomass of maize grown in the soil samples contaminated with Cd or Zn (Table 6). This result suggests that Si effects on the plants hydraulic balance could play a role in increasing biomass under metal stress.

The transversal area occupied by the midvein and the mesophyll thickness of maize leaves were also increased by the addition of Si to the contaminated soil (Table 5). Similarly, Gong et al., (2005) observed thicker leaves in wheat (*Triticum aestivum*) plants treated with Si. According to Epstein (1999), Si increases hydraulic status in the cells by diminishing the transpiration rate. Increased xylem diameter and mesophyll thickness can be regarded Si-mediated structural alterations that alleviated Cd and Zn phytotoxicity, since they were related to higher maize biomass in the soil contaminated amended with Si (Table 6).

The Si addition to soil caused a linear increasing for the adaxial epidermis thickness and a linear decreasing for the abaxial epidermis thickness (Table 5). Hossain et al. (2002) observed increased thickness and size of rice (*Oryza sativa*) epidermis cells treated with Si. According to Gong et al. (2005), such structural alterations result from Si precipitation on the surface of the epidermis cell wall.

The transversal area occupied by the abaxial collenchyma presented a linear decreasing trend as a result of Si addition to soil (Table 5) as well as a lower lignin deposition at the cell wall (Figure 11a vs b). Schützendübel et al., (2001) sustain that the lignin metabolism is activated in order to alleviate the cellular oxidative unbalance caused by free metals in the cytoplasm. The cell wall of support tissues, such as the collenchyma, play an important role in accumulating and detoxifying metals before they reach more sensitive sites to metals, especially the mesophyll (Vollenweider et al., 2006). This is corroborated by the simultaneous presence of lignin and metals in the collenchyma (Figure 11a and e). Thus, the decreasing in the lignification resulting from Si addition to the contaminated soil (Figure 11b) is probably due to low levels of free metals in the cytoplasm. This outcome is accomplished by co-precipitation of Si-metal in the cell wall and vacuoles and hence alleviation of the metals oxidative stress (Schützendübel et al., 2001).

It is worth observing the significant and negative correlation between both the area decreasing and lignification of the collenchyma with the biomass increasing of roots ( $r = -0.55^{**}$ ) and shoots ( $r = -0.73^{**}$ ). As a matter of fact, the synthesis of lignin is a biosynthesis process that demands high cell energy costs (Boudet, 2000) while the incorporation of SiO<sub>2</sub> in the cell wall requires lower energy demand (Raven et al., 1983). Therefore, plants gain an energetic profit by using SiO<sub>2</sub> as a structural component of the cell wall. For instance, Hossain et al., (2002) state that the growth promotion in *Poaceae* leaves induced by Si is a consequence of qualitative alterations in the cell wall metabolism.

For roots, thickening of Casparian strips in the endodermis as well as in the cell wall of xylem and pericycle were observed as a function of Si doses (Figure 12). Seregin and Ivanov (2001) suggested that the endodermis and pericycle cell wall of roots grown in a contaminated soil present a structure and composition that drawback the apoplastic transport of metal ions in the central cylinder. Lignin deposits were identified in the endodermis cell walls, but not in the thicker cell wall of the pericycle.



Such deposits were also observed at the root epidermis and exodermis. Vitória et al. (2004) reported that  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  of Cd provoked disintegration of epidermis and cortical parenchyma of radish (*Raphanus sativus*) roots; the plants displayed large intracellular spaces as well. According to authors, this was a consequence of the low cellular hydraulic potential owing to Cd toxicity. Such alterations were not observed for the maize plants in the present study (Figure 12d). It seemingly indicates that the lignin deposits and silica bodies detected in the cell wall are solely related to structural function.

### 3.2. Localization of silica and metals in plant tissue

Cadmium and zinc accumulated in the roots of maize grown in the contaminated soil were preferentially located in the endodermis cell wall, pericycle, xylem, and phloem, followed by epidermis, exodermis, and cortical parenchyma (Figure 12a–c). Cadmium deposits were also detected in the exodermis of common reed (*Phragmites australis*) roots grown in nutrient solution containing  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (Ederli et al., 2004). Coincidentally, silica bodies in root cells were found in the cell walls of epidermis, exodermis, endodermis, pericycle, and xylem (Figure 12d and e). This suggests that Cd and Zn may be co-precipitated with Si in such tissues. Silica deposits in the endodermis cell wall along with the thickening of the Casparian strips demonstrate the Si role in reducing the metals apoplastic transport (Seregin and Ivanov, 2001). Such a role can be corroborated by Si-metal deposits observed in the endodermis and pericycle cells (Figure 12e and f) of plants grown on soil amended with  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  of silicon. Cadmium and Zn were also found in the nucleus of cortex cells and endodermis (Figure 12a).

For the non-Si treated plants, Cd and Zn were mainly detected in mesophyll symplasm and phloem followed by xylem apoplasm and endodermis (Figure 11e). On the other hand, metals in the Si-treated plants were mostly detected in the collenchyma cell wall and abaxial and adaxial epidermis (Figure 11c–d and f–h). The simultaneous presence of silica, Cd, and Zn deposits in the mesophyll cells suggests the precipitation of Si-metal complex in the cytoplasm and vacuoles (Figure 11d and g). Similarly, Iwasaki et al. (2002) found increased content of Mn in vacuoles of beans (*Phaseolus vulgaris*) cells after Si application. The co-precipitation of Si-metals complex seems to

contribute to the cell detoxification, since the plants biomass was linearly increased as a result of Si addition to soil (Figure 10). This result indicates once again that Si played an important physiological role in cellular tolerance to both metals.

Silica deposits were observed in the leaves epidermis wall cell, notably in the bulliform cells of the adaxial surface (Figure 11d). The accumulation of Si in these tissues is generally related to tolerance to biotic and abiotic stresses (Currie and Perry, 2007; Liang et al., 2007). Silica deposition in bulliform cells was clearly correlated with Cd and Zn accumulation, indicating co-precipitation reactions (Figure 11d and g). Neumann and Nieten (2001) reported that leaves surface of foam-cress (*Cardaminopsis halleri*) grown on a Zn-contaminated soil amended with Si were covered by Si–Zn complexes. The deleterious effect of metal in phloem (Vollenweider et al., 2006) was possibly ameliorated by Si (Figure 11c). Indeed, no significant alterations occurred in the phloem area of Si-treated leaves (Table 5).

#### **4. Conclusions**

The mechanism responsible for increased metal tolerance in Si-treated plants is still a matter of discussion and contradictory results have been reported. However, the maize plants treated with Si presented not only biomass increasing but also higher metal accumulation. This clearly indicates that a silicon-mediated mechanism plays a role in alleviating the metal stress. Significant structural alterations on xylem diameter, mesophyll and epidermis thickness, and transversal area occupied by collenchyma and midvein were also observed as a result of Si application. The precipitation of silica in the endodermis and pericycle of roots seems to play an important role on the maize tolerance to Cd and Zn stress. Such results indicate that Si could be used in phytotechnologies aiming at increasing the tolerance and accumulation of metals in plants, such as phytoextraction.

## 5. References

BARCELÓ J, POSCHENRIEDER C (1990) Plant water relations as effected by heavy metal stress: a review. *J Plant Nutr* 13:1-37.

BOUDET A M (2000) Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiol Biochem* 38: (1/2) 81-96.

BUKATSCH F (1972) Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-Safranin. *Mikrokosmos* 6: 255.

CURRIE H A, PERRY C (2007) Silica in Plants: Biological, Biochemical and Chemical Studies. *Ann Bot-London* 1-7.

DAYANANDAN P, KAUFMAN P B, FRANKLIN C I (1983) Detection of sílica in plants. *Am J Bot* 70 (7): 1079-1084.

EDERLI L, REALE L, FERRANTI F et al (2004) Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol Plantarum* 121:66-74.

EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Solos (1999) Manual de análise química dos solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Solos, Rio de Janeiro.

EPSTEIN E (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *P Natl Acad Sci-Biol* 91 (1): 11-17.

EPSTEIN E (1999) Silicon. *Annu Rev Plant Phys* 50: 641-664.

GONG H J, ZHU X Y, CHEN K M et al (2005) Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci* 169: 313-321.

HOSSAIN M T, MORI R, WAKABAYASHI K S K et al (2002) Growth promotion and an increase in cell wall extensibility by silicon in rice and some other Poaceae seedlings. *J Plant Res* 115:23-27.

IWASAKI K, MAIER P, FECHT M et al (2002) Effects of silicon supply on apoplastic manganese concentrations in leaves and their relation to manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)Walp.). *Plant Soil* 238: 281-288.

JOHANSEN D A (1940) *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York.

KRAUS J E, ARDUIN M (1997) *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR, Rio de Janeiro.

LIANG Y, SUN W, ZHU Y-G et al (2007) Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environ Pollut* 147: 422-428.

LIANG Y, WONG J W C, WEI L (2005) Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. *Chemosphere* 58: 475-483.

NEUMANN D, NIEDEN U Z (2001) Silicon and heavy metal tolerance of higher plant. *Phytochemistry* 56: 685-692.

RAVEN P H, EVERT R F, EICHHORN S E (1983) *Biologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

ROGALLA H, ROMHELD V (2002) Role of leaf apoplast in silicon-mediated manganese tolerance of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Environ* 25:549-555.

ROUT G R, DAS P (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23: 3-11.

SAS INSTITUTE (1999) *Statistical analysis system: procedure guide for personal computer*. Cary.

SCHÜTZENDÜBEL A, SCHWANZ P, TEICHMANN T et al (2001) Cadmium-induced changes in antioxidative systems, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Plant Physiol* 127: 887–892.

SEREGIN I V, IVANOV V B (1997) Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants. *Russ J Plant Physiol* 44: 791–796.

SHI X H, ZHANG C C, WANG H et al (2005) Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. *Plant Soil* 272: 53-60.

STRASBURGER E (1924) *Handbook of Practical Botany*. MacMillan, New York.

VITÓRIA A P, RODRIGUEZ A P M, CUNHA M (2004) Structural changes in radish seedlings (*Raphanus sativus*) exposed to cadmium. *Biol. Plant* 47, 561–568.

VOLLENWEIDER P, COSIO C, GUNTARDT-GOERG M S (2005) Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) Part II Microlocalization and cellular effects of cadmium. *Environ Exp Bot* 1-16.

WILCOX D B, DOVE D, MCDAVID, D (2002) *Greer Image Tool*. University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas.

**Table 5.** Regression equations for relationship between silica doses added to the contaminated soil with Cd or Zn and alterations in xylem diameter, thickness of mesophyll and epidermis and transversal area occupied by collenchyma, midvein and

Anatomic characteristics	Dry matter		Content	
	Shoot	Roots	Shoot	Roots
Xylem diameter	0.54**	0.61**	0.44**	0.60**
Collenchyma area	-0.73**	-0.55**	-0.66**	-0.62**
Phloem area	-0.13 <sup>ns</sup>	-0.21 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	-0.19 <sup>ns</sup>
Vein area	0.02 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	0.27 <sup>ns</sup>	0.05 <sup>ns</sup>
Mesophyll thickness	0.58**	0.55**	0.37*	0.65**
Abaxial epidermis thickness	-0.56**	-0.38*	-0.22 <sup>ns</sup>	-0.57**
Adaxial epidermis thickness	0.66**	0.54**	0.47**	0.59**

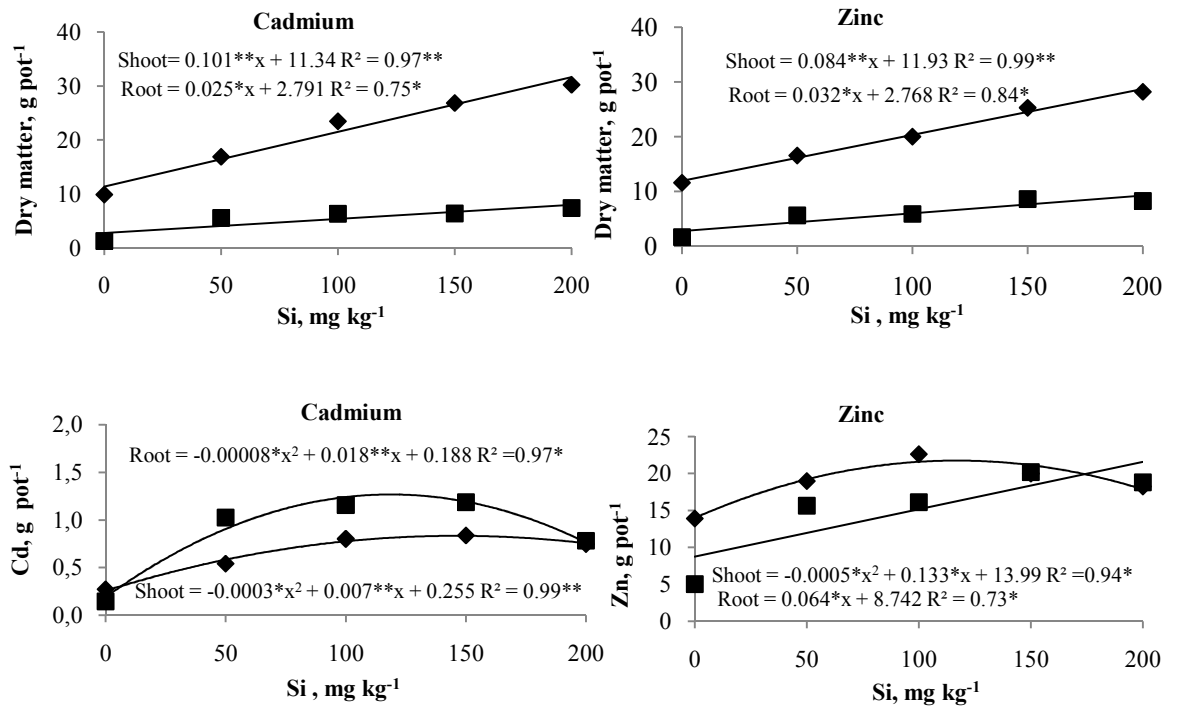
phloem in leaves maize plants

\*, \*\* and <sup>ns</sup>:  $\leq 5$  e  $\leq 1\%$  significant and no significant, respectively.

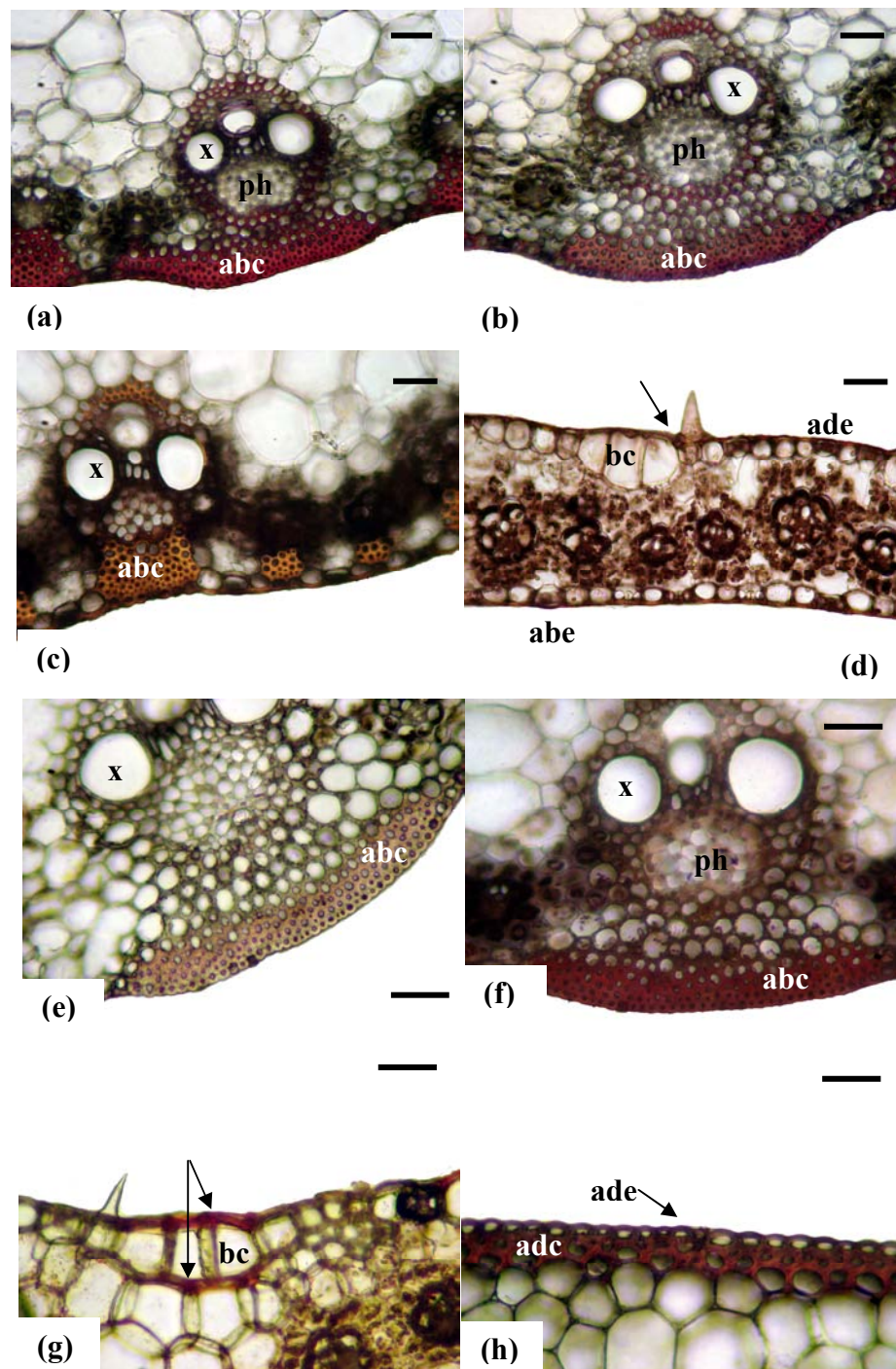
**Table 6.** Coefficients of liner correlation between anatomic characters, dry matter yield, and accumulation of metals in maize plants growth in contaminated soil with Cd or Zn treated with silica doses

Anatomic characteristics	Equação	R <sup>2</sup>
Xylem diameter ( $\mu\text{m}$ )	$y = 89.73^{**} + 0.077^{**}x$	0.94**
Mesophyll thickness ( $\mu\text{m}$ )	$y = 318.80^{**} + 0.609^{**}x$	0.98**
Abaxial epidermis thickness ( $\mu\text{m}$ )	$y = 46.96^{**} - 0.069^{**}x$	0.94**
Adaxial epidermis thickness ( $\mu\text{m}$ )	$y = 60.61^{**} + 0.050^{**}x$	0.95**
Collenchyma area ( $\mu\text{m}^2$ )	$y = 70511^{**} - 92.43^{**}x$	0.98**
Phloem area ( $\mu\text{m}^2$ )	—	—
Vein area ( $\mu\text{m}^2$ )	$y = 87051^{**} + 14.39^{*}x$	0.76*

\*, \*\* and <sup>ns</sup>:  $\leq 5$  e  $\leq 1\%$  significant and no significant, respectively. n=60

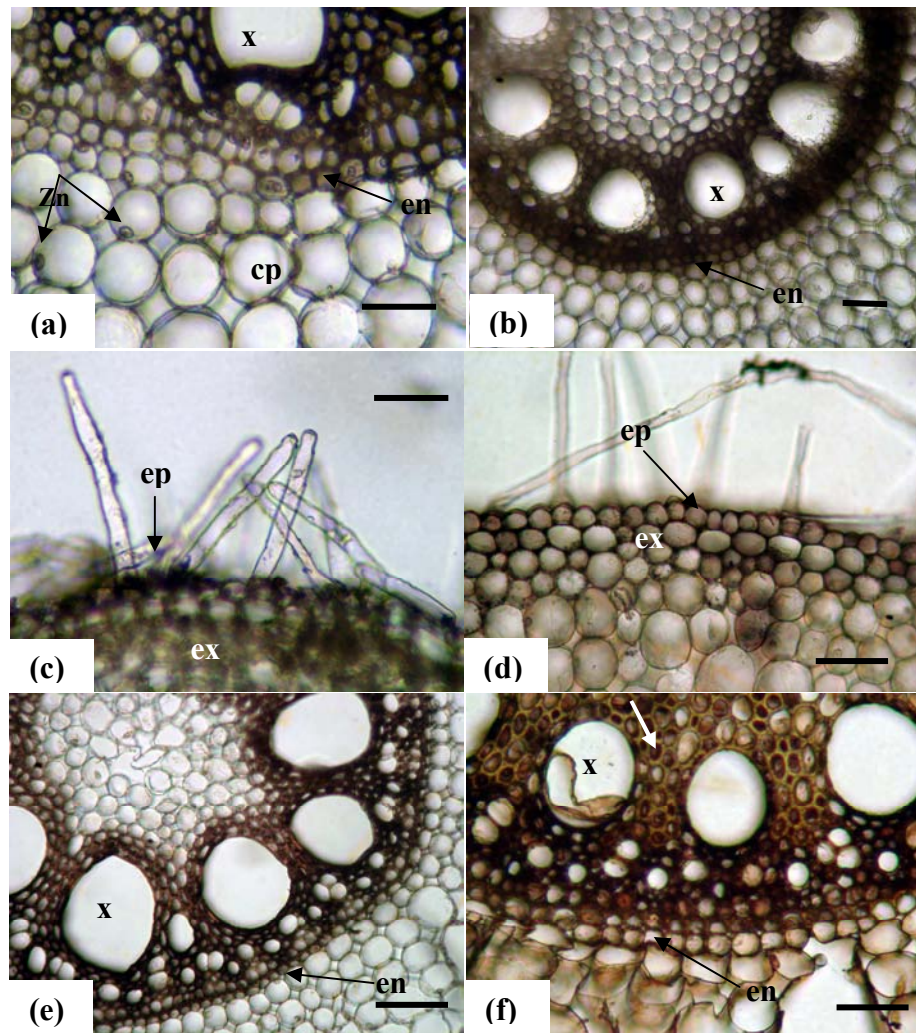


**Figure 10.** Relationship between silica doses, dry matter yield, and Cd and Zn content in maize shoots (♦) and roots (■) grown in contaminated soil with Cd and Zn. n= 3 replications.



**Figure 11.** Structural alterations and silica, Cd, and Zn localization in maize leaves grown in a contaminated soil treated with Si. Lignification of cell wall of abaxial collenchyma without (a) and with (b) application of  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  of Si to the soil. Silica apoplastic deposits in collenchyma (c), epidermis (d) and detailed in bulliform cell (arrow, d). Silica in the symplasm mesophyll (d). Localization of Cd and Zn in collenchyma without (e) and with (f) Si application. Deposits of Cd and Zn in bulliform cells apoplasm of the adaxial surface (g) and in apoplasm of collenchyma and abaxial epidermis after Si addition (h). *ade* Adaxial epidermis, *abe* abaxial epidermis, *x* xylem, *ph* phloem, *bc* bulliform cell, *abc* abaxial collenchyma. Bars:  $50 \mu\text{m}$





**Figure 12.** Silica, Cd and Zn localization in maize roots after applying Si in a soil enriched with Cd or Zn. Metals in cell wall of endodermis, xylem and symplasm of cortical parenchyma and endodermis of roots treated with  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  of Si (a). After applying  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  of Si, metal located in the endodermis symplasm (b). Cd and Zn in cell walls of epidermis (c). Silica deposits in epidermis and exodermis (d). Silica deposits in cell wall of endodermis and xylem (e). Silica into endodermis cells (f). *cp* Cortical parenchyma, *ep* epidermis, *ex* exodermis, *x* xylem, *f* phloem. Bars:  $50 \mu\text{m}$ .