

Anidrase carbônica em plantas de milho submetidas a diferentes doses de zinco



<https://doi.org/10.56238/sevened2023.006-114>

Wanderley José de Melo

Doutor em Solos e Nutrição de plantas, Universidade de São Paulo, campus Piracicaba-SP.

Instituição: Universidade Brasil, campus Descalvado e Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP.

Gabriel Maurício Melo Wig

Doutor em Zootecnia FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP.

Instituição: Universidade Brasil, campus Descalvado-SP.

Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Doutor em Zootecnia, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP.

Instituição: Universidade Brasil, campus Descalvado-SP.

Luiz Arthur Malta Pereira

Doutor em Engenharia, Universidade de São Paulo, USP, campus Pirassununga-SP.

Instituição: Universidade Brasil, campus Descalvado-SP.

Eleandro Ricardo dos Santos

Mestrando em Produção Animal, Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP.

Instituição: Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia, RO.

RESUMO

A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima importantíssima no metabolismo de plantas, animais e microrganismos, participando na fotossíntese, no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e que possui o zinco na estrutura de seu sítio ativo. O zinco é um micronutriente, mas também um metal pesado, que pode causar

benefícios ou toxicidade para as plantas, dependendo da quantidade com que é absorvido. Este trabalho de pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade da anidrase carbônica em plantas de milho (*Zea mays* L.) cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de zinco. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em areia lavada contida em lisímetros com capacidade para 1.300 g de areia, que recebeu solução nutritiva sem Zn e adição individualizada de doses crescente de Zn como ZnSO₄.7H₂O. O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 tratamentos (0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg Zn kg⁻¹ de substrato), com 6 repetições. A atividade da anidrase carbônica aumentou significativamente com a dose de zinco, sendo a maior atividade na concentração de 10 mg kg⁻¹ de substrato. A concentração de zinco na planta aumentou significativamente na raiz e parte aérea, atingindo o valor total máximo (raiz + parte aérea) na dose mais elevada de zinco aplicada ao substrato. A menor produção de massa seca pela planta de milho ocorreu na dose mais elevada de zinco (80 mg Zn kg⁻¹ de substrato) como resposta a uma possível fitotoxicidade e não houve diferença significativa entre os demais tratamentos, indicando que o Zn presente na semente foi suficiente para a fase inicial de desenvolvimento do milho. A atividade da anidrase carbônica não se correlacionou de forma significativa com o Zn acumulado na planta e com a produção de massa seca.

Palavras-chave: Elementos-traço, Fitotoxicidade, Metaloenzimas, Metais pesados, Nutrição de plantas.

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são importantes biomoléculas que participam na regulação do metabolismo dos seres vivos, e entre elas encontra-se a anidrase carbônica (EC 4.2.1.1), enzima que contém zinco no sítio ativo e que participa no metabolismo de carboidratos (caso da fotossíntese), de proteínas e lipídeos (KUDENKO et al., 2020). Em condições de baixa atividade, ocorre diminuição no desenvolvimento da planta e até mesmo na sua morte.



O zinco é um dos micronutrientes que mais parecem limitar a produtividade de milho no Brasil. Vários trabalhos têm mostrado resposta da adição de zinco na produtividade (GOEDERT, 1987). Nos solos sob vegetação de cerrado, normalmente ocorre baixo teor deste elemento, geralmente inferior a 1 mg kg^{-1} de solo, considerado nível crítico para o bom desenvolvimento das plantas (LOPES, 1984).

Também pode ocorrer deficiência de Zn quando se empregam doses elevadas de calcário (BARBOSA FILHO et al., 1990). A atividade da anidrase carbônica também pode ser alterada em outras condições desfavoráveis que venham a causar estresse na planta.

Em solos com deficiência ou com excesso de zinco pode ocorrer alteração da atividade da anidrase carbônica, com prejuízo para o desenvolvimento e a produção da planta.

O diagnóstico precoce da deficiência de zinco, principalmente para culturas anuais, pode auxiliar na correção da deficiência em tempo hábil, diminuindo as perdas na produtividade.

O Zn é um ativador da anidrase carbônica, enzima que catalisa a reação de hidratação do CO_2 , produzindo H^+ e HCO_3^- , atuando no equilíbrio eletrolítico da célula e permitindo a conversão do aminoácido triptofano em auxina, importante hormônio vegetal (QUEIROZ, 1993).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de doses de zinco, em condições de solução nutritiva, em casa de vegetação, na atividade da anidrase carbônica e no desenvolvimento inicial de plantas de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação em delineamento experimental inteiramente casualizado com 6 tratamentos (0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg Zn kg^{-1} areia) e 5 repetições.

As plantas de milho (híbrido Braskalb XL 67) foram semeadas em substrato constituído por areia lavada contida em lisímetros com capacidade para 1.300 g, que receberam solução nutritiva completa, menos Zn (capacidade do lisímetro de 250 mL de solução nutritiva) com diferentes concentrações de Zn.

A solução nutritiva utilizada continha 0,43 g de KNO_3 , 0,12 g de K_2HPO_4 , 0,20 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,96 g de H_3BO_3 , 1,97 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3,08 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,09 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 24,9 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 33,2 g de EDTA-Na em cada litro da solução nutritiva.

No dia da semeadura, adicionaram-se em cada lisímetro 250 mL da solução nutritiva e as doses de zinco na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de modo a atingir a concentração de Zn de cada tratamento, procedendo-se, em seguida, a semeadura de 4 sementes de milho por lisímetro.

Diariamente, até o décimo quarto dia após a semeadura, realizou-se irrigação com água destilada de modo a repor a água perdida por evapotranspiração. Após este período, foram adicionados



20 mL da solução nutritiva diariamente em cada lisímetro por um período de 7 dias. A água perdida por evapotranspiração foi repostada diariamente com água destilada até o final do experimento.

Aos 30 dias após a semeadura, os lisímetros foram desmontados e as plantas foram separadas da areia e divididas em parte aérea e raízes. Uma das plantas de cada lisímetro foi enviada imediatamente ao laboratório para determinação da atividade da anidrase carbônica, sendo as demais lavadas com água corrente, água destilada e água deionizada, secas em estufa com circulação forçada de ar mantida em temperatura de 50 ± 5 °C por 72 horas e, moídas em moinho tipo Willey com facas e peneiras em aço inox (malha de 40 mesh).

As amostras foram abertas com solução digestora composta por ácidos nítrico e perclórico na proporção de 3/1 para a realização da determinação do teor de Zn por espectrofotômetro de absorção atômica em chama ar-acetileno.

A determinação da atividade da anidrase foi realizada segundo metodologia proposta por Davis (1963) com modificação na determinação da leitura do CO₂ no meio de reação de hidratação.

As amostras da parte aérea (folhas) foram cortadas em pedaços de 1 cm de diâmetro para facilitar a maceração, enquanto as amostras de raízes foram cortadas em pedaços com 1 cm de comprimento.

Em tubo de ensaio calibrado para volume de 2 mL, parte inferior do tubo, foram colocados 3 mL de tampão veronal – NaOH 0,02 mol L⁻¹, pH 8 (ácido dietil barbitúrico), 2,3 mL de solução de peptona 0,018%, 0,12 mL de azul de bromotimol em etanol 0,2 %. A essa solução, foram adicionados 2 mL de extrato vegetal obtido por maceração da 2 g de amostra fresca em volume de 10 mL de água deionizada, que foi mantida a 0 °C até o momento de uso.

Após a adição do extrato vegetal ao tubo de ensaio, seguiu-se adição imediata de 1 mL de água carbonatada (saturada em CO₂), quando ocorreu o início da mudança da cor azul para amarela, que foi subindo do fundo do tubo de ensaio. Quando a cor atingiu a marca de 2 mL no tubo de ensaio, foi anotado o tempo gasto em segundos, tempo este que foi utilizado para expressar a atividade da anidrase carbônica.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância, e quando o valor de F foi significativo a 5 % de probabilidade, utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias de tratamentos. Também foram realizadas análises de correlação linear de Pearson.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comprovação de que o Zn é essencial para plantas superiores foi feita por Maize em 1919 em experimento em solução nutritiva e sua deficiência em plantas de milho foi observada pela primeira vez por Barnette e colaboradores em 1936 (THORNE, 1957).



O Zn participa na formação de biomoléculas como alguns carboidratos e proteínas, clorofila e hormônios como as auxinas, importantes reguladores do crescimento das plantas, como a alongação do caule. Na sua deficiência, a planta pode interromper o crescimento. O zinco é um elemento-traço metálico (Zn^{2+}), que faz parte de constituição da anidrase carbônica, enzima que catalisa a hidratação do gás carbônico com produção de próton H^+ e bicarbonato (HCO_3^-).

O Zn acumulado aumentou significativamente nas plantas de milho com a dose do nutriente aplicada no substrato utilizado para cultivo (Tabela 1, Figura 1), constituído por areia lavada que recebeu doses de 0 a 80 mg Zn kg^{-1} . Teores bem mais elevados que o nível considerado crítico para solos brasileiros (avaliados pelos extratores Mehlich 1, DTPA a pH 7,3 e HCl 0,1 mol L^{-1}), que é de 1 mg Zn kg^{-1} solo (RIBEIRO e SANTOS, 1996).

Tabela 1. Zinco na raiz, na parte aérea e total (mg planta⁻¹) em plantas de milho cultivadas em substrato de areia lavada irrigada com solução nutritiva e recebendo dose crescente de zinco.

Tratamento	Raiz	Parte aérea	Total
D0	0.26 ± 0.13 B	0.28 ± 0.12 C	0.54 ± 0.24 B
D5	0.61 ± 0.57 B	0.35 ± 0.05 AB	0.96 ± 0.58 B
D10	0.92 ± 0.84 B	0.50 ± 0.13 AB	1.42 ± 0.98 B
D20	1.33 ± 1.20 B	0.62 ± 0.22 AB	1.96 ± 1.25 B
D40	3.53 ± 3.04 AB	1.45 ± 0.33 B	4.98 ± 2.85 B
D80	5.57 ± 5.46 A	3.09 ± 0.59 A	8.66 ± 5.25 A

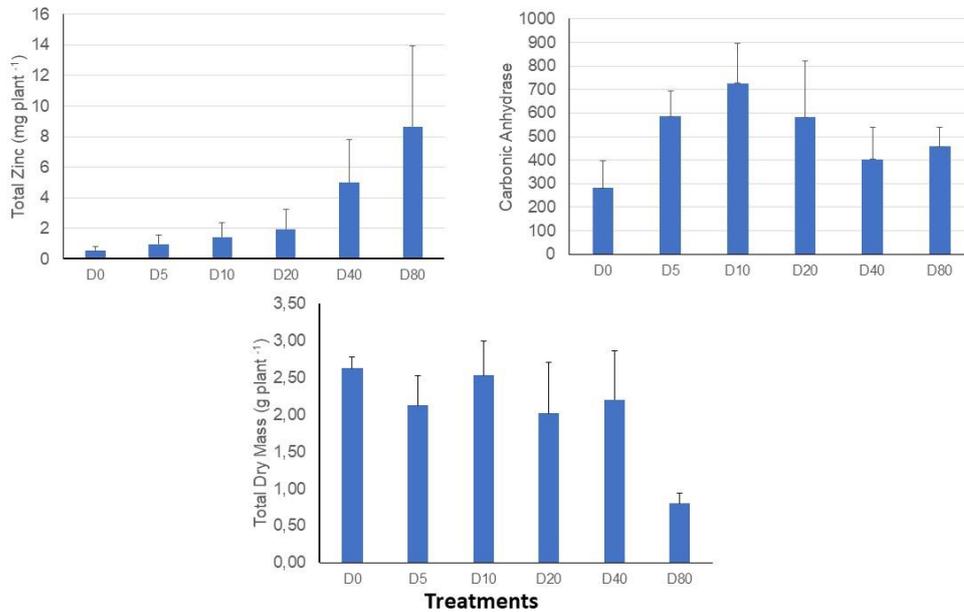
D0= controle (sem adição de zinco), D5, D10, D20, D40 e D80= tratamentos que receberam doses de 5, 10, 20, 40 e 80 mg Zn kg^{-1} substrato. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias estão seguidas do desvio padrão.

O teor de Zn na semente varia com a espécie, a variedade e as condições edafoclimáticas de onde a planta foi cultivada. Em plantas de milho, avaliações em 49 linhagens revelaram concentrações variando de 15,5 a 70 mg kg^{-1} de massa seca (MASSEY e LOEFFEL, 1966, HINESLY et al., 1978).

Essa concentração elevada de Zn na semente é uma das possíveis explicações para o fato da produção de massa seca total até a dose 40 mg Zn kg^{-1} substrato, nesta fase de desenvolvimento, não diferir significativamente do tratamento controle, que não recebeu Zn, e dos tratamentos que receberam até 40 mg Zn kg^{-1} de substrato (Figura 1, Tabela 2).



Figura 1. Conteúdo em zinco (mg planta^{-1}), atividade da anidrase carbônica (segundos 2 mL^{-1} solução) e produção de massa seca total (g planta^{-1}) em plantas de milho cultivadas em solução nutritiva contendo doses crescentes de Zn. D0, D5, D10, D20, D40 e D80 representem doses de 0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg kg^{-1} Zn no substrato. Linhas sobre as barras indicam o desvio padrão da média.



A produção de massa seca total, de raízes e de parte aérea pelas plantas de milho foi significativamente afetada pelos tratamentos. Em todos os casos, a produção foi menor no tratamento que recebeu a dose 80 mg Zn kg^{-1} substrato (Tabela 2 e Figura 1).

Portanto, a dose mais elevada de Zn aplicada no substrato teve efeito negativo no desenvolvimento da planta. Este efeito negativo pode ter sido causado pela reação do elemento com alguma biomolécula importante para o metabolismo. Outra possível causa é a competição na absorção de outros nutrientes com fósforo, ferro, cobre e manganês.

Tabela 2. Massa seca de plantas de milho, g planta^{-1} , cultivadas em substrato de areia lavada irrigada com solução nutritiva e recebendo doses crescentes de zinco.

Tratamento	Raiz	Parte aérea	Total
D0	$0.93 \pm 9.09 \text{ A}$	$1.70 \pm 0.16 \text{ A}$	$2.63 \pm 0.15 \text{ A}$
D5	$0.75 \pm 0.24 \text{ AB}$	$1.38 \pm 0.18 \text{ AB}$	$2.13 \pm 0.40 \text{ A}$
D10	$1.09 \pm 0.39 \text{ A}$	$1.45 \pm 0.14 \text{ AB}$	$2.53 \pm 0.46 \text{ A}$
D20	$0.71 \pm 0.33 \text{ AB}$	$1.31 \pm 0.38 \text{ AB}$	$2.02 \pm 0.69 \text{ A}$
D40	$0.93 \pm 0.25 \text{ A}$	$1.27 \pm 0.20 \text{ B}$	$2.19 \pm 0.67 \text{ A}$
D80	$0.28 \pm 0.05 \text{ B}$	$0.52 \pm 0.10 \text{ C}$	$0.80 \pm 0.14 \text{ B}$

D0= controle (sem adição de zinco), D5, D10, D20, D40 e D80= tratamentos que receberam doses de 5, 10, 20, 40 e 80 mg Zn kg^{-1} substrato. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias estão seguidas do desvio padrão.

Apesar do efeito negativo das doses elevadas de Zn as plantas não apresentaram sintomas de fitotoxicidade, caracterizada pelo menor tamanho das folhas, clorose da nervura, necrose nas pontas, desenvolvimento reduzido das raízes.



A anidrase carbônica é uma enzima que catalisa a hidratação reversível do gás carbônico, dando origem ao próton (H^+) e ao bicarbonato (HCO_3^-), produtos que participam de inúmeras vias metabólicas como, gliconeogênese, lipogênese, síntese de etileno e muitas outras em plantas superiores e algas e ajudam a manter o balanço de eletrólitos e o pH (RUDENKO et al., 2020).

A atividade da anidrase carbônica aumentou com a dose de Zn aplicada, atingindo valor máximo na dose 10 mg Zn kg^{-1} substrato, para decrescer logo em seguida (Figura 1, Tabela 3). Nas doses 5, 10 e 20 mg Zn kg^{-1} substrato a atividade da anidrase carbônica foi significativamente superior ao tratamento controle.

Rahimi e Schropp (1985), encontraram baixa atividade de anidrase carbônica em plantas com deficiência de Zn.

Wood e Sibly (1952), relataram que plantas de aveia tratadas ou não com Zn ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$), apresentaram atividade da anidrase carbônica semelhantes até os 39 dias após a semeadura (DAS) e, então, decresceu até o final do experimento, sendo sempre superior no tratamento que recebeu Zn.

Tabela 3. Atividade de anidrase carbônica, expressa em segundos 2 mL^{-1} de solução, e zinco absorvido por plantas de milho, mg planta^{-1} , cultivadas em substrato de areia lavada que recebeu solução nutritiva com doses crescentes de zinco.

Tratamento	Anidrase Carbônica	Zn Absorvido
D0	$281.78 \pm 114.66 \text{ C}$	$0.54 \pm 0.24 \text{ B}$
D5	$584.72 \pm 107.93 \text{ AB}$	$0.96 \pm 0.58 \text{ B}$
D10	$726.64 \pm 168.30 \text{ A}$	$1.42 \pm 0.98 \text{ B}$
D20	$583.60 \pm 236.84 \text{ AB}$	$1.96 \pm 1.25 \text{ B}$
D40	$403.70 \pm 134.69 \text{ BC}$	$4.98 \pm 2.85 \text{ B}$
D80	$457.62 \pm 83.49 \text{ ABC}$	$8.66 \pm 5.25 \text{ A}$

D0= controle (sem adição de zinco), D5, D10, D20, D40 e D80= tratamentos que receberam doses de 5, 10, 20, 40 e 80 mg Zn kg^{-1} substrato. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Médias estão seguidas do desvio padrão.

Em aveia cultivada em solução contendo Zn (0.2 mg L^{-1}) ou não, o teor do nutriente nas folhas foi semelhante até os 21 dias após a semeadura (DAS), aumentou até os 49 dias e decresceu até o final do experimento, sendo superior no tratamento com Zn (WOOD e SIBLY, 1952).

4 CONCLUSÕES

A atividade da anidrase carbônica aumentou significativamente com a dose de zinco até a concentração de 10 mg Zn kg^{-1} de substrato, quando atingiu a sua atividade máxima.

A concentração de zinco na planta aumentou significativamente, atingindo o valor máximo na dose mais elevado.

A menor produção de massa seca pela planta de milho ocorreu na dose mais elevada de zinco (80 mg Zn kg^{-1} de substrato) e não houve diferença entre os demais tratamentos, indicando que o zinco presente na semente aparentemente é suficiente para a fase inicial de desenvolvimento do milho.



A atividade da anidrase carbônico não se correlacionou de forma significativa com o teor de zinco e com a produção de massa seca pela planta de milho.



REFERÊNCIAS

- BARBOSA FILHO, M. P. DYNIA, J. F. ZIMMERMANN, F. J. P. Resposta do arroz de sequeiro ao zinco e ao cobre efeito residual para o milho. *R. Bras. Ci. Solo*. Campinas-SP. 14:333-338. 1990.
- GOEDERT, W. J. *Solos dos cerrados: tecnologias e estratégias de manejo*. EMBRAPA – Brasília. Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados. 1985. 422p.
- HINESLY, T. D., ALEXANDER, D. E., ZIEGLER, E. L. et al. Zinc and cadmium accumulation by corn inbreds grown on sludge amended soil. *Agron Journal*, n. 70, p. 425-428, 1978.
- LOPES, A. S. *Solos sob “cerrado”. características, propriedades e manejo*. 2ª ed. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. 1984. 162p.
- MASSEY, H. F & LOEFFEL, F. A. Variatom of zinc content of grain from imbed linrs o corn Agron. Journal, v. 58, p. 143-144, 1966.
- RIBEIRO, N. D. & SANTOS, O. S. Aproveitamento do zinco aplicado na semente na nutrição da planta. *Ciência Rural*, v. 26, p. 159-165, 1996.
- QUEIROZ, A. SCHROP, A. Carboanydrase activity and extractable zinc as indicator of zinc supply of plants. *Soils and Fertilizers*. 48. 1985.
- Rudenko, N. N, Borisova-Mubarakshina, M. M., Ignatova, L. K., Fedorchuk, T. P., Nadeeva-Zhurikova, E. M, Boris N., Ivanov, B. N. Role of Plant Carbonic Anhydrases under Stress Conditions. In: Hossain <https://doi.org/10.5772/intechopen.91971>.
- WOOD, J. C. e SIBLY, P. M. Carbonhyc anidrase activity in plants in relation to zinc contents. *Aust. Sci. Res. B*, v. 5, p.44-55, 1952.