

SIDIVAL LOURENÇO

Engenheiro Agrônomo

ABSORÇÃO DE FÓSFORO POR RAIZES DESTACADAS DE CEVADA
(*Hordeum vulgare*) EM PRESENÇA DE MAGNÉSIO

Tese Apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de "Magister Scientiae"

PIRACICABA

1967

SIDIVAL LOURENÇO
Engenheiro Agrônomo

"ABSORÇÃO DE FÓSFORO POR RAÍZES DESTACADAS DE CEVADA
(HORDEUM VULGARE) EM PRESENÇA DE MAGNÉSIO"

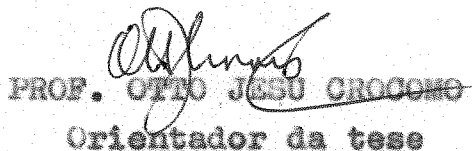
Tese de "Magister Scientiae" aprovada em 8 de junho
de 1967, pela Comissão Julgadora composta dos seguin-
tes membros:

Prof. Eurípedes Malavolta
Prof. Francisco de Assis Ferraz de Mello
Prof. Otto Jesu Crocomo
Prof. Darcy Martins da Silva
Prof. Valdomiro Corrêa de Bittencourt

Autorizada a publicação:



PROF. F. PIMENTEL GOMES
Secretário Executivo do CD/CPG



PROF. OTTO JESU CROCOMO
Orientador da tese



PROF. FRANCISCO DE ASSIS FERRAZ DE MELLO
Coordenador do Curso de Pós-Graduação
em Nutrição de Plantas

Piracicaba

1967

SIDIVAL LOURENÇO

Engenheiro Agrônomo

ABSORÇÃO DE FÓSFORO POR RAIZES DESTACADAS DE CEVADA

(Hordeum vulgare) EM PRESENÇA DE MAGNÉSIO

Tese Apresentada à
Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Universi-
dade de São Paulo, para obten-
ção do título de
"Magister Scientiae"

PIRACICABA

= 1967 =

A meus pais

À minha esposa

A meus irmãos

Agradeço às Seguintes Pessoas e Instituições

André Martin Louis Neptune

Darcy Martins Silva

Henrique Paulo Haag

Izaias Rangel Nogueira

José Renato Sarruge

Luiza Gomes Silva

Oscar Lopes G.

Roberto Simionato Moraes

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Universidade de São Paulo - Brasil

Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas

Zona Sul - Uruguai

Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior - Brasil

Em especial, agradeço aos Professores

OTTO JESU CRÓCOLO

pela paciência,

pela orientação segura e decidida

EURÍPEDES MALAVOLTA

pela acolhida e ensinamentos

pela sugestão do tema.

ÍNDICE

| | | |
|-----|------------------------|----|
| 1 - | Introdução | 1 |
| 2 - | Revisão da Literatura | 6 |
| 3 - | Material e Métodos | 8 |
| 4 - | Resultados e Discussão | 10 |
| 5 - | Resumo e Conclusões | 23 |
| 6 - | Summary | 25 |
| 7 - | Literatura Citada | 27 |

1 - INTRODUÇÃO

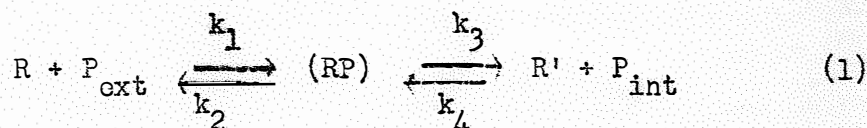
Uma célula viva, em contato com um meio nutritivo, tende a retirar d'ele as substâncias necessárias para suas funções. Na sua migração do meio externo para o interior da célula, essas substâncias devem atravessar a parede celular formada primariamente por celulose e em seguida uma membrana diferencialmente permeável, que é constituída por uma camada triplíce de lipoproteína. A penetração de íônio no interior da célula, se dá inicialmente, por processos físicos tais como difusão, troca iônica, adsorção e fluxo de massa (CROCCO et al. 1965, p. 63), e é dita absorção passiva de íônios. Essa absorção se verifica apenas a favor de um gradiente de concentração. Os íônios absorvidos passivamente podem ocupar uma porção da célula chamada "espaço livre" [EPSTEIN (1956); LATIES (1959)], de onde podem voltar prontamente para o meio externo por difusão, ou migrar para a parte superior da planta a través do xilema.

A penetração passiva de sais satisfaz apenas à absorção inicial. A continuação da absorção, porém, é condicionada a processos metabólicos. Fatores adversos a funções vitais como, condições anaeróbicas, baixa temperatura ou ação de inibidores, que não interferem acen tuadamente na absorção passiva, determinam uma drástica redução na absorção ativa. Por outro lado, ela é estimulada por substratos respiratórios adicionados ao meio ou produzidos na fotossíntese. A energia advinda desses substratos permite que a absorção se processe contra um gradiente de concentração, passando os íônios de uma solução externa menos concentrada para o suco celular, mais concentrado, através de uma membrana mais ou menos impermeável à penetração passiva, o tonoplasto.

Diversas hipóteses têm sido formuladas para explicar o processo de transporte ativo. A maioria delas propõe a existência de um "carregador" "R", que se combinaria com o íônio "P" formando um com

A absorção de sais pelas plantas pode ser estudada usando-se a planta t^oda ou apenas parte dela. Os trabalhos com raízes destacadas apresentam a vantagem de permitir observar o fenômeno de acumulação iônica em um sistema relativamente simples e livre da influência da parte aérea.

As raízes são os órgãos naturais de absorção e nelas, em geral, a concentração de um dado elemento, no suco celular é maior que a do mesmo elemento nutriente no meio nutritivo em que está imersa. O fósforo está entre os elementos cuja concentração no suco celular ultrapassa a da solução externa. Sua absorção exige, portanto, gastos de energia. Nas plantas, as principais reações que podem produzir altos valores de energia são as implicadas na fosforilação oxidativa associada com a oxidação de componentes da cadeia respiratória (CROCCO, 1964). A absorção do fósforo, bem como a de qualquer outro íon absorvido metabolicamente, se daria segundo a sequência de reações:



Onde, R e R', representam o carregador ativo e o carregador transformado, respectivamente;

P_{ext} e P_{int}, significam o íon na superfície externa, e interna do tonoplasto;

RP, corresponde ao complexo carregador-íon;

k₁ é a constante de velocidade de formação de RP;

k₂ é a constante de velocidade de dissociação de RP;

k₃ é a constante de velocidade de decomposição de RP, e

k₄ é a constante de velocidade de regeneração de RP, que na maioria dos casos é insignificante.

A similitude da equação (1) com a que expressa o que se passa na ação das enzimas sobre seu substrato, sugeriu a EPSTEIN e HAGEN (1952), a possibilidade de dispensar ao estudo da cinética de absorção iônica, o tratamento matemático dispensado por MICHAELIS e MENTEN à cinética enzimática. Segundo esse tratamento, pode-se calcular a velocidade da absorção de íons em um momento dado, por uma equação de hipérbole:

$$v = \frac{V_m (P)}{K_m + (P)} \quad (2)$$

onde,

v = velocidade da reação em um momento dado;

V_m = velocidade máxima de absorção;

K_m = constante de dissociação aparente do complexo RP ;
é a constante de Michaelis, característica da reação;

(P) = concentração do substrato.

K_m , por definição, é a concentração do substrato que garante a metade da velocidade máxima.

A equação acima pode ser transformada em uma equação linear de maneira apresentada por HOFSTEE (1952), desde que se suponha que as concentrações de P_{ext} e R se mantêm constantes. Como a equação transformada é linear, colocando-se em gráficos os valores obtidos experimentalmente para v , contra $v/(P)$, a linha reta resultante tem como inclinação o valor de $-K_m$ e corta a ordenada em um valor de v igual à velocidade máxima. Porém, quando se estuda a absorção do fósforo, obtém-se uma linha curva que é interpretada por HAGEN e HOPKINS (1955), como o resultado de duas reações de primeira ordem implicadas no processo de absorção. A curva pode ser resolvida, graficamente, em duas linhas retas componentes, pelo método das coordenadas polares.

O fósforo e o magnésio são elementos essenciais à vida das plantas. Ambos fazem parte da estrutura de diversos compostos orgânicos vitais e o magnésio atua ainda como ativador de reações importantes como as de transferência do grupo fosfato. A análise química revela que esses elementos se encontram em proporções relativamente altas nos diferentes órgãos vegetais. Apesar disso, essas proporções variam para plantas de espécies diferentes mesmo quando desenvolvidas em um mesmo meio nutritivo, ou de uma para outra planta da mesma espécie, quando cultivadas em meios diferentes. A explicação para o fato pode ser encontrada comparando certas constantes biológicas obtidas pela análise cinética de resultados de experimentos de absorção. Uma melhor visualização do fenômeno é conseguida quando em tais experimentos se utilizam sistemas mais simples como aqueles formados pelas raízes destacadas.

A influência do magnésio na absorção do fósforo vem sendo citada na literatura. O presente experimento busca um dimensionamento dessa influência pela análise de cinética de absorção de fósforo em ausência e presença de magnésio. O mesmo foi realizado nos Laboratórios da Cadeira n.º 20, Química Biológica, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Estado de São Paulo.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Os escritos sobre a influência de magnésio na absorção de fósforo pelas raízes das plantas são bastante escassos. Entretanto, já em 1903, Loew, citado por KRACKENBERGER e PETERSON (1954), afirmava que o magnésio é o "transportador" do fósforo, incorporando-o em compostos orgânicos. A assertiva de Loew vem sendo repetida por vários autores como ZIMMERMAN (1947) e JACOB e VEXKULL (1961, pág. 56) não existindo, contudo, muitos dados experimentais que a confirmem. A razão mais provável para isto, talvez seja o fato conhecido de que o magnésio atua como ativador de várias reações de fosforilação [DIXON e WEBB, (1964, pág. 716 ss)], e é também necessário para o acúmulo de fósforo dentro dos mitocôndria [MAZELIS e STUMPF, (1955) ; BRIERLEY, (1963) ; MILLARD et al., (1964)]. Um dos poucos trabalhos de nutrição mineral que fazem referência ao assunto é o de BEESON et al. (1944), realizado com plantas de tomate cultivadas em solução nutritiva. Esses pesquisadores estudaram o efeito da variação dos teores de nutrientes existentes no meio sobre a absorção de íons e encontraram uma correlação positiva entre o nível de fósforo nas folhas e o suprimento de magnésio. O mesmo BEESON (1946), cita NIESCHLAG que observou sensível aumento na concentração de fósforo em trevo, batata e centeio, como resultado da aplicação de compostos magnesianos ao solo. HAAG e MALAVOLTA (1960), constataram diminuição do teor de fósforo em folhas de café, cultivado em solução nutritiva, causada pela omissão de magnésio.

Ao que parece, apenas TRUOG et al (1947), se preocuparam em investigar diretamente a relação magnésio-fósforo em nutrição mineral. Estes autores trabalharam com plantas de ervilha, cultivando-as em solo e em solução nutritiva, em presença de vários níveis de magnésio e fósforo. Observaram que nas sementes, o aumento do conteúdo de

magnésio se fez acompanhar por alto teor de fósforo. COOPER et al. (1947) , em sua revisão sobre o magnésio no solo e na planta, dão ênfase ao acúmulo de ambos os iônios em sementes e tecidos vegetais de reserva. Segundo COOPER (1950) , êsse aumento seria devido a uma relação definida entre magnésio e fósforo na reprodução e no crescimento das plântulas. Para êsse autor, o precipitado de $Mg_3(PO_4)_2$, também detectado por BRIERLEY (1963) , em mitocôndria de coração de boi, é a forma de fósforo mais estável que pode ser prontamente assimilável com a energia produzida na respiração e reações de oxidação nas células das plantas.

Mais recentemente, CROCCO (1964) e CROCCO e MALAVOLTA (1964) , utilizando raízes destacadas e plântulas de cevada, estudaram a absorção e a translocação de fosfato - P^{32} em presença de quantidades crescentes de magnésio. Foi constatado que, nas condições do ensaio, a concentração de magnésio da ordem de $5 \times 10^{-5} M$ determinou maior estímulo para a absorção e translocação do aniônio. Quando concentrações maiores de magnésio foram empregadas, observou-se um decréscimo na intensidade de absorção e translocação do fósforo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Germinação das sementes

Para atingir as finalidades do presente experimento, foram utilizadas raízes de plântulas de cevada (Hordeum vulgare), com seis dias de idade, obtidas de sementes gentilmente cedidas pela Companhia Cervejaria Brahma, do Rio Grande do Sul, que germinaram em presença de solução de sulfato de cálcio $1 \times 10^{-4} M$, seguindo-se, em linhas gerais, a técnica descrita por EPSTEIN e HAGEN (1952). As sementes foram deixadas em água destilada, no escuro, durante 24 horas, com arejamento. Em seguida, foram colocadas entre duas camadas de gaze suportadas por uma tela de aço inoxidável, que descansava sobre um recipiente contendo a solução de sulfato de cálcio; a solução foi constantemente arejada e renovada três dias após a germinação. Igual solução foi usada para irrigar as sementes durante o período germinativo e até que as raízes recém desenvolvidas atingissem a solução, quando então foi retirada a gaze que cobria as sementes.

3.2 - Soluções

Foram usados sete níveis de fósforo, sob a forma de fosfato monobásico de sódio: $1 \times 10^{-6} M$, $5 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-5} M$, $3 \times 10^{-5} M$, $5 \times 10^{-5} M$, $1 \times 10^{-4} M$ e $5 \times 10^{-4} M$, concentrações finais. O radiofósforo usado para marcar as soluções foi obtido no Instituto de Energia Atômica, da Universidade de São Paulo. Em cada ensaio usou-se 0,4 microcurie por 100 ml de solução.

As soluções de magnésio utilizadas no experimento, sob a forma de cloreto, tinham as seguintes concentrações finais:

$1 \times 10^{-5} M$, $2 \times 10^{-5} M$, $5 \times 10^{-5} M$ e $1 \times 10^{-4} M$.

3.3 - Ensaio de absorção

Imediatamente antes do uso, as raízes foram cortadas rente à tela e colocadas em água desmineralizada. No momento do uso, as raízes foram retiradas da água, secas entre camadas de papel de filtro e separadas em porções de 0,5 g que foram colocadas em recipientes contendo água desmineralizada. Após pesadas todas as porções que seriam utilizadas no ensaio, as raízes foram passadas para frascos de Erlenmeyer de 125 ml de capacidade, contendo as soluções em estudos, e que já estavam em banho de água a 28 graus centígrados. Essas soluções foram ajustadas a valor pH 4, com HCl 0,1 N.

A absorção de fósforo, nos seus vários níveis, se processou sob aeração contínua, durante 4, 8, 12, 16 e 20 minutos, em ausência e em presença de distintas concentrações de magnésio.

No final do período de absorção, a solução radioativa foi decantada e as raízes lavadas três vezes com água; em seguida o material em estudo foi colocado em solução de fosfato monobásico de sódio $5 \times 10^{-5} M$, não marcado, durante 10 a 15 minutos, a fim de remover das raízes o fósforo não associado a transporte ativo. Após nova lavagem, em três águas, as raízes foram colocadas em cubetas metálicas, circulares, de duas polegadas de diâmetro, e secas sob lâmpada infra-vermelha, antes de se medir a radioatividade.

Um mililitro da solução radioativa, pipetado para cubeta contendo 0,5 g de raízes não tratadas, após evaporado sob luz infra-vermelha, foi utilizado como referência para calcular a absorção de fósforo pelas raízes.

3.4 - Medida da radioatividade

A radioatividade das amostras foi medida com tubo Geiger-Muller de janela de mica de $1,4 \text{ mg/cm}^2$ de espessura, conectado a escala límetro Modelo 181B, fabricado pela Nuclear Chicago.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Absorção de fósforo em função do tempo e de sua concentração externa

A absorção de fósforo foi estudada aos 4, 8, 12, 16 e 20 minutos. Como se pode verificar pelo exame da Figura 1, a absorção é função linear do tempo, na ausência ou presença de qualquer um dos níveis de magnésio. A absorção aumenta também com o aumento da concentração externa de fósforo (P_{ext}), independentemente do tempo ou da concentração externa de magnésio (Mg_{ext}) (Tabela I). Isto sugere que o aumento de P_{ext} provoca um incremento na formação do complexo carregador-iônio (RP) e que em concentrações muito altas de P_{ext} , e na ausência de outros iônios interferentes, todo o carregador (R), estará saturado com fósforo, isto é, $\Sigma R = RP$. No presente experimento, a concentração mais elevada de P_{ext} foi de $5 \times 10^{-5} M$. NOGGLE e FRIED (1960), em estudos com raízes destacadas de cevada, observaram que essa concentração determinou a saturação total do carregador.

4.2 - Absorção de fósforo em função da concentração externa de magnésio

Como demonstra a Figura 2, a absorção de fósforo aumenta quando se eleva a concentração externa de magnésio, atingindo, em todos os casos, um máximo do nível $5 \times 10^{-5} M$ do catiônio, o que está de acordo com os resultados de CROCCO e MALAVOLTA (1964). Entretanto, em concentração de Mg_{ext} superior a $5 \times 10^{-5} M$ a absorção decresce sensivelmente, o que foi também verificado pelos autores citados. Essas observações indicam que baixas concentrações de magnésio favorecem a absorção de fósforo por raízes destacadas de cevada, mas que concentrações externas da ordem de $1 \times 10^{-4} M$ exercem um efeito contrário. Este efeito prejudicial de altas concentrações de Mg_{ext} é mais acentuado quando a concentração de P_{ext} é baixa e é atenuado quando se eleva o nível de P_{ext} , como se infere da Tabela II. Os números ali apresentados ex-

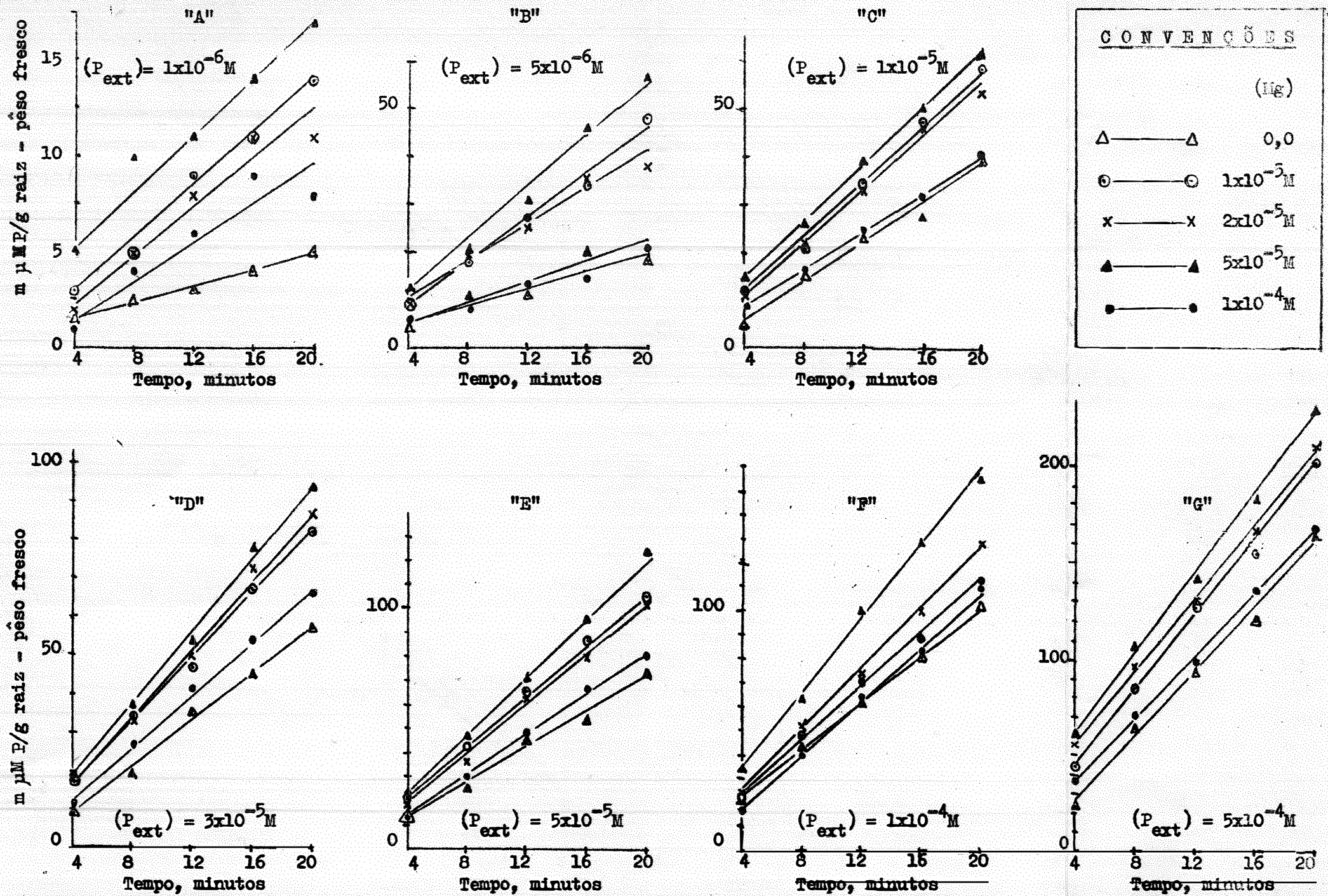


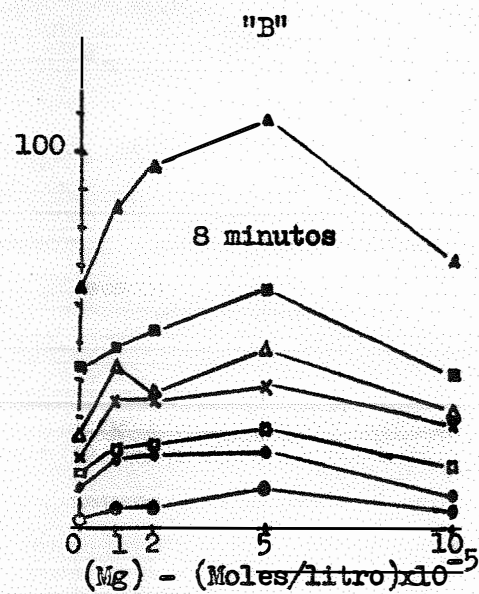
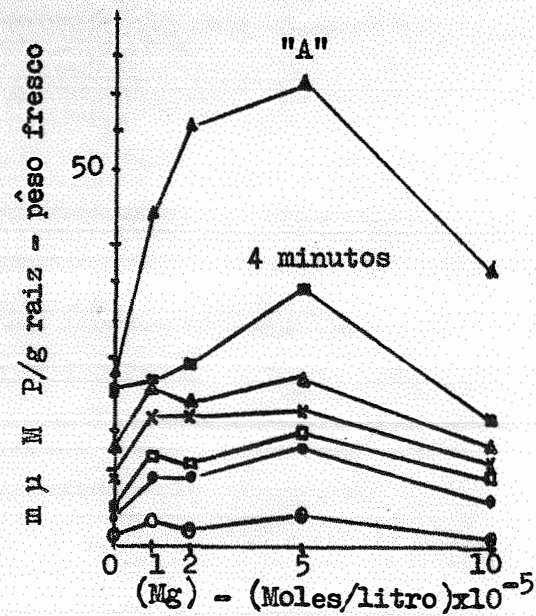
Figura 1 - Absorção de fósforo por raízes destacadas de cevada, em função do tempo e na presença de vários níveis de magnésio: A - Concentração externa de fósforo (P_{ext}) igual a $1 \times 10^{-6} M$; B - (P_{ext}) = $5 \times 10^{-6} M$; C - (P_{ext}) = $1 \times 10^{-5} M$; D - (P_{ext}) = $3 \times 10^{-5} M$; E - (P_{ext}) = $5 \times 10^{-5} M$; F - (P_{ext}) = $1 \times 10^{-4} M$ e G - (P_{ext}) = $5 \times 10^{-4} M$.

TABELA I

Absorção de fósforo por raízes destapadas de cevada em ausência e presença de magnésio, medida aos 4, 8, 12, 16 e 20 minutos

Dados em m p moles de fósforo por grama de raiz - peso fresco

| NÍVEIS DE FÓSFORO MOLES/ LITRO | NÍVEIS DE MAGNÉSIO - MOLES / LITRO | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------|------------------------------------|------|------|-------|-------|--------------------|------|-------|-------|-------|--------------------|------|-------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|--------------------|------|------|-------|-------|
| | 0,0 | | | | | 1×10^{-5} | | | | | 2×10^{-5} | | | | | 5×10^{-5} | | | | | 1×10^{-4} | | | | |
| | 4' | 8' | 12' | 16' | 20' | 4' | 8' | 12' | 16' | 20' | 4' | 8' | 12' | 16' | 20' | 4' | 8' | 12' | 16' | 20' | 4' | 8' | 12' | 16' | 20' |
| 1×10^{-6} | 1,5 | 2,5 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 3,0 | 5,0 | 9,0 | 11,0 | 14,0 | 2,0 | 5,0 | 8,0 | 11,0 | 11,0 | 4,0 | 10,0 | 11,0 | 14,0 | 17,0 | 1,0 | 4,0 | 6,0 | 9,0 | 8,0 |
| 5×10^{-6} | 4,0 | 11,0 | 11,0 | 20,0 | 18,0 | 9,0 | 18,0 | 27,0 | 34,0 | 48,0 | 9,0 | 19,0 | 25,0 | 35,0 | 38,0 | 13,0 | 20,0 | 31,0 | 46,0 | 57,0 | 6,0 | 8,0 | 13,0 | 14,0 | 21,0 |
| 1×10^{-5} | 5,0 | 15,0 | 23,0 | 27,0 | 39,0 | 12,0 | 21,0 | 34,0 | 47,0 | 58,0 | 11,0 | 22,0 | 33,0 | 46,0 | 53,0 | 15,0 | 26,0 | 39,0 | 50,0 | 61,0 | 9,0 | 16,0 | 24,0 | 31,0 | 40,0 |
| 3×10^{-5} | 9,0 | 19,0 | 35,0 | 45,0 | 57,0 | 17,0 | 34,0 | 47,0 | 67,0 | 82,0 | 17,0 | 33,0 | 50,0 | 72,0 | 87,0 | 18,0 | 37,0 | 54,0 | 78,0 | 94,0 | 11,0 | 27,0 | 41,0 | 54,0 | 66,0 |
| 5×10^{-5} | 13,0 | 25,0 | 45,0 | 54,0 | 73,0 | 21,0 | 43,0 | 66,0 | 87,0 | 105,0 | 19,0 | 36,0 | 63,0 | 80,0 | 102,0 | 22,5 | 47,0 | 71,0 | 96,0 | 124,0 | 13,0 | 30,0 | 48,0 | 67,0 | 80,0 |
| 1×10^{-4} | 21,0 | 43,0 | 62,0 | 81,0 | 102,0 | 22,0 | 48,0 | 71,0 | 89,0 | 113,0 | 24,0 | 52,0 | 74,0 | 100,0 | 128,0 | 34,0 | 63,0 | 100,0 | 128,0 | 155,0 | 16,5 | 40,0 | 64,0 | 83,0 | 110,0 |
| 5×10^{-4} | 23,0 | 64,0 | 93,0 | 121,0 | 164,0 | 44,0 | 85,0 | 127,0 | 155,0 | 202,0 | 56,0 | 96,0 | 130,0 | 167,0 | 211,0 | 61,5 | 108,0 | 141,5 | 182,0 | 230,0 | 36,5 | 70,0 | 99,0 | 136,0 | 168,0 |



| CONVENÇÕES | |
|------------|------------------------|
| (P) | |
| ○ — ○ | 1 x 10 ⁻⁶ M |
| ● — ● | 5 x 10 ⁻⁶ M |
| □ — □ | 1 x 10 ⁻⁵ M |
| x — x | 3 x 10 ⁻⁵ M |
| △ — △ | 5 x 10 ⁻⁵ M |
| ■ — ■ | 1 x 10 ⁻⁴ M |
| ▲ — ▲ | 5 x 10 ⁻⁴ M |

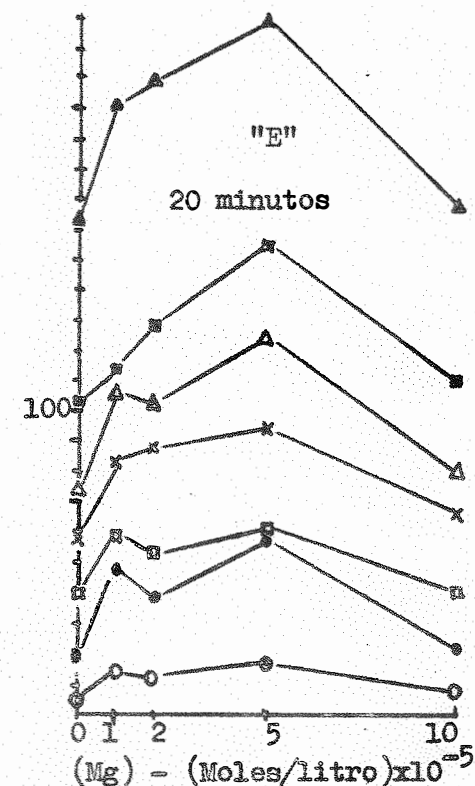
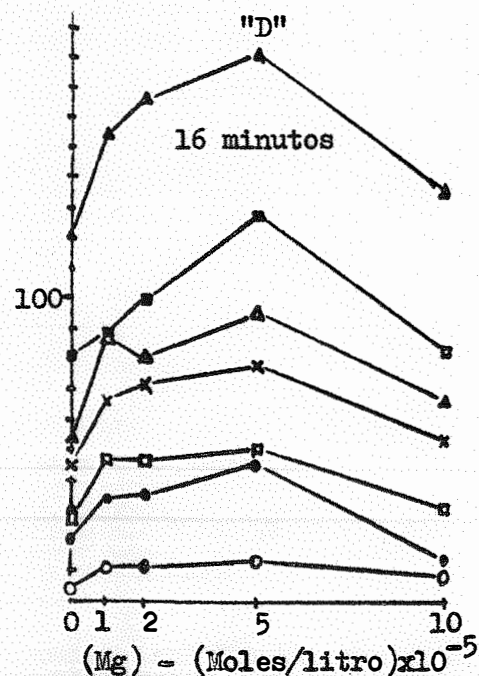
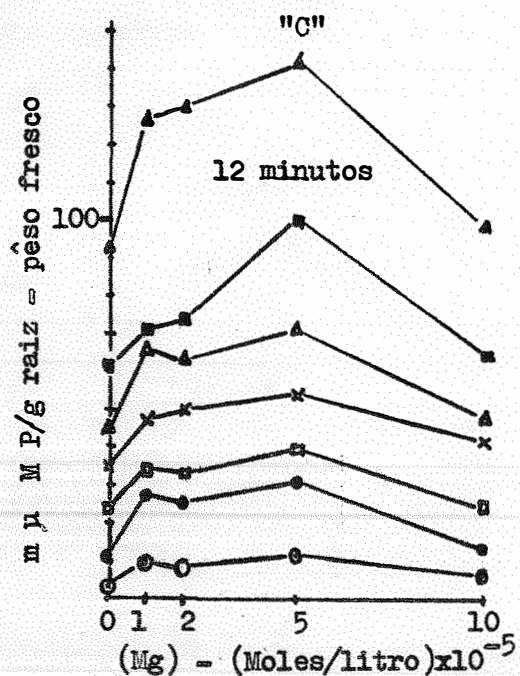


Figura 2 - Absorção de fósforo por raízes destacadas de cevada, em função da concentração externa de magnésio e da concentração externa de fósforo, em diferentes tempos experimentais: A - aos 4 minutos; B - aos 8 minutos; C - aos 12 minutos; D - aos 16 minutos e E - aos 20 minutos.

pressam a absorção de fósforo ao nível $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de magnésio em função da absorção observada ao nível $5 \times 10^{-5} \text{M}$, esta tomada como 100.

Tabela II

Absorção de fósforo ao nível $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de magnésio em percentagem da observada ao nível $5 \times 10^{-5} \text{M}$

| Concentração de Fósforo Moles/litro | Absorção de Fósforo em Percentagem | | | | |
|-------------------------------------------|------------------------------------|------|------|------|------|
| | Tempo em Minutos | | | | |
| | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| 1×10^{-6} | 25,0 | 40,0 | 54,5 | 64,2 | 47,0 |
| 5×10^{-6} | 46,0 | 40,0 | 35,0 | 30,4 | 36,8 |
| 1×10^{-5} | 60,0 | 61,5 | 61,5 | 62,0 | 65,5 |
| 3×10^{-5} | 61,0 | 72,9 | 75,9 | 69,2 | 70,0 |
| 5×10^{-5} | 56,0 | 63,8 | 67,6 | 69,8 | 64,5 |
| 1×10^{-4} | 50,0 | 63,4 | 54,0 | 64,9 | 70,9 |
| 5×10^{-4} | 48,0 | 65,8 | 68,3 | 74,7 | 73,0 |

A partir desses elementos, pode-se deduzir que o magnésio, que de início estaria estimulando a formação do complexo RP, passa a influir negativamente na absorção do fósforo, quando em concentrações elevadas.

Um cálculo da afinidade aparente entre o fósforo e o carregador, e o efeito que a concentração externa de magnésio exerce sobre a complexação do composto intermediário, pode ser obtido quando se coloca, em gráfico, a quantidade de fósforo absorvido, y , nas ordenadas, con-

tra essa mesma quantidade dividida pela concentração externa correspondente de fósforo, $v/(P)$, nas abscissas. No presente experimento esta estimativa foi estudada para os tempos de 4 e 12 minutos, períodos experimentais que se considera dentro das condições de "fluxo contínuo". Os gráficos A, B, C e D das Figuras 3 e 4, mostram a absorção de fósforo nos diferentes níveis de P_{ext} estudados, medida na ausência e presença de diversos teores de magnésio. Considerando-se o conceito de carregador na absorção de íônios, a linha que une os diversos pontos referentes aos valores de y e $v/(P)$, deveria ser uma linha reta. A resultante, contudo, é uma linha curva (Figuras 3 e 4), e esta é a somatória de duas componentes lineares, a e b , nas quais pode ser resolvida, graficamente, por coordenadas polares (*). Esta observação indica que dois lugares de absorção estão implicados na absorção do fósforo pelas raízes destacadas de cevada, fato já demonstrado por HAGEN e HOPKINS (1955), HAGEN et al. (1957) e NOGGLE e FRIED (1960). A linha a , define os valores obtidos para altas concentrações de fósforo, enquanto a linha b se refere a baixas concentrações. A velocidade máxima para cada um desses pontos de absorção, V_{m_a} e V_{m_b} pode ser determinada diretamente pelas interseções das linhas a e b com o eixo das ordenadas.

As constantes de dissociação K_{m_a} e K_{m_b} que correspondem respectivamente aos complexos R_aP e R_bP , são encontradas calculando-se a inclinação dessas mesmas linhas. Esses valores são mostrados nas Tabelas III e IV.

(*) Neste experimento, além desse método foi usado um processo matemático desenvolvido pelo Prof. Izaias Rangel Nogueira, da Cadeira de Matemática e Estatística, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", baseado no ajustamento de hipérbole pelo método dos mínimos quadrados (não publicado).

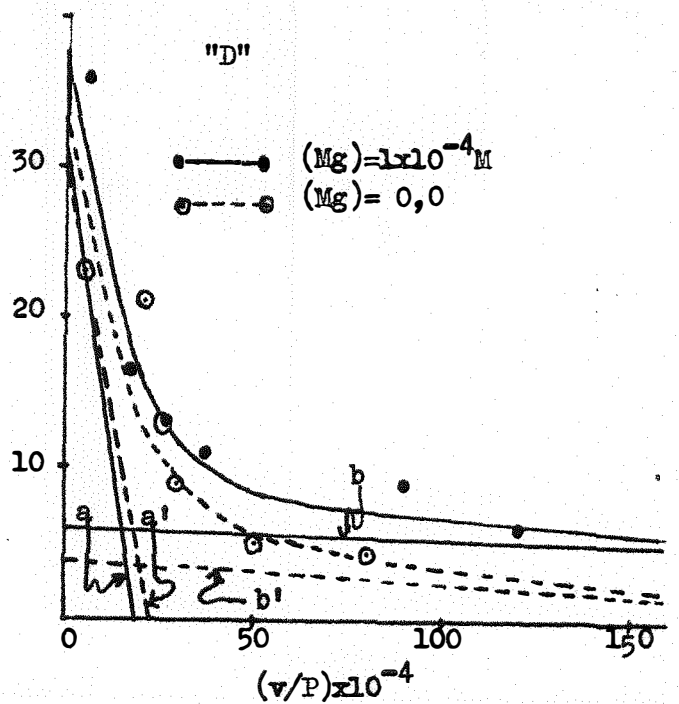
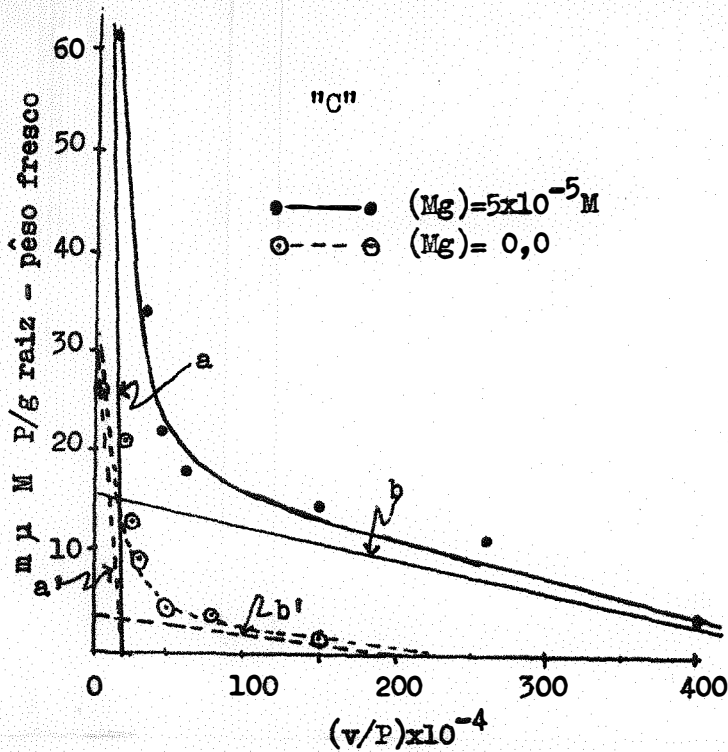
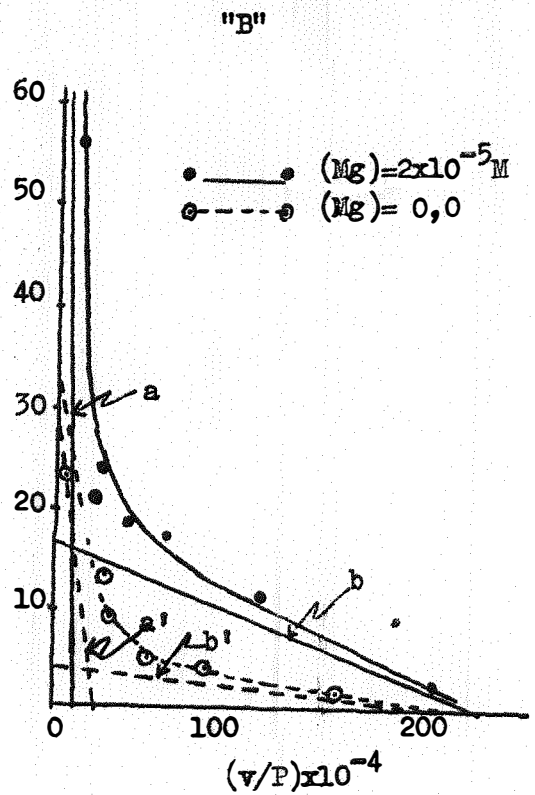
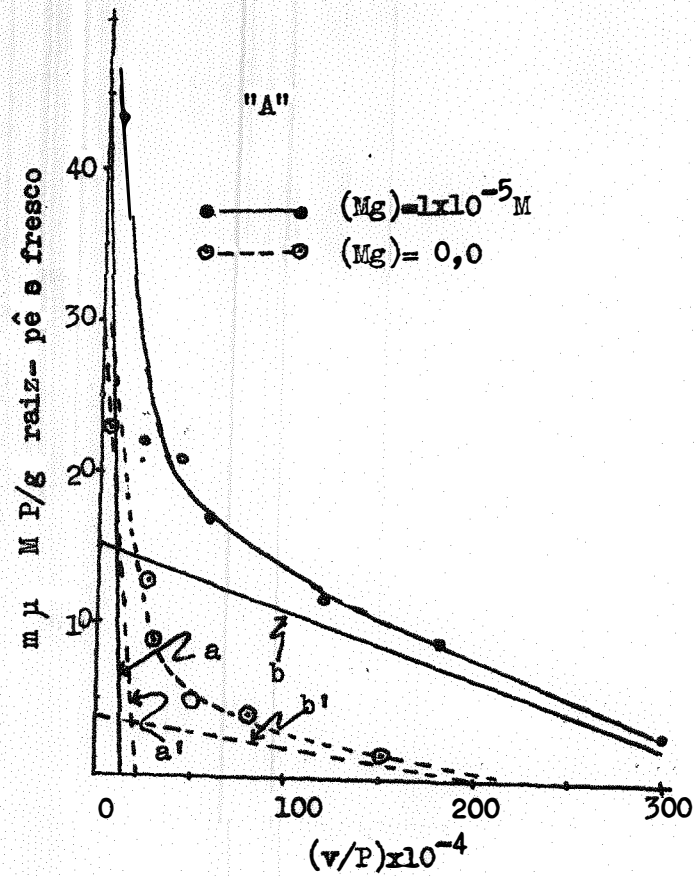


Figura 3 - Efeito da concentração externa de magnésio na absorção de fósforo medida em raízes destacadas de cevada, após 4 minutos. A linha "a" se refere aos valores encontrados em altas concentrações externas de fósforo enquanto a linha "b" corresponde aos valores verificados em baixas concentrações de fósforo. A- Ausência, e presença de 1×10^{-5} M de Mg; B- Ausência, e presença de 2×10^{-5} M de Mg; C- Ausência, e presença de 5×10^{-5} M de Mg; D- Ausência, e presença de 1×10^{-4} M de Mg.

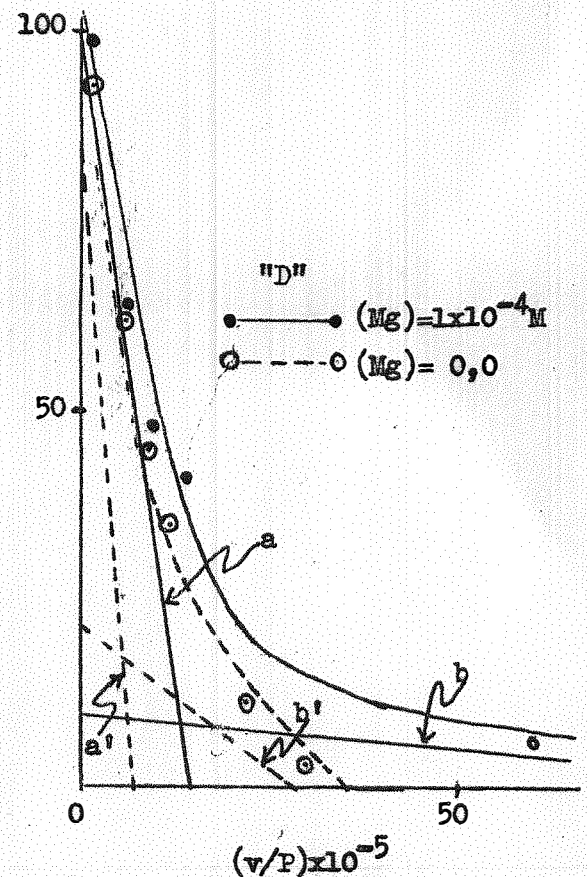
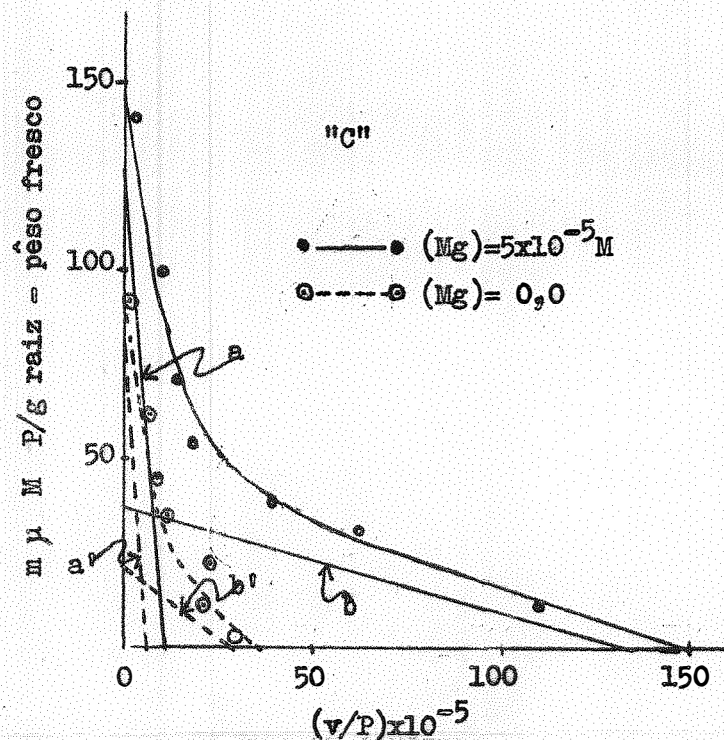
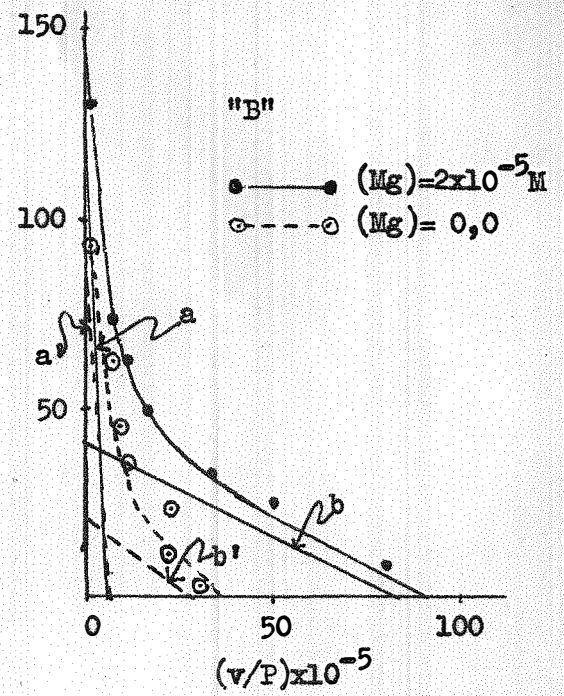
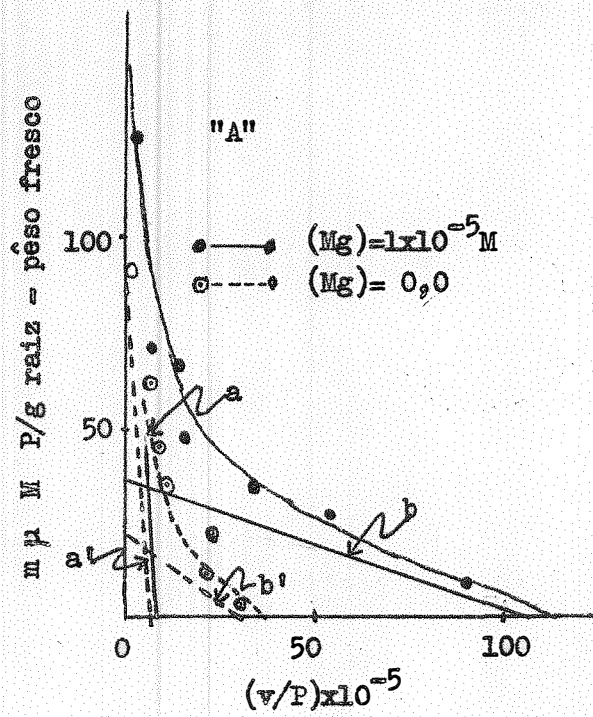


Figura 4 - Efeito da concentração externa de magnésio na absorção de fósforo medida em raízes destacadas de cevada, após 12 minutos. A linha "a" se refere aos valores encontrados em altas concentrações externas de fósforo enquanto a linha "b" corresponde aos valores verificados em baixas concentrações de fósforo. A- Ausência, e presença de 1×10^{-5} M de Mg; B- Ausência, e presença de 2×10^{-5} M de Mg; C- Ausência, e presença de 5×10^{-5} M de Mg; D- Ausência, e presença de 1×10^{-4} M de Mg.

Tabela III

Valores de Km_a e Km_b , Vm_a e Vm_b , calculados para 4 minutos

| Concentração de Magnésio Moles/litro | Km_a | Vm_a | Km_b | Vm_b |
|--------------------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | Moles/litro | m μ MP/g raiz | Moles/litro | m μ MP/g raiz |
| 0,0 | $1,3 \times 10^{-4}$ | 29,6 | $1,9 \times 10^{-6}$ | 3,9 |
| 1×10^{-5} | $3,4 \times 10^{-4}$ | 46,6 | $4,4 \times 10^{-6}$ | 15,4 |
| 2×10^{-5} | $9,0 \times 10^{-4}$ | 107,6 | $7,3 \times 10^{-6}$ | 16,5 |
| 5×10^{-5} | $4,9 \times 10^{-4}$ | 108,4 | $3,2 \times 10^{-6}$ | 15,8 |
| 1×10^{-4} | $1,7 \times 10^{-4}$ | 31,4 | $0,9 \times 10^{-6}$ | 6,0 |

Tabela IV

Valores de Km_a e Km_b , Vm_a e Vm_b , calculados para 12 minutos

| Concentração de Magnésio Moles/litro | Km_a | Vm_a | Km_b | Vm_b |
|--------------------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| | Moles/litro | m μ MP/g raiz | Moles/litro | m μ MP/g raiz |
| 0,0 | $1,1 \times 10^{-4}$ | 85,5 | $7,7 \times 10^{-6}$ | 21,8 |
| 1×10^{-5} | $1,3 \times 10^{-4}$ | 111,2 | $3,4 \times 10^{-6}$ | 36,3 |
| 2×10^{-5} | $2,2 \times 10^{-4}$ | 126,0 | $4,5 \times 10^{-6}$ | 41,2 |
| 5×10^{-5} | $1,2 \times 10^{-4}$ | 126,6 | $2,8 \times 10^{-6}$ | 37,2 |
| 1×10^{-4} | $0,7 \times 10^{-4}$ | 99,3 | $1,0 \times 10^{-6}$ | 9,3 |

Como se pode notar, os valores de K_m foram mais altos quando P_{ext} era elevado, do que quando esse teor foi baixo. Isto indicaria que em concentrações baixas de fósforo, os "lugares" do carregador que têm alta afinidade com o íônio seriam preenchidos primeiramente. A concentração externa de magnésio parece não influenciar consistentemente os valores de K_m , mas tem um efeito evidente sobre os valores de V_m . Esta observação concorda com a de LEGGETT et al. (1965), quando, estudando a influência do cálcio na absorção do fósforo em raízes destacadas de cevada, verificaram que o catiônio causava um aumento da velocidade máxima sem influenciar os valores de K_m .

A presença do magnésio na solução externa, determinou um aumento na velocidade máxima, tanto para altos como para baixos níveis de fósforo, no decorrer do tempo. Porém, em concentração de magnésio igual a $1 \times 10^{-4} M$, o efeito foi inverso: apesar de ainda causar aumento na velocidade máxima, com o tempo, verificou-se acentuado decréscimo na intensidade de absorção.

4.3 - Concentração dos carregadores

Uma estimativa da contribuição de cada um dos carregadores para a absorção em altas e baixas concentrações de fósforo, pode ser feita com base no procedimento de HAGEN e HOPKINS (1955), FRIED e NOGGLE (1958) e NOGGLE e FRIED (1960). Segundo os últimos autores, grande parte da absorção que é expressa pela linha \underline{b} dos gráficos das Figuras 3 e 4, é devida à menor concentração de P_{ext} ($1 \times 10^{-6} M$). Colocando-se em gráfico a quantidade de fósforo absorvida versus o tempo de reação, obtém-se linhas que cortam o eixo das ordenadas em determinados pontos. Para os valores correspondentes a $P_{ext} = 1 \times 10^{-6} M$, a intersecção corresponde ao valor aproximado da concentração do complexo carregador-íônio para o "lugar \underline{b} " ($R_b P$); a inclinação da reta dividida por este valor estima a constante de decomposição k_{3b} para bai

nas concentrações (Figura 5). O valor de ΣR_b é dado pela fórmula

$$V_m = k_3 (\Sigma R) + (\Sigma R) \quad (3)$$

Os valores de absorção verificados para a concentração mais alta de P_{ext} , ($5 \times 10^{-4} M$), podem ser considerados como a soma da ação dos dois carregadores. No gráfico, o cruzamento da linha correspondente com a ordenada indica a quantidade de fósforo associado a ambos os carregadores. Como nesta concentração todo o lugar b deve estar saturado, o valor de $R_a P$ será a diferença entre ΣR_b e o ponto de intersecção. O valor de k_{3a} pode ser obtido da equação

$$v = \left[(R_a P)k_{3a} + (\Sigma R_b)k_{3b} \right] t + (R_a P) + (\Sigma R_b) \quad (4)$$

onde v é o valor observado no tempo t . Calculado k_{3a} , ΣR_a pode ser obtido substituindo-se os termos conhecidos na equação (3), como foi feito para ΣR_b .

Os valores calculados da forma descrita, para todos os níveis de magnésio, se encontram na Tabela V.

Observa-se que os valores de k_{3a} , respectivamente para $(Mg) = 0,0$ e $(Mg) = 1 \times 10^{-4} M$, e para $(Mg) = 1 \times 10^{-5} M$, $2 \times 10^{-5} M$ e $5 \times 10^{-5} M$, não diferem essencialmente entre si. Para os níveis extremos de magnésio, esses valores são surpreendentemente altos, quando comparados aos k_{3a} relativos a níveis intermediários. Considerando que nos níveis extremos de magnésio, a absorção de fósforo foi menor que nos medianos (Figura 2), pode-se concluir que em concentrações altas de P_{ext} o magnésio estimula a formação de RP, ou pelo menos permite que maior quantidade de carregador se combine com o aniônio. Em consequência, aparece aumentada a concentração de R_a total.

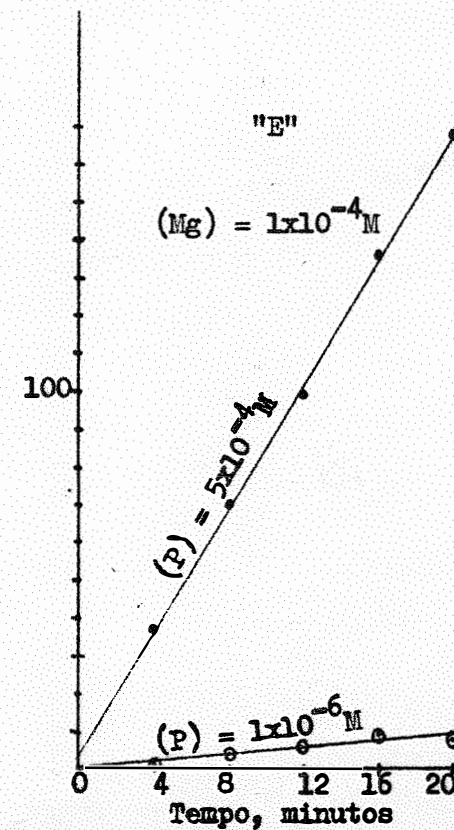
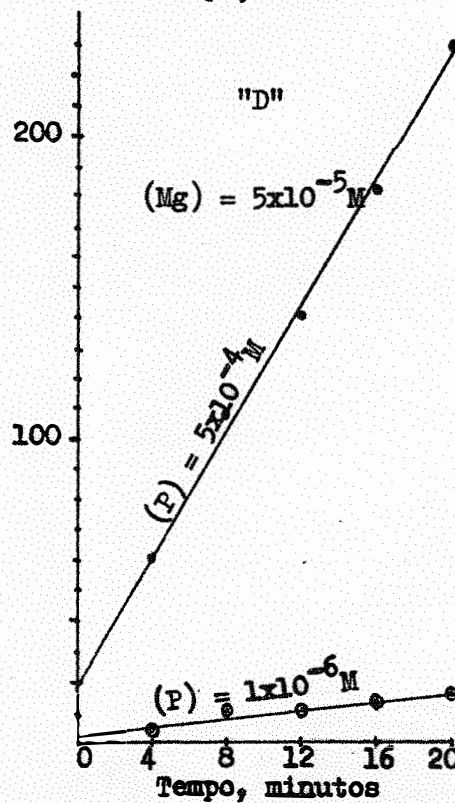
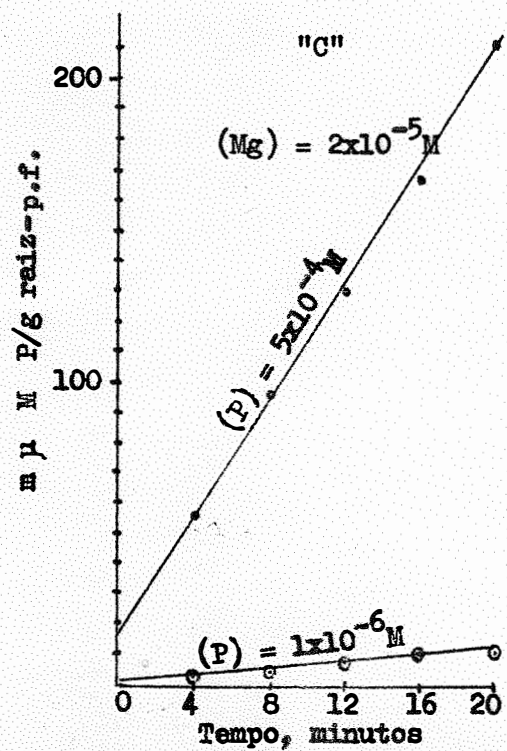
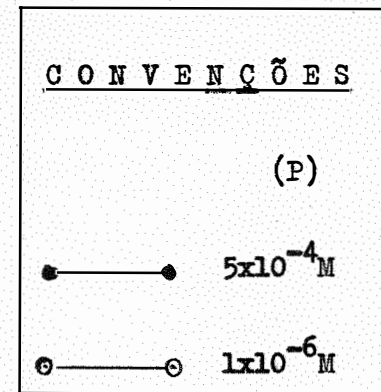
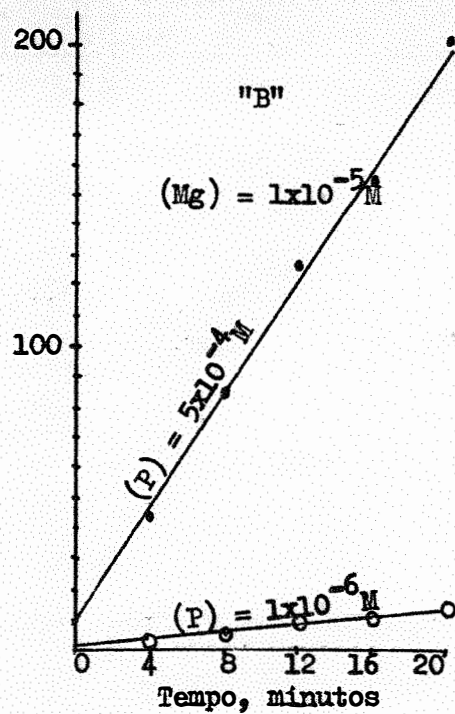
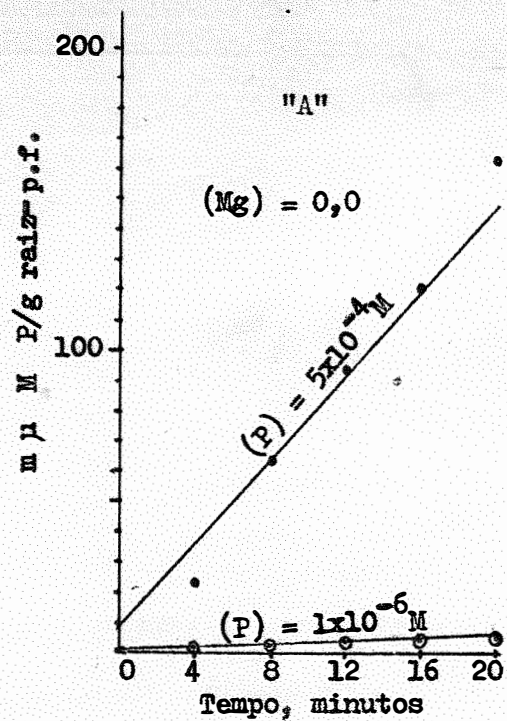


Figura 5 - Absorção de fósforo em raízes destacadas de cevada em função do tempo e da concentração externa de fósforo: A - Absorção em ausência de Mg; B - Absorção na presença de 1×10^{-5} M de Mg; C - Absorção na presença de 2×10^{-5} M de Mg; D - Absorção na presença de 5×10^{-5} M de Mg e E - Absorção na presença de 1×10^{-4} M de Mg.

Tabela V

Constantes de velocidade de decomposição e concentração dos carregadores envolvidos na absorção do fósforo, nos níveis de magnésio estudados.

| Níveis de Magnésio Moles/litro | Constantes de velocidade $\mu\text{moles P/moles RP/seg}$ | | Concentração dos carregadores Moles/g | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------|--------------|
| | k_{3a} | k_{3b} | ΣR_a | ΣR_b |
| 0,0 | 0,0480 | 0,0041 | 2,4 | 5,5 |
| 1×10^{-5} | 0,0210 | 0,0012 | 6,9 | 3,8 |
| 2×10^{-5} | 0,0095 | 0,0091 | 18,4 | 5,5 |
| 5×10^{-5} | 0,0110 | 0,0060 | 14,2 | 7,0 |
| 1×10^{-4} | 0,0660 | 0,0067 | 2,0 | 1,6 |

Os valores de ΣR_b para os três primeiros níveis de magnésio não diferem um de outro, o que era esperado. Já para o teor de magnésio igual a $5 \times 10^{-5} M$, ΣR_b apresenta-se um pouco elevado, afetado possivelmente pelo efeito favorável dessa concentração na absorção do fósforo. Para a concentração mais alta de magnésio, porém, a quantidade de R_b decresce de modo considerável, devido talvez ao fato de que o magnésio haja mascarado a função do carregador associado ao fósforo quando este se apresenta em baixas concentrações.

Com base nos resultados obtidos e discutidos acima, parece lícito concluir que, melhor do que os valores de K_m , a velocidade máxima e a concentração dos carregadores acompanham e refletem a influência da concentração externa de magnésio na absorção do fósforo pelas raízes destacadas de cevada.

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

No presente experimento procurou-se estudar a influência do magnésio na absorção do fósforo por raízes destacadas de cevada, e de terminar as constantes biológicas envolvidas nêsse processo. Para isso, foram usadas raízes de plântulas de cevada, com seis dias de idade, obtidas da maneira descrita por EPSTEIN e HAGEN (1952), com as adaptações que se fizeram necessárias. As raízes após colhidas e sêcas em papel de filtro, foram pesadas em porções de 0,5 grama, e colocadas na solução de trabalho.

Foram estudados os efeitos de cinco níveis de magnésio: (0,0, $1 \times 10^{-5} M$, $2 \times 10^{-5} M$, $5 \times 10^{-5} M$ e $1 \times 10^{-4} M$) e sete níveis de fósforo ($1 \times 10^{-6} M$, $5 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-5} M$, $3 \times 10^{-5} M$, $5 \times 10^{-5} M$, $1 \times 10^{-4} M$ e $5 \times 10^{-4} M$), combinados, em cinco tempos experimentais: 4, 8, 12, 16 e 20 minutos. O sal de magnésio empregado foi o cloreto de magnésio e o fósforo usado foi na forma de fosfato monobásico de sódio, marcado com P^{32} . Os ensaios foram conduzidos em valor pH 4,0. A absorção de fósforo foi medida contando-se, em Tubo Geiger-Muller, a atividade recuperada da amostra sêca sob lâmpada infra-vermelha.

Dos resultados obtidos chegou-se às seguintes conclusões:

- 1 - A absorção de fósforo cresceu com o tempo, seja na ausência ou na presença de diferentes concentrações de magnésio; essa absorção cresceu quando se aumentou a concentração externa de fósforo;
- 2 - A absorção de fósforo cresceu quando a concentração externa de magnésio aumentou até o nível $5 \times 10^{-5} M$. Entretanto, no nível $1 \times 10^{-4} M$ a absorção de fósforo foi sensivelmente prejudicada; êsse efeito prejudicial de altas concentrações do catiônio foi atenuado quando se elevou a concentração de fósforo;

- 3 - A análise da cinética de absorção de fósforo, realizada de acordo com HOFSTEE (1952), indica que dois "lugares" estão comprometidos na absorção do anônio: um "lugar" ligado a baixas concentrações de fósforo e o outro relacionado a altas concentrações;
- 4 - A concentração externa de magnésio parece não influir nos valores de K_m , mas tem efeito acentuado sobre a velocidade máxima de absorção, V_m ;
- 5 - Concentrações de magnésio da ordem de $1 \times 10^{-4} M$ ocasionaram diminuição no valor de V_m ;
- 6 - Os valores da constante de decomposição do complexo carregador-fósforo (RP), ou seja, k_3 , obtidos para as concentrações intermediárias de magnésio ($1 \times 10^{-5} M$, $2 \times 10^{-5} M$ e $5 \times 10^{-5} M$), não diferem essencialmente entre si e são menores que os valores de k_{3a} obtidos para os níveis extremos;
- 7 - Calculando-se a concentração dos carregadores observou-se que, em baixas concentrações de fósforo, a quantidade total de carregador associado à absorção de fósforo não é muito diferente nos distintos níveis de magnésio, muito embora tenha sido maior quando o nível de magnésio foi ótimo ($5 \times 10^{-5} M$) e muito menor em alta concentração do catiônio.
- 8 - Para altas concentrações de fósforo os níveis medianos de magnésio permitiram uma melhor expressão da função do carregador;
- 9 - Das constantes biológicas estudadas, a velocidade máxima e a concentração dos carregadores foram as que melhor refletiram a influência da concentração externa de magnésio sobre a absorção de fósforo pelas raízes destacadas de cevada.

6 - SUMMARY

The experiment described herein was carried out in order to study the biological constants of the absorption of phosphorus influenced by external magnesium by excised roots of barley. Five different levels of magnesium chloride ($0,0$, $1 \times 10^{-5}M$, $2 \times 10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$ and $1 \times 10^{-4}M$) and seven different levels of phosphorus ($1 \times 10^{-6}M$, $5 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-5}M$, $3 \times 10^{-5}M$, $5 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-4}M$ and $5 \times 10^{-4}M$) labelled with P^{32} , were combined in five different experimental time periods: 4 , 8 , 12 , 16 and 20 minutes.

From the results obtained the following conclusions can be drawn:

- 1 - Phosphate absorption increases when the external concentrations of magnesium increase to the $5 \times 10^{-5}M$ level. After that point the phosphate absorption levels off;
- 2 - There are two sites of phosphate absorption in the barley roots, one that predominates at higher phosphorus concentrations and the other that predominates at lower phosphate concentrations;
- 3 - The external magnesium concentration has a great effect on the V_m value, although $1 \times 10^{-4}M$ level decreases that value;
- 4 - The magnesium concentrations of $1 \times 10^{-5}M$, $2 \times 10^{-5}M$ and $5 \times 10^{-5}M$ gave values of the velocity constant of the breakdown of the phosphate-carrier complex (RP) , i. e. , k_3 , which did not differ among them, but are lower than those values of k_{3a} obtained with the limiting levels of magnesium;

- 5 - The total amount of the carrier associated with phosphorus at lower external concentrations is about the same in the various levels of magnesium. That amount was higher at the $5 \times 10^{-5} \text{M}$ magnesium and lower when the cation concentration was higher. On the other hand, when higher concentrations of phosphate were used, the intermediate levels of magnesium gave a better visualization of the function of the carrier;
- 6 - Better than the K_m value, the values of the biological constants, V_m and $[\Sigma R]$ express the influence of the external concentration of magnesium on the absorption of phosphate by excised barley roots.

7 - LITERATURA CITADA

- BEESON, K. C. - 1946 - The Effect of Mineral Supply on Mineral Concentration and Nutritional Quality of Plants. Bot. Rev. 12: 424-455 .
- BEESON, K. C. , C. B. LYON e M. W. BARRANTINE - 1944 - Ionic Absorption by Tomato Plants as Correlated with Variations in the Composition of the Nutrient Medium. Plant Physiol. 19: 258-277 .
- BRIERLEY, G. P. - 1963 - Ion Accumulation in Heart Mitochondria, in Energy Linked Functions of Mitochondria. First Colloquium of The Johnson Research Foundation. Ed. B. Chance, Academic Press. N. Y. p. 237-245 .
- COOPER, H. P. - 1950 - Effects of Energy Properties of Some Plant Nutrients on Availability, on Rate of Absorption, and on Intensity of Certain Oxidation-reduction Reactions. Soil Sci. 69: 7-39 .
- COOPER, H. , W. PADEN e W. GARMAN - 1949 - Magnesium in Soil and Plants. Soil Sci. 63: 27-41 .
- CROCCMO, O. J. - 1964 - Sobre a Absorção de Fósforo pelas Raízes das Plantas. E. S. A. "Luiz de Queiroz" , Universidade de São Paulo (mimeografado) 13 p.
- CROCCMO, O. J. e E. MALAVOLTA - 1964 - The Uptake of Radiophosphate by Barley Plants as Influenced by Magnesium. Anais E. S. A. "Luiz de Queiroz" , Piracicaba , 21: 43-49 .
- CROCCMO, O. J. , A. M. L. NEPTUNE e H. REYES-ZUMETA - 1965 - Absorción de Iones por las Plantas. Universidad del Zulia , Maracaibo. 187 p.

- DIXON, M. e E. C. WEBB - 1964 - Enzymes. 2.^a ed. Academic Press ,
N. Y. 950 p.
- EPSTEIN, E. - 1956 - Mineral Nutrition of Plants: Mechanism of Uptake
and Transport. Ann. Rev. Plant Physiol. 7: 1-24 .
- EPSTEIN, E. e C. E. HAGEN - 1952 - A Kinetic Study of the Absorption
of Alkali Cations by Barley Roots. Plant Physiol. 27:
457-474 .
- FRIED, M. e J. C. NOGGLE - 1958 - Multiple Site Uptake of Individual
Cations by Roots as Affected by Hydrogen Ion. Plant Physiol
33: 139-144 .
- HAAG, H. P. e E. MALAVOLTA - 1960 - Estudos Sobre a Alimentação Mine-
ral do Cafeeiro. III - Efeitos das Deficiências dos Macro-
nutrientes no Crescimento e na Composição Química do Cafeeiro
(Coffea arabica L. , var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) ,
Cultivado em Solução Nutritiva. Rev. Café Port. , Lisboa.
Sep. 20 .
- HAGEN, C. E. e H. T. HOPKINS - 1955 - Ionic Species in Orthophosphate
Absorption by Barley Roots. Plant Physiol. 30: 193-199 .
- HAGEN, C. E. , J. E. LEGGETT e P. C. JACKSON - 1957 - The Sites of
Orthophosphate Uptake by Barley Roots. Proc. Nat. Acad. Sci.
U. S. A. 43: 496-506 .
- HOFSTEE, B. H. J. - 1952 - On the Evaluation of Constants V_m and K_m in
Enzyme Reaction. Science 116: 329-331 .
- JACOB, A. e H. Von VEXKULL - 1961 - Fertilizacion Internationale
Hardelmaartschappij voor Meststoffen, N. Y. , Amsterdam.
625 p.

- KRACKENBERGER, H. I. e J. PETERSON - 1954 - Influence of Environment on the Chemical Composition of Plants. Effect of Environment on the Magnesium Content of Plants. Southern Coop. Series Bull. U. S. D. A. 36 .
- LATIES, G. G. - 1959 - Active Transport of Salt Into Plant Tissue . Ann. Rev. Plant Physiol. 10: 87-112 .
- LEGGETT, J. L. , R. A. GALLOWAY e H. G. GAUCH - 1965 - Calcium Activation of Orthophosphate Absorption by Barley Roots. Plant Physiol. 40: x-xi supl.
- MAZELIS, M. e P. K. STUMPF - 1955 - Fat Metabolism in Higher Plants. VI. Incorporation of P^{32} into Mitochondrial Phospholipids. Plant Physiol. 30: 237-243 .
- MILLARD, Diane L. , J. T. WISKICH e R. N. ROBERTSON - 1964 - Ion Uptake by Plant Mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 52: 996-1004 .
- NOGGLE, J. C. e M. FRIED - 1960 - A Kinetic Analysis of Phosphate Absorption by Excised Roots of Millet , Barley and Alfalfa. Soil Sci. Soc. Proc. 24: 33-35 .
- ROBERTSON, R. N. - 1951 - Mechanism of Absorption and Transport of Inorganic Nutrients in Plants. Ann. Rev. Plant. Physiol. 2: 1-24 .
- SUTCLIFFE, J. F. - 1962 - Mineral Salt Absorption in Plants. Pergamon Press , London , 194 p.
- TRUOG, E. , R. J. GOATES , G. C. GERLOFF e K. C. BERGER - 1947 - Magnesium-phosphorus Relationships in Plant Nutrition. Soil Sci. 63: 19-25 .
- ZIMMERMAN, Miryam - 1947 - Magnesium in Plants. Soil Sci. 63: 1-12 .