

Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais

MARCO ANTONIO OLIVA^{1,2} e JOSÉ GUILHERME DE FIGUEIREDO¹

(recebido: 4 de março de 2004; aceito: 17 de fevereiro de 2005)

ABSTRACT – (Fluoride bioindicator grasses for tropical regions). Ten species of tropical grasses, *Andropogon gayanus* Kunth cv. Planaltina, *Panicum maximum* Jacq. cv. Colônia, *Panicum maximum* Jacq. cv. Tobiata, *Chloris gayana* Kunth, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, *Paspalum notatum* Flug. cv. Pensacola, *Hiparrhenia rufa* (Nees) Stapf., *Melinis minutiflora* Pal. de Beauv., *Brachiaria decumbens* Stapf., *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schw. and *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* var. *lema* were treated with simulated rain containing 5, 10, and 15 g.m⁻³ of fluoride, in order to evaluate their relative sensitivity and potential as bioindicator for fluoride under tropical conditions. The plants were cultivated according to standardized techniques for active bioindication. The development of visible damages, the accumulation and distribution of fluoride and the dry weight yield were used to assess the effects of the element on the plants. All studied species showed distinct pattern of fluoride accumulation, fluorine contents above the accepted toxic levels for sensitive species (30 µg.g⁻¹) and a good correlation between fluoride content and the phytotoxicity index, except for *Brachiaria humidicola*. *Chloris gayana* and *Panicum maximum* cv. Colônia were the species that better adapted to the standardized cultivation techniques, based on their growth rates, sprout homogeneity and fast appearance of visible symptoms (chlorosis and necrosis). Fluoride effects on stomatal conductance, CO₂ assimilation and dry weight yield were also evaluated in these two species, with potential for bioindication use. The results indicate *Panicum maximum* cv. Colônia as a responsive bioindicator while *Chloris gayana* as a tolerant species, similarly to *L. multiflorum*.

Key words - accumulation, chlorosis, fluoride, photosynthesis, responsive bioindicator, tolerance

RESUMO – (Gramíneas bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais). Dez espécies de gramíneas tropicais *Andropogon gayanus* Kunth cv. Planaltina, *Panicum maximum* Jacq. cv. Colônia, *Panicum maximum* Jacq. cv. Tobiata, *Chloris gayana* Kunth, *Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees, *Paspalum notatum* Flug. cv. Pensacola, *Hiparrhenia rufa* (Nees.) Stapf., *Melinis minutiflora* Pal. de Beauv., *Brachiaria decumbens* Stapf., *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schw. e *Lolium multiflorum* ssp. *italicum* var. *lema* foram tratadas com chuva simulada, contendo 5, 10 e 15 g.m⁻³ de flúor, visando avaliar a sensibilidade relativa e o potencial bioindicador de cada espécie para regiões tropicais. As plantas foram cultivadas sob técnicas padronizadas para a bioindicação ativa. Os efeitos do flúor foram avaliados pelos danos visuais, acúmulo e distribuição do flúor nas plantas e produção de matéria seca. Todas as espécies mostraram padrões de acúmulo diferenciados, teores acima do nível considerado tóxico para plantas sensíveis (30 µg.g⁻¹) e boa relação entre o teor de flúor na planta e os índices de fitotoxicidade, com exceção de *Brachiaria humidicola*. As espécies que melhor se adaptaram às técnicas de cultivo padronizado, por suas taxas de crescimento, homogeneidade das rebrotas e velocidade de resposta (necrose e clorose) foram *Chloris gayana* e *Panicum maximum* cv. Colônia. Nestas duas espécies com maior potencial de bioindicação, foram avaliados também os efeitos do flúor sobre a condutância estomática, a assimilação de CO₂ e a produção de matéria seca. Os resultados obtidos caracterizam o *Panicum maximum* cv. Colônia como bioindicador de resposta e *Chloris gayana* como espécie tolerante, semelhante a *L. multiflorum*.

Palavras-chave - acúmulo, bioindicador de resposta, clorose, fluoreto, fotossíntese, tolerância

Introdução

A degradação de diversas formações vegetais no entorno de alguns pólos industriais no Brasil encontra-se, significativamente, relacionada à presença de flúor na atmosfera ou no solo, em consequência da atividade de indústrias de fertilizantes fosfatados e de usinas de alumínio. Alguns dos efeitos sobre as espécies e a

vegetação tropical foram descritos por Weinstein & Hansen (1988), Alves & Oliva (1993), Klumpp *et al.* (1994), Arndt *et al.* (1995), Klumpp *et al.* (1996 a, b, c), Oliva *et al.* (1997), Domingos *et al.* (1998), Silva *et al.* (2000) e Domingos *et al.* (2004). O monitoramento das emissões de flúor, quando existente, emprega métodos físico-químicos de alto custo e de difícil aplicação, ou biológicos que, em muitos casos, se reduzem a meras observações de injúrias em plantas ou animais. O uso de organismos indicadores, como abordagem alternativa e/ou complementar em programas de monitoramento de poluição ambiental, permite uma interpretação melhor das relações ecológicas envolvidas. Para isso, um pré-

1. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Vegetal, 36571-000 Viçosa, MG, Brasil.
2. Autor para correspondência: moliva@ufv.br

requisito essencial é que as espécies a serem empregadas como indicadores ativos ou passivos sejam de ampla distribuição regional e de sensibilidade diferenciada ao poluente (Arndt & Schweizer 1991).

Em diversos países, tem sido empregada uma metodologia padronizada que utiliza *Lolium multiflorum* ssp. *italicum*, espécie de gramínea acumuladora de flúor (Ruthsatz & Wey 1991) no monitoramento de áreas poluídas com esse ânion (VDI-Richtlinie 1982). Entretanto, Ellenberg (1991) questiona a universalidade do seu uso, uma vez que condições ambientais locais podem alterar as propriedades ecofisiológicas de *L. multiflorum* e mascarar a sintomatologia específica ao flúor, e sugere o emprego de espécies da flora local. Há, portanto, a necessidade de se conhecer a sensibilidade ao flúor de diversas espécies de gramíneas nativas ou adaptadas a regiões tropicais. Suas possibilidades de serem utilizadas como indicadores de reação, biosensores, biomarcadores, bioacumuladores ou biointegradores (Temmerman *et al.* 2004) dependerá da capacidade de adaptação às técnicas de cultivo padronizado, da especificidade das respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares ao poluente, bem como de seus mecanismos de resistência. Nesses termos, a ampla distribuição geográfica de diversas espécies de gramíneas nas regiões tropical e subtropical e as altas taxas de crescimento da maioria delas sugerem a possibilidade do seu emprego como indicadoras da presença de flúor.

Nesse contexto, procurou-se avaliar o potencial indicativo da presença de fluoreto em 10 espécies de gramíneas forrageiras de ampla distribuição geográfica na região tropical, de acordo com suas sensibilidades ao poluente, suas possibilidades de cultivo e facilidade de avaliação em uma bioindicação ativa.

Material e métodos

Plantas de gramíneas forrageiras tropicais, *Andropogon gayanus* Kunth cv. Planaltina (capim gambá), *Panicum maximum* Jacq. cv. Colômbio, *Panicum maximum* Jacq. cv. Tobiata, *Chloris gayana* Kunth (capim-rhodes), *Eragrostis curvula* (Schrud.) Nees (capim-chorão), *Paspalum notatum* Flug. cv. Pensacola, *Hyparrhenia rufa* (Nees.) Stapf. (capim-jaragua), *Melinis minutiflora* Pal. de Beauv. (capim-gordura), *Brachiaria decumbens* Stapf. e *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schw. foram cultivadas seguindo o protocolo descrito pela VDI-Richtlinie 3792 (1982) para *Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum* var. *lema* (azevém), espécie empregada como referência no monitoramento de flúor. Modificações do protocolo foram feitas no substrato e na aplicação do flúor na forma de chuva simulada. As sementes

de *Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum* var. *lema* eram provenientes do Institut für Pflanzenökologie da Justus-Liebig Universität, Giessen, Alemanha.

O substrato foi adaptado, isto é, corrigido e fertilizado para as condições de cultivo de gramíneas forrageiras tropicais. Em todos os ensaios, utilizou-se como padrão um Latossolo Vermelho-Amarelo (LV), coletado do horizonte C na região de Viçosa-MG, misturado com areia lavada em uma razão 3:1. Para correção do pH do solo foi utilizado calcário dolomítico, PRNT = 80% em quantidade equivalente a 3,8 t.ha⁻¹. Todas as espécies receberam adubação inicial com superfosfato simples, cloreto de potássio e esterco de gado, em quantidades equivalentes a 60 kg. ha⁻¹ de P₂O₅, 30 kg.ha⁻¹ de K₂O e 60 t.ha⁻¹, respectivamente (tabela 1). Após cada corte e o desbaste definitivo, cada espécie recebeu uma adubação de cobertura adicional com solução de Hoagland, na base de 50 ml.vaso⁻¹. Exceções foram as espécies *P. notatum* e *B. humidicola* que receberam duas adubações a mais, devido a seu prolongado tempo de cultivo.

Cada gramínea foi semeada em vasos plásticos contendo 0,0018 m³ de substrato e mantida em casa de vegetação. Assim que as plântulas atingiram cerca de 20 a 30 mm de altura, foi realizado um desbaste para deixar um número definido de

Tabela 1. Características físicas e químicas do substrato (Latosolo vermelho) utilizado no cultivo das gramíneas após adubação.

Table 1. Physical and chemical characteristics of the Red-yellow Latosol used to cultivate the grass species, after fertilization.

Características químicas	
pH in H ₂ O (1:2,5)	5,7
Al ³⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,0
H + Al (cmol _c .dm ⁻³)	2,4
Ca ²⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	2,8
Mg ²⁺ (cmol _c .dm ⁻³)	0,3
P (mg.dm ⁻³)	0,3
K (mg.dm ⁻³)	16,9
SB	238
CEC – pH 7	3,74
V (%)	60,9
Organic carbon (g.hg ⁻¹)	-
Características físicas	
Coarse sand (g.hg ⁻¹)	50
Fine sand (g.hg ⁻¹)	3
Silt (g.hg ⁻¹)	10
Clay (g.hg ⁻¹)	37
Soil texture	Sandy - clay
Particle density (g.cm ⁻³)	2,58
Bulk density (g.hg ⁻¹)	1,15

plantas de cada espécie por vaso. Com a finalidade de padronizar os cultivos em cada unidade experimental e antes que as plantas fossem expostas ao fluoreto, todas as espécies sofreram um corte aproximadamente aos 27 e outro aos 43 dias após a emergência quando atingiam, em média, 250 mm de altura. O tempo total de cultivo, da sementeira ao início dos tratamentos, variou entre as espécies de seis a oito semanas, tempo suficiente para se obter rebrotas vigorosas. As adaptações das espécies às técnicas de cultivo a ser aplicado em bioindicação ativa foi avaliada pela determinação do crescimento inicial W_i , o crescimento das rebrotas W_{reb} e o crescimento total. O crescimento inicial, W_i corresponde à produção da matéria seca colhida de cada espécie no momento do primeiro corte, o crescimento das rebrotas W_{reb} corresponde ao material vegetal colhido acima do nível do corte em cada rebrota e o crescimento total corresponde à soma dos crescimentos ($W_t = W_i + W_{reb_1} + W_{reb_2} + \dots + W_{reb_n}$.)

As plantas de todas as espécies foram expostas a quatro doses de flúor (0, 5, 10 e 15 $g \cdot m^{-3}$) aplicadas na forma de chuva simulada de fluoreto de potássio, em um sistema adaptado por Alves *et al.* (1990). As simulações de chuva foram realizadas diariamente, com duração de 15 minutos, por um período de 20 dias. A frequência e a intensidade dessas simulações resultaram em uma precipitação total de 300 mm. Antes e depois da exposição, as plantas ficaram expostas durante 15 minutos a uma irradiância de 14,7 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ e temperatura média de $26 \pm 2^\circ C$.

No fim de cada tratamento foi realizada uma avaliação visual do grau de injúria causado pelo F^- e determinado o índice de fitotoxicidade a partir de uma média de três plantas de cada espécie, de acordo com a seguinte escala de pontuação: 0 = planta sem injúria, 1 = início de clorose, 2 = clorose generalizada, 3 = início de necrose e 4 = clorose e necrose mais acentuada (Bustamante *et al.* 1993).

O material vegetal foi dividido em parte aérea (PA) (rebrota e soca) e sistema radicular (SR) sendo considerado rebrota o material vegetal colhido acima da altura de corte (50 mm sobre o solo) e soca, o caule (rizoma) mais a parte aérea remanescente após o corte. Amostras de cada uma das quatro repetições foram lavadas com água deionizada, secas a $70^\circ C$, reduzidas, em moedor do tipo Wiley, a partículas com dimensões inferiores a 1 mm e alíquotas de 0,5 g foram submetidas a lixiviação durante 16 horas em ácido perclórico 0,1 M. O teor de fluoreto foi determinado no extrato resultante da lixiviação utilizando-se um eletrodo íon-específico (Orion 94-09), após ajuste da força iônica da solução e descomplexação do fluoreto (García-Ciudad *et al.* 1985).

Após as avaliações de crescimento, da injúria e do acúmulo de F^- no material vegetal, foram escolhidas as duas espécies que melhor se adaptaram tanto às condições de cultivo para bioindicação, quanto ao grau de sensibilidade relativa ao F^- . Juntamente com *L. multiflorum*, mantida como espécie de referência, foram selecionadas *P. maximum* cv. Colômbia e *C. gayana*. As trocas gasosas foram avaliadas nas três espécies no segmento mediano de folhas jovens

totalmente desenvolvidas mediante o emprego de um analisador de gases por infravermelho (LCA-4, Analytical Development Co, Hoddesdon, UK), entre 8:00 e 10:00 h, em sala climatizada ($22^\circ C$) sob irradiância de $1000 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. A partir dos resultados, foram calculadas as taxas de fotossíntese líquida (A) e a condutância estomática ao vapor de água (g_s).

O delineamento experimental para todos os ensaios foi inteiramente casualizado com quatro repetições sendo que as médias foram submetidas ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade, para comparação.

Resultados

Os valores de W_i , W_{reb} e W_t mostraram a capacidade de adaptação de cada espécie às técnicas de cultivo adotadas. As espécies *P. maximum* cv. Colômbia, *P. maximum* cv. Tobiata e *C. gayana* mostraram-se promissoras para bioindicação, em função dos altos valores de W_i e W_t (tabela 2). Já as plantas de *A. gayanus* e *B. decumbens* apresentaram germinação lenta e heterogênea, crescimento em altura e produção de matéria seca irregular (CV = 37% e 14%, respectivamente) e valores de W_i e W_t menores. Plantas de *H. rufa* também apresentaram crescimento inicial lento, porém, com rebrotas rápidas, resultando em plantas uniformes e vigorosas. As espécies de *P. notatum* e *B. humidicola* que apresentaram a menor e maior produção de matéria seca inicial, 0,21 e 2,48 $g \cdot vaso^{-1}$, respectivamente, não se adaptaram ao manejo devido ao lento crescimento da rebrota, permitindo apenas um corte durante todo o período de cultivo. Finalmente, *L. multiflorum* mostrou um alto valor de W_i e W_{reb} no início, porém, após o segundo corte, apresentou significativo decréscimo na sua capacidade de rebrota (tabela 2).

Uma vez expostas ao F^- , as gramíneas mostraram ampla variação na capacidade de acumular o poluente (figura 1). Em todas as espécies, os incrementos de F^- foram significativamente maiores na parte aérea das plantas, especialmente na rebrota, com exceção de *B. humidicola* e *H. rufa*, que acumularam mais F^- na soca (figura 2). *Brachiaria humidicola* e *E. curvula* foram as espécies com menor (19,8 $\mu g \cdot g^{-1}$ MS) e maior (201,1 $\mu g \cdot g^{-1}$ MS) conteúdo de F^- , respectivamente. *Lolium multiflorum*, considerada uma espécie resistente e acumuladora, foi tomada como referência e, a partir dela, foi avaliada a capacidade de acumular flúor das outras gramíneas quando submetidas à dose de $15 g \cdot m^{-3}$. Em geral, as espécies testadas se localizaram numa faixa intermediária junto com *L. multiflorum* e com uma certa tolerância à presença do flúor nos seus tecidos. Das

Tabela 2. Comparação dos valores médios dos dias após a emergência (DAE) até o primeiro corte, produção de matéria seca inicial (Wi), produção da primeira rebrota (Wreb), altura das plantas no momento do segundo corte e produção total das gramíneas (Wt), cultivadas em Latossolo Vermelho-Amarelo (LV)

Table 2. Comparison of means of days after the emergence (DAE) until the first cutting, dry matter yield (Wi), yield of the first sprout (Wsp), height of the plants at the second cutting and total yield (Wt) of all species cultivated in Red-Yellow Latosol.

Espécies	DAE até o primeiro corte	Wi (g.vaso ⁻¹)	Wreb (g.vaso ⁻¹)	Altura média no segundo corte (mm)	Wt (g.vaso ⁻¹)	CV (%)
<i>A.gyanus</i>	21	0,76 ± 0,09	0,69 ± 0,04	160	1,47 ± 0,14	37
<i>B. decumbens</i>	26	0,42 ± 0,03	1,11 ± 0,05	130	1,53 ± 0,05	14
<i>B. humidicola</i>	78	2,48 ± 0,11	-	-	2,48 ± 0,11	18
<i>C.gayana</i>	29	1,18 ± 0,06	1,08 ± 0,07	180	2,26 ± 0,11	18
<i>E. curvula</i>	25	0,82 ± 0,03	1,33 ± 0,04	180	2,15 ± 0,05	9
<i>H. rufa</i>	38	0,69 ± 0,02	0,94 ± 0,03	180	1,63 ± 0,04	10
<i>L. multiflorum</i>	19	0,77 ± 0,03	0,48 ± 0,01	100	1,45 ± 0,10	28
<i>M. minutiflora</i>	32	1,16 ± 0,04	1,42 ± 0,04	170	2,58 ± 0,07	11
<i>P. maximum</i> cv. Colônia	28	1,58 ± 0,02	1,12 ± 0,07	150	2,70 ± 0,08	11
<i>P. maximum</i> cv. Tobiata	27	0,78 ± 0,03	1,36 ± 0,04	200	2,14 ± 0,05	9
<i>P. notatum</i>	51	0,21 ± 0,02	-	-	0,21 ± 0,02	29

espécies tropicais estudadas, as variedades de *P. maximum* cv. Colônia e *P. maximum* cv. Tobiata acumularam altos teores de flúor, concomitantemente a um rápido desenvolvimento da sintomatologia, o que as caracteriza como espécies bioindicadoras de reação. O acúmulo do flúor, entretanto, mostrou características específicas. Enquanto a maioria das espécies acumulava flúor na rebrota, *B. humidicola* acumulava preferencialmente na soca e *L. multiflorum*, *C. gayana* e *H. rufa* mostraram um certo equilíbrio entre soca e rebrota (figura 2).

Na maioria das espécies, foi possível relacionar o grau de injúria, determinado mediante o índice de fitotoxicidade, com o acúmulo de F⁻ na rebrota (figura 3). Pela extensão dessas injúrias, destacam-se, *P. maximum* cv. Colônia e *P. notatum* que, junto com *M. minutiflora*, foram as primeiras a mostrarem os efeitos do F⁻ já no segundo dia após iniciados os tratamentos nas concentrações de 10 e 15 g.m⁻³. Plantas das espécies *P. maximum* cv. Tobiata, *B. decumbens* e *E. curvula* mostraram sintomatologia apenas no terceiro, quarto e oitavo dias, respectivamente, e *L. multiflorum*, *C. gayana*, *A. gyanus* e *H. rufa* não manifestaram qualquer dano visível. As injúrias foliares nas espécies afetadas foram semelhantes, iniciando-se como manchas cloróticas de forma e tamanhos irregulares que se concentraram nas margens e que evoluíram, rapidamente, para necrose apical. De uma clorose de cor verde opaco elas evoluíram para necrose

marrom-escura. As gramíneas mais sensíveis como *P. maximum* cv. Colônia, *P. notatum* e *P. maximum* cv. Tobiata apresentaram, no início das injúrias, manchas cloróticas de cor amarelo-opaca na nervura central, que necrosaram lentamente. Nas concentrações mais altas de F⁻, a injúria severa afetou a folha inteira e clorose e necroses tornaram-se generalizadas. Folhas recentemente expandidas como a segunda e terceira folhas a partir do ápice foram as mais sensíveis e as primeiras a mostrarem sintomas.

Os resultados mostrados anteriormente apontam duas espécies que poderiam ser empregadas em bioindicação ativa: *P. maximum* cv. Colônia e *C. gayana*. A primeira destacou-se pelo rápido e significativo crescimento da rebrota, alto acúmulo de F⁻ e sensibilidade ao poluente com inequívoca formação de injúria. A segunda poderia ser caracterizada como resistente, apresentando menor acúmulo de F⁻ e ausência de injúrias aparentes. Mantendo-se *L. multiflorum* ssp. *italicum* como espécie de referência, foram avaliados em conjunto os efeitos de concentrações crescentes de F⁻ sobre a condutância estomática (g_s), a fotossíntese (A) e a produção de matéria seca. O efeito de diversas concentrações de F⁻ na chuva simulada causou um decréscimo significativo (p < 1%) de g_s, apenas em *P. maximum* cv. Colônia. Ao contrário do observado para essa espécie, em *L. multiflorum* e *C. gayana* houve uma leve tendência de aumento dos valores de g_s, o que pode indicar uma leve perda do controle da

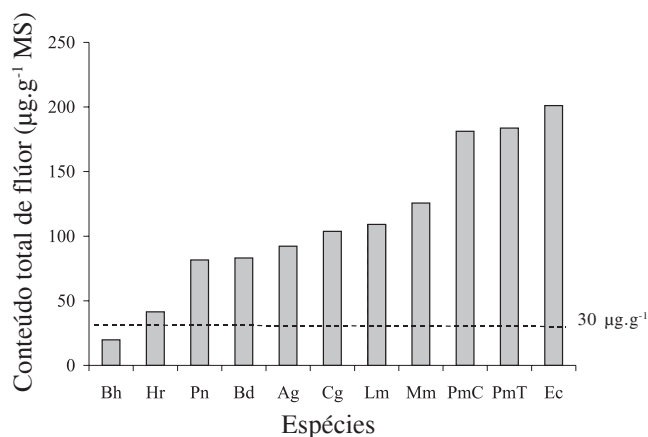


Figura 1. Conteúdo total de F⁻ na matéria seca das rebrotas em espécies de gramíneas submetidas a chuvas simuladas com uma solução de 15 g F⁻.m⁻³ durante 20 dias. Bh = *B. humidicola*, Hr = *H. rufa*, Pn = *P. notatum*, Bd = *B. decumbens*, Ag = *A. gayanus*, Cg = *C. gayana*, Lm = *L. multiflorum*, Mm = *M. minutiflora*, PmC = *P. maximum* cv. Colônião, PmT = *P. maximum* cv. Tobiatã, Ec = *E. curvula*

Figure 1. F⁻ total content on sprout dry matter of the grass species submitted to simulated rain, during 20 days, containing fluoride at 15 g F⁻.m⁻³. Bh = *B. humidicola*, Hr = *H. rufa*, Pn = *P. notatum*, Bd = *B. decumbens*, Ag = *A. gayanus*, Cg = *C. gayana*, Lm = *L. multiflorum*, Mm = *M. minutiflora*, PmC = *P. maximum* cv. Colônião, PmT = *P. maximum* cv. Tobiatã, Ec = *E. curvula*

planta sobre os mecanismos de fechamento estomático e, conseqüentemente, sobre as trocas gasosas (figura 4). De fato, a diminuição de g_s causou em *P. maximum* cv. Colônião uma queda significativa ($p < 1\%$) dos valores de A e em *C. gayana* o aumento de g_s induziu incremento das taxas fotossintéticas (figura 5). A diminuição de g_s e de A em *P. maximum* cv. Colônião causou uma progressiva queda na produção de matéria seca. Em *C. gayana* foi encontrada uma relação significativa ($p < 1\%$) entre g_s e A, mas seus efeitos sobre o acúmulo de matéria seca mostraram tendências contraditórias. As plantas de *L. multiflorum* não acusaram qualquer efeito do F⁻ sobre a assimilação de CO₂ em geral (figura 6).

Discussão

A bioindicação ativa é realizada por plantas de espécies com sensibilidade conhecida que, introduzidas numa área impactada, apresentam inequívocas respostas a um determinado poluente ou a um conjunto deles. Tal

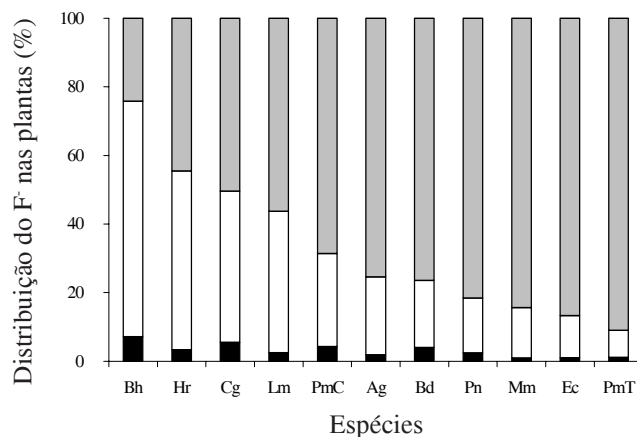


Figura 2. Distribuição relativa de F⁻ na matéria seca das espécies de gramíneas submetidas a chuvas simuladas com uma solução de 15 g F⁻.m⁻³ durante 20 dias. Bh = *B. humidicola*, Hr = *H. rufa*, Pn = *P. notatum*, Bd = *B. decumbens*, Ag = *A. gayanus*, Cg = *C. gayana*, Lm = *L. multiflorum*, Mm = *M. minutiflora*, PmC = *P. maximum* cv. Colônião, PmT = *P. maximum* cv. Tobiatã, Ec = *E. curvula*. ■ = F⁻ raiz, □ = F⁻ soca, ■ = F⁻ rebrota.

Figure 2. Relative distribution of F⁻ on dry matter of the grass species submitted to simulated rain, during 20 days, containing fluoride at 15 g F⁻.m⁻³. Bh = *B. humidicola*, Hr = *H. rufa*, Pn = *P. notatum*, Bd = *B. decumbens*, Ag = *A. gayanus*, Cg = *C. gayana*, Lm = *L. multiflorum*, Mm = *M. minutiflora*, PmC = *P. maximum* cv. Colônião, PmT = *P. maximum* cv. Tobiatã, Ec = *E. curvula*. ■ = F⁻ roots, □ = F⁻ stubble, ■ = F⁻ sprout.

metodologia requer um conhecimento prévio das taxas de crescimento da espécie, homogeneidade genética, sintomatologia e sensibilidade ao poluente avaliada por respostas anatomo-morfológicas, fisiológicas ou bioquímicas específicas, facilmente mensuráveis. No caso específico de F⁻, um dos métodos protocolados e amplamente aceito recomenda o uso de *L. multiflorum* ssp. *italicum* var. *lema* cultivado em pequeno volume de substrato comercial e com capacidade de responder ao poluente em curto prazo. Foram testadas diversas espécies de gramíneas com rápido crescimento e ampla distribuição em regiões tropicais com o intuito de serem introduzidas como bioindicadores em regiões impactadas por emissões de flúor. Para otimizar o crescimento das plantas, no lugar de um substrato comercial (VDI-Richtlinie 3792, 1982), foi empregado um Lato-solo Vermelho, freqüente na região do Cerrado, corrigido e adubado de acordo com as especificações de cultivo para gramíneas forrageiras. Os resultados apresentados permitem ampliar as opções de espécies bioindicadoras da presença de flúor em regiões tropicais e o potencial

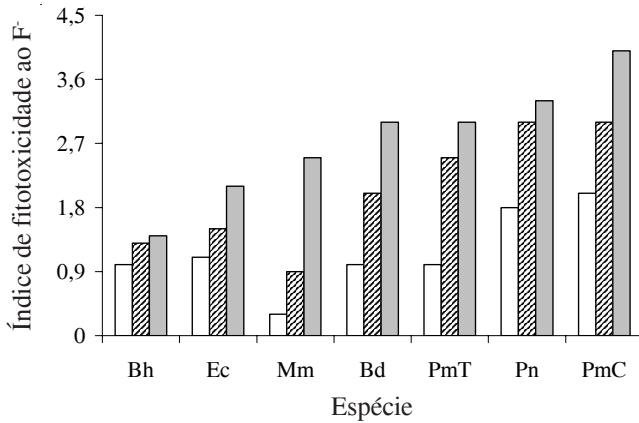


Figura 3. Evolução das injúrias foliares em gramíneas induzidas por diversas concentrações de F⁻ (□ = 5, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) aplicadas mediante chuvas simuladas durante 20 dias. Bh = *B. humidicola*, Pn = *P. notatum*, Bd = *B. decumbens*, Mm = *M. minutiflora*, PmC = *P. maximum* cv. Colônia, PmT = *P. maximum* cv. Tobiã, Ec = *E. curvula*. As espécies omitidas não apresentaram injúria.

Figure 3. Grasses foliar damages progress induced by different F⁻ concentration (□ = 5, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) applied as simulated rain during 20 days. Bh = *B. humidicola*, Pn = *P. notatum*, Bd = *B. decumbens*, Mm = *M. minutiflora*, PmC = *P. maximum* cv. Colônia, PmT = *P. maximum* cv. Tobiã, Ec = *E. curvula*. The omitted species did not show signs of injuries.

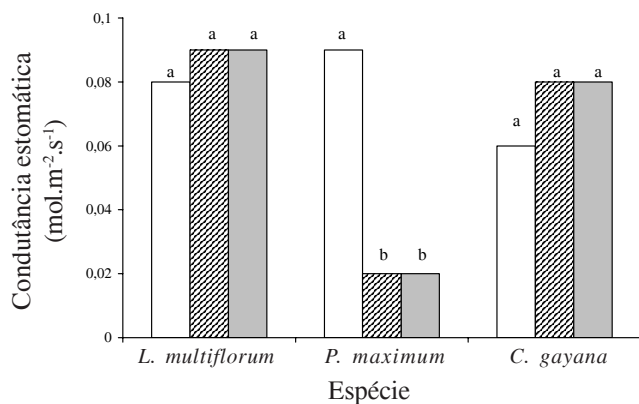


Figura 4. Efeito de diversas concentrações de F⁻ (□ = 0, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) aplicadas mediante chuvas simuladas durante 20 dias sobre a condutância estomática (g.) de *L. multiflorum* ssp. *italicum*, *P. maximum* cv. Colônia e *C. gayana*. Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a p < 0,05 (teste de Tukey) dentro das espécies.

Figure 4. Effect of different F⁻ concentrations (□ = 0, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) applied as simulated rain, during 20 days, on stomatal conductance (g.) of *L. multiflorum* ssp. *italicum*, *P. maximum* cv. Colônia and *C. gayana*. Bars followed by same letters does not differ statistically at p < 0,05 (Tukey's test) within the species.

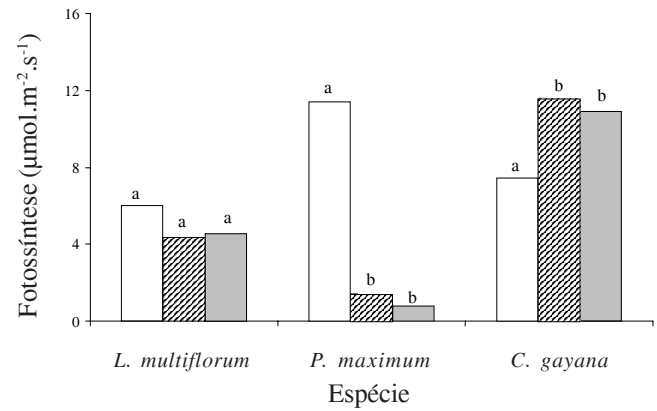


Figura 5. Efeito de diversas concentrações de F⁻ (□ = 0, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) aplicadas mediante chuvas simuladas durante 20 dias sobre a fotossíntese (A) de *L. multiflorum* ssp. *italicum*, *P. maximum* cv. Colônia e *C. gayana*. Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a p < 0,05 (teste de Tukey) dentro das espécies.

Figure 5. Effect of different F⁻ concentrations (□ = 0, ▨ = 10, ■ = 5 g.m⁻³) applied as simulated rain, during 20 days, on photosynthesis (A) of *L. multiflorum* ssp. *italicum*, *P. maximum* cv. Colônia and *C. gayana*. Bars followed by same letters does not differ statistically at p < 0,05 (Tukey's test) within the species.

dessas espécies para serem empregadas como biosensoras, bioacumuladoras ou biointegradoras (Temmerman *et al.* 2004). Quando comparada com as outras nove espécies, *L. multiflorum* ssp. *italicum* mostrou baixas taxas de crescimento e pouca capacidade de rebrota sob condições de alta temperatura, incidência de radiação e umidade relativa, o que poderia significar a falta de adaptação dessa espécie às condições tropicais (tabela 2). Quando todas as espécies e variedades foram expostas ao fluoreto, a maioria delas acumulou F⁻ no material vegetal em níveis muito superiores a 30 mg.g⁻¹ MS, considerado como padrão de referência para proteção de espécies sensíveis ao fluoreto em culturas padronizadas de *L. multiflorum* ssp. *italicum* (VDI-Richtlinie 2310, 1989). Apenas uma espécie, *B. humidicola*, não absorveu F⁻ em níveis considerados tóxicos. Vários estudos confirmam que não somente espécies, mas variedades, cultivares e indivíduos de uma mesma espécie apresentam diferenças marcantes quanto ao grau de susceptibilidade a F⁻, entretanto, não era esperado que gramíneas de regiões tropicais apresentassem tal capacidade de acúmulo.

Plantas de *C. gayana* apresentaram a mesma tolerância de *L. multiflorum* ssp. *italicum*, porém, com um crescimento da rebrota maior, o que favorece seu uso como planta indicadora por períodos maiores.

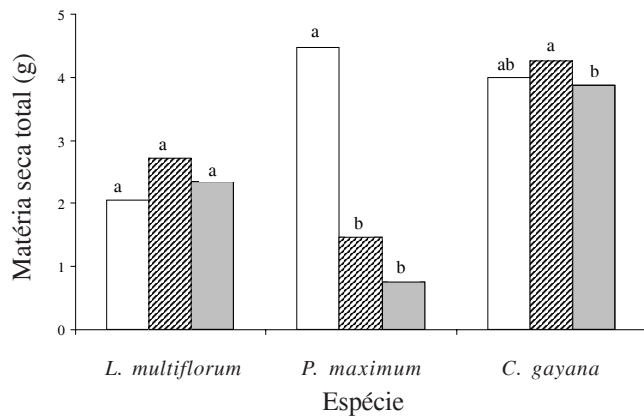


Figura 6. Efeito de diversas concentrações de F⁻ (□ = 0, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) aplicadas mediante chuvas simuladas durante 20 dias sobre a produção de matéria seca total de *L. multiflorum* ssp. *italicum*, *P. maximum* cv. Colonião e *C. gayana*. Colunas seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente a $p < 0,05$ (teste de Tukey) dentro das espécies.

Figure 6. Effect of different F⁻ concentrations (□ = 0, ▨ = 10, ■ = 15 g.m⁻³) applied as simulated rain, during 20 days, on total dry matter yield of *L. multiflorum* ssp. *italicum*, *P. maximum* cv. Colonião and *C. gayana*. Bars followed by same letters does not differ statistically at $p < 0,05$ (Tukey's test) within the species.

P. maximum cv. Colonião é uma planta típica de reação, altamente sensível e com excelentes sintomas para avaliação. Com ambas as espécies poderão ser estabelecidas relações razoavelmente seguras entre os níveis de contaminação com flúor no ambiente e a concentração do íon acumulado nas plantas.

O F⁻, fornecido às plantas mediante chuva simulada, atinge os espaços intercelulares através da cutícula e pode ser absorvido pelas células do mesofilo alcançando o simplasto, ou ser arrastado pela corrente transpiratória, via apoplasto, até as extremidades do xilema, onde é acumulado. Existem evidências de translocação de F⁻ tanto do caule quanto das raízes para as folhas, possivelmente, através de movimento passivo e com a corrente transpiratória (Treshow & Anderson 1991). O teor de F⁻ no sistema radicular de todas as espécies foi inexpressivo em relação à parte aérea, variando na faixa de 1 a 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (figura 2) sendo que, segundo Braen & Weinstein (1985), o solo normalmente não é uma fonte de níveis tóxicos de F⁻ para a maioria das plantas e os teores de F⁻ no sistema radicular ao redor de 2 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ são considerados comuns. A possibilidade de absorção de F⁻ pelas raízes parece menor em virtude da baixa retenção de F⁻ pelo substrato utilizado (de 0,18 a 0,69 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

O padrão de distribuição de fluoreto nas plantas da maioria das gramíneas sugere que ele se acumula em tecidos com maior atividade metabólica, ou seja, na rebrota. A penetração do ânion no apoplasto de tecidos jovens é facilitada pela menor quantidade de cutícula, cera epicuticular e pela presença relativamente grande de pectinas (Kannan 1986). O crescimento vegetativo vigoroso e as altas taxas de movimento de água favorecem o maior acúmulo de F⁻ nos ápices e nas margens das folhas terminais (Leece *et al.* 1982). A relação entre a dose de F⁻ aplicada à planta e seu acúmulo nos tecidos jovens da rebrota foi descrito por Brandt (1981).

A ocorrência de danos visuais, independente da espécie, aconteceu quase na sua totalidade nos tecidos da rebrota. Os efeitos sobre folhas em desenvolvimento devem-se provavelmente à ação do F⁻ nos estágios iniciais da síntese de porfirina e, por conseguinte, sobre a biossíntese de clorofila (VDI-Richtlinie 2310, 1989). As gramíneas mais sensíveis como *P. notatum*, *P. maximum* cv. Colonião e *P. maximum* cv. Tobiatã apresentaram clorose e necrose mesmo com teores tão baixos quanto 4,7, 13,8 e 27,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de F⁻. Diversos estudos sugerem que plantas sensíveis podem ser injuriadas quando a concentração foliar excede a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de F⁻ (Treshow & Anderson 1991). Logo, as espécies *P. maximum* cv. Colonião e *P. notatum* podem ser consideradas exceções. Verificou-se, ainda, que as espécies *P. maximum* cv. Colonião, *P. maximum* cv. Tobiatã e *E. curvula*, todas sensíveis, acumularam mais F⁻ na parte aérea que as gramíneas mais resistentes.

A injúria foliar é um critério amplamente usado para a caracterização de condições de intoxicação de plantas (Arndt *et al.* 1990). Espécies extremamente sensíveis como *Gladiolus gandavensis* L. cv. snow princess e *Tulipa gesneriana* L. cv. blue parrot são freqüentemente empregadas como plantas indicadoras em programas de monitoramento ativo de fluoreto atmosférico. No Brasil as espécies tropicais *Cordyline terminalis* e *Discorea* sp. (CETESB 1993a, b), *Hemerocallis* sp. (Klumpp *et al.* 1995), gramíneas tropicais (Oliva *et al.* 1997), *Gallesia gorazema*, *Genipa americana*, *Joannesia princeps*, *Peltophorum dubium* e *Spondias dulcis* (Silva *et al.* 2000) vêm sendo avaliadas e utilizadas com o mesmo propósito. É provável que a injúria foliar se encontre associada à alteração da matriz lipídica e sua relação com as proteínas solúveis da membrana, influenciando suas funções metabólicas, alterando a atividade de enzimas associadas, tais como as H⁺-ATPases (Giannini *et al.* 1987, Façanha & De Meis 1995). A inibição da atividade da H⁺-ATPase

conduz a alterações do transporte secundário de vários nutrientes e na perda de metabólitos através da membrana plasmática.

Das 10 espécies de gramíneas testadas, apenas *Panicum maximum* cv. Colonião e *Chloris gayana* mostraram-se promissoras como plantas bioindicadoras e eventualmente biosensoras. Elas mostraram altas taxas de crescimento homogêneo em pequeno volume de substrato (CV = 11% e 18%, respectivamente), homogeneidade genética, sensibilidade diferenciada ao flúor com efeitos (clorose e necrose) inequívocos e facilmente mensuráveis. As duas espécies mais promissoras, *P. maximum* e *C. gayana*, foram submetidas a diversas concentrações de F⁻ e seus efeitos, novamente confrontados com *L. multiflorum* ssp. *italicum*, medidos com metodologia não invasiva como porometria para assimilação de CO₂ e fluorescência da clorofila *a*.

Analisados os fatores que afetam a produção de matéria seca nas três espécies (figuras 4, 5, 6), ficou demonstrado que houve um efeito significativo das concentrações crescentes de F⁻ sobre a fotossíntese e produção de matéria seca apenas de *P. maximum* cv Colonião. Nesta espécie, os resultados mostraram uma clara relação entre o fechamento dos estômatos e a depressão na assimilação do CO₂, que, por sua vez, inibe a formação de matéria seca. Ballantyne & Glover (1981) relataram que o efeito acumulativo de flúor no material vegetal termina por inibir o crescimento da planta, principalmente, por um efeito sobre a fotossíntese e a produção de matéria seca. Entretanto, os resultados abriram possibilidades a outros questionamentos sobre os mecanismos que poderiam afetar a assimilação de CO₂ e em última instância a rebrota. Medidas *in vivo* da fluorescência da clorofila-*a* permitem avaliar a injúria causada pelo F⁻ nos fotossistemas e na cadeia de transporte de elétrons. Resultados não apresentados indicam que nos primeiros estádios da injúria é possível observar drásticas alterações na dissipação fotoquímica e não fotoquímica da energia na fase lenta da fluorescência, o que parece demonstrar que o fluoreto atua como desacoplador, acelerando o fluxo de elétrons pelo PS II (Boese *et al.* 1995). Depois das injúrias visíveis causadas pelo flúor, a diminuição do crescimento da rebrota é um dos parâmetros mais sensível que pode ser determinado em curto prazo de exposição das plantas ao poluente. Todas as espécies foram submetidas ao F⁻ após dois cortes das brotações, o que significa que uma terceira rebrota dependeria muito mais das taxas fotossintéticas do que da mobilização das reservas. Isto poderia explicar a melhor resposta ao F⁻ de *P. maximum*

cv. Colonião em comparação com *L. multiflorum* ssp. *italicum*, uma vez que a fotossíntese de *P. maximum* cv. Colonião foi a mais afetada.

Agradecimentos – Os autores agradecem o apoio financeiro prestado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo N° 522183/94), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, Processo N° 64.93.0061.00).

Referências bibliográficas

- ALVES, P.L.C.A. & OLIVA, M.A. 1993. Reações da soja à chuva ácida e solo contaminado. *Ambiente* 7:34-39.
- ALVES, P.L.C.A., OLIVA, M.A., CAMBRAIA, J., SANT'ANNA, R. 1990. Efeito da chuva ácida simulada e de um solo de Cubatão-SP sobre parâmetros relacionados com a fotossíntese e a transpiração de plantas de soja. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2:7-14.
- ARNDT, U. & SCHWEIZER, B. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. *In* Biological Monitoring. Signal from the environment (H. Ellemberg, ed.). Gate/GTZ, Braunschweig, p.199-260.
- ARNDT, U., BILLEN, N., SEUFERT, G., LUDWIG, W., BORKHART, K. & OHNESORGE, B. 1990. The Hohenheim long-term experiment visible injury responses. *Environmental Pollution* 68:355-366.
- ARNDT, U., FLORES, F. & WEINSTEIN, L.H. 1995. Fluoride effects on plants. Diagnosis of injury in the vegetation of Brazil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre
- BALLANTYNE, D.J. & GLOVER, B.L. 1981. Chloroplast electron transport, protein and RNA in fluoride-treated pea shoots. *Environment and Experimental Botany* 21:83-88.
- BOESE, S.R., MACLEAN, D.C. & EL-MOGAZI, D. 1995. Effects of fluoride on chlorophyll *a* fluorescence in spinach. *Environmental Pollution* 89:203-208.
- BRAEN, S.N. & WEINSTEIN, L.H. 1985. Uptake of fluoride and aluminum by plants grown in contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution* 24:215-223.
- BRANDT, C.J. 1981 Untersuchungen über Wirkungen von Fluorwasserstoff auf *Lolium multiflorum* und andere Nutzpflanzen. *LIS-Berichte* 14:1-140.
- BUSTAMANTE, M., OLIVA, M.A., SANT'ANNA, R. & LOPES, N.F. 1993. Sensibilidade da soja ao flúor. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5:151-157.
- CETESB. 1993a. Danos à vegetação por fluoretos gasosos em usinas de alumínio. Informe Técnico N° 001/93. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, São Paulo
- CETESB. 1993b. Diagnóstico de danos à vegetação por fluoretos gasosos em Cajati-SP. Informe Técnico 003/93. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, São Paulo.

- DOMINGOS, M., KLUMPP, A. & KLUMPP, G. 1998. Air pollution impact on the Atlantic forest in the Cubatão region, SP, Brazil. *Ciência e Cultura* 50:230-236.
- DOMINGOS, M., ALVES, E.S., BULBOVAS, P., CUNHA, A.L., LONGUI, E.L., LOURENÇON, D.A.C.B., MORAES, R.M., RINALDI, M.C.S. & MAZZONI-VIVEIROS, S.C. 2004. Reaction of *Caesalpinia echinata* Lam., a Brazilian tree species, to urban air pollution stress. *In* Urban air pollution, bioindication and environmental awareness (A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp, eds.). Cuvillier Verlag, Göttingen, p. 279-287.
- ELLENBERG, H. 1991. Bioindicator and biological monitoring. *In* Biological monitoring. Signal from the environment. Gate/GTZ, Braunschweig, p.13-74
- FAÇANHA, A.R. & DE MEIS, L. 1995. Inhibition of maize root H⁺-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. *Plant Physiology* 108:241-246,
- GARCIA-CIUDAD, A., GARCIA-CAIADO, B. & PONTON-SAN EMETERIO, C. 1985. Determination of fluoride in plant samples by a potentiometric method and near-infrared reflectance spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analyze* 16:1107-1122.
- GIANNINI, J.L., PUSHNIK, J.C., BRISKIN, D.P. & MILLER, G.W. 1987. Fluoride effects on the plasma membrane ATPase of sugar beet. *Plant Science* 53:39-44.
- KANNAN, S. 1986. Physiology of foliar uptake of inorganic nutrients. *Proceeding of the Indian Academy Science* 96:457-70.
- KLUMPP, A., KLUMPP, G. & DOMINGOS, M. 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85:109-116.
- KLUMPP, G., KLUMPP, A., DOMINGOS, M. & GUDERIAN, R. 1995. *Hemerocallis* as bioindicator of fluoride pollution in tropical countries. *Environmental Monitoring and Assessment* 35:27-42.
- KLUMPP, A., DOMINGOS, M. & KLUMPP, G. 1996a. Assessment of the vegetation risk by fluoride emissions from fertiliser industries at Cubatão, Brazil. *The Science of the Total Environment* 192:219-228.
- KLUMPP, A., KLUMPP, G. & DOMINGOS, M. 1996b. Bioindication of air pollution in the tropics. *Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft* 56:27-31.
- KLUMPP, A., KLUMPP, G., DOMINGOS, M. & SILVA, M.D. 1996c. Fluoride impact on native tree species of the atlantic forest near Cubatão, Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution* 87:57-71.
- LEECE, D.R., SCHECTEMA, J.H. & WEIR, R.G. 1982. The use of leaf analysis to diagnose fluoride toxicity in grapes. *In* Fluoride emissions (F. Murray, ed.). Academic Press, New York, p.101-24.
- OLIVA, M.A. FIGUEIREDO, J.G. & SOUZA, M.M. 1997. Bioindicação do flúor mediante gramíneas tropicais. *In* Indicadores ambientais (H.L. Matos & N.B. Maia, coord.). DCA-PUC, Sorocaba, p.191-204.
- RUTHSATZ, B. & WEY, H. 1991. Concept for a biological monitoring study. *In* Biological monitoring. Signal from the environment. Gate/GTZ ed., Braunschweig, p. 75-128.
- SILVA, L.C., AZEVEDO, A.A., SILVA, E.A. M. & OLIVA, M.A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. *Revista Brasileira de Botânica* 23:383-391.
- TEMMERMAN, L., BELL, J.N.B., GARREC, J.P., KLUMPP, A., KRAUSE, G.H.M. & TONNEIJCK, A.E.G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In* Urban air pollution, bioindication and environmental awareness (A. Klumpp, W. Ansel & G. Klumpp, eds.). Cuvillier Verlag, Göttingen, p.337-373.
- TRESHOW, M. & ANDERSON, F. 1991 Plant stress and air pollution. John Willey & Sons, New York.
- VDI. Richtlinie 3792. 1982. Messen der Immissions-Wirkdosis von gas- und staubförmigem Fluorid in Pflanzen mit dem Verfahren der standardisierten Graskultur.. Blatt 2. VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft. Verein Deutscher Ingenieure, Düsseldorf, p.1-6.
- VDI. Richtlinie 2310. 1989. Maximale Immissionswerte zum Schutze der Vegetation; Maximaler Immissionswerte für Fluorwasserstoff. *In* VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft. Verein Deutscher Ingenieure, Düsseldorf, p.1-48.
- WEINSTEIN, L.H. & HANSEN, K.S. 1988. Relative susceptibilities of brazilian vegetation to airborne fluoride. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 23:1125-1137.