**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Cálcio e boro para soja-perene: características anatômicas e
agronômicas e concentração de nutrientes**

Daniel Manfredini

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2008**

Daniel Manfredini
Engenheiro Agrônomo

**Cálcio e boro para soja-perene: características anatômicas e agronômicas e
concentração de nutrientes**

Orientador:
Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Manfredini, Daniel

Cálcio e boro para soja-perene: característica anatômicas e agronômicas e
concentração de nutrientes / Daniel Manfredini. - - Piracicaba, 2008.
103 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Boro 2. Cálcio 3. Fisiologia vegetal 4. Morfologia vegetal 5. Nutrição vegetal
6. Soja I. Título

CDD 633.34

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus pela oportunidade concedida e pelos constantes ensinamentos que proporciona em minha vida, aos meus queridos pais pelo incessante apoio, amor e confiança, ao meu irmão pelas sábias palavras nos momentos em que esmoreci, a minha família por todo apoio, aos meus amigos por toda a ajuda e momentos de descontração e, por último, mas não menos importante, a minha amada namorada que, apesar de distante, com sua calma e serenidade, sempre me fortaleceu a permanecer firme na luta.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Antonio Monteiro, pela orientação, auxílio, compreensão e ensinamentos, nesses sete anos de verdadeira amizade.

Aos professores da Pós-graduação, em especial aos professores Dr. Antonio Roque Dechen e ao Dr. Quirino Augusto de Camargo Carmello, pela amizade e por todos os conhecimentos transmitidos, que contribuíram com a minha formação.

Aos professores Dr. Carlos Alberto Labate e ao Dr. Marcílio de Almeida, por toda colaboração e auxílio na pesquisa.

Ao doutorando Juliano Bragatto pela amizade e constante ajuda no desenvolvimento da pesquisa.

Ao ilustre visionário Luiz de Queiroz pela eterna contribuição que tem com o desenvolvimento científico no Brasil.

Ao Prof. Dr. Eurípedes Malavolta, um dos grandes mestres da nutrição mineral de plantas, pela sua vida de dedicação à pesquisa.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, bem como ao Departamento de Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas: Edinéia C. S. Mondoni, Lúcia H. S. P. Forti, Lurdes A. Dário de González, Nivanda M. Moura Ruiz, Bárbara L. B. de Oliveira e Sueli Bovi pela atenção e apoio dispensado.

Aos colegas de Pós-Graduação por toda ajuda e companheirismo nesses dois anos de curso: Cristiane Prezotto Silveira, Daniela Alves de Oliveira, Edna Maria Bonfim da Silva, Magnus Dall'Igna Deon, Fabiano de Bona, Jackson Locks Lange, Adriana Guirado Artur e Márcio Mahmoud Megda.

Ao grupo de estagiários da Nutrição Mineral de Plantas e em especial a Arlete Simões Barneze, Caio Troula Fongaro e Lucas De Paula Ramos Conte, por toda amizade e apoio durante a condução do experimento. Sem a ajuda destes importantes

companheiros certamente não seria possível desenvolver todas as etapas do experimento.

À todos os professores do curso que direta, ou indiretamente auxiliaram na minha formação acadêmica e auxiliaram na elaboração dessa Dissertação.

Aos amigos Fábio Albuquerque Entelmann, Teodoro Teles Martin, Clayton Quirino Mendes e Leandro Ferreira Greco, pela convivência fraterna nesses dois anos de pós-graduação.

Ao grande amigo e colega de pós-graduação João Paulo de Campos Araújo pela amizade verdadeira, companheirismo, convivência, apoio e incentivo.

Aos amigos da república Boi Babão pelos momentos de descontração, amizade e união fraterna.

A Deus, acima de tudo, por nos proporcionar o dom da vida e nos iluminar e guiar nos caminhos nem sempre fáceis de serem trilhados.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Soja-perene.....	13
2.2 Acidez do solo para leguminosas forrageiras.....	14
2.3 Cálcio.....	14
2.4 Cálcio em leguminosas forrageiras.....	15
2.5 Uso de micronutrientes em leguminosas forrageiras.....	16
2.6 Boro.....	17
2.7 Boro em leguminosas forrageiras.....	17
2.8 Parede celular.....	18
2.9 Cálcio e parede celular.....	21
2.10 Boro e parede celular.....	22
2.11 Interação cálcio-boro.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Local do experimento.....	30
3.2 Instalação e condução do experimento.....	30
3.3 Soluções nutritivas.....	30
3.4 Corte das plantas.....	31
3.5 Medições radiculares.....	32

3.6 Determinações de nutrientes.....	32
3.7 Determinação dos carboidratos da parede celular em tecido foliar de plantas de soja-perene.....	33
3.7.1 Quantificação das hemiceluloses.....	33
3.7.2 Quantificação da celulose.....	34
3.8 Parâmetros do HPAE para análise dos carboidratos.....	35
3.8.1 Parâmetros utilizados para quantificação dos carboidratos hemicelulose e celulose.....	35
3.8.2. Parâmetros utilizados para quantificação dos ácidos urônicos.....	35
3.9 Cortes histológicos.....	36
3.10. Análises estatísticas.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Parâmetros produtivos.....	38
4.1.1 Produção de massa seca da parte aérea.....	38
4.1.2 Área foliar.....	41
4.1.3 Número de folhas.....	43
4.1.4 Produção de massa seca de raízes.....	44
4.1.5 Comprimento e superfície radicular.....	46
4.2 Concentração de nutrientes no ponteiro das plantas.....	48
4.2.1 Cálcio.....	48
4.2.2 Boro.....	51
4.2.3 Potássio.....	53
4.2.4 Magnésio.....	55
4.2.5 Manganês.....	57
4.3 Concentração de nutrientes na porção inferior das plantas.....	59
4.3.1 Cálcio.....	59
4.3.2 Boro.....	61
4.3.3 Potássio.....	63
4.3.4 Magnésio.....	65
4.4 Concentração de nutrientes nas raízes.....	67
4.4.1 Cálcio.....	67

4.4.2 Boro.....	68
4.4.3 Potássio.....	69
4.5 Análise de carboidratos da parede celular.....	70
4.5.1 Ácido galacturônico.....	70
4.5.2 Ácido glucurônico.....	71
4.5.3 Ácidos urônicos totais.....	72
4.5.4 Raminose.....	73
4.5.5 Galactose.....	75
4.5.6 Glicose.....	76
4.5.7 Celulose.....	77
4.5.8 Hemicelulose.....	79
4.5.9 Pentoses.....	79
4.5.10 Hexoses.....	80
4.5.11 Análise de correlação entre as concentrações de carboidratos da parede celular e as concentrações de cálcio e boro	81
4.6 Análises Anatômicas.....	82
4.7 Observações visuais.....	85
5 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

Cálcio e boro para soja-perene: características anatômicas e agronômicas e concentração de nutrientes

Leguminosas forrageiras têm sido consorciadas com capins, e contribuído com a sustentabilidade do sistema solo-planta-animal. A soja-perene (*Neonotonia wightii*) é uma das leguminosas forrageiras bem adaptadas ao cultivo em áreas tropicais. A aplicação de cálcio e boro tem resultado em benefícios ao desenvolvimento da planta, especialmente para as espécies leguminosas. Este trabalho objetivou verificar os efeitos de combinações de cálcio e de boro para a soja-perene na morfofisiologia da planta, produção, concentração mineral, concentração de carboidratos na parede celular, em alterações anatômicas nos tecidos foliares e sintomas visuais. Foi conduzido um experimento em casa de vegetação com plantas de soja-perene cultivadas em solução nutritiva em vasos plásticos contendo quartzo moído como substrato. Empregou-se o delineamento de blocos ao acaso, e um esquema fatorial 5^2 incompleto, perfazendo um total de 13 combinações de doses de cálcio e boro. As plantas foram submetidas a dois períodos de crescimento. O primeiro corte das plantas foi realizado 46 dias após o transplante das mudas e o segundo 38 dias após o primeiro. O ponteiro (três folhas trifolioladas completamente expandidas contadas a partir do ápice) foi separado da porção inferior da planta (restante do tecido vegetal) e das raízes que também foram coletados. A interação cálcio x boro foi significativa apenas para a concentração de cálcio na porção inferior da soja-perene. As doses de cálcio alteraram a área foliar, as concentrações de cálcio, magnésio e potássio nos tecidos vegetais amostrados, e as concentrações de carboidratos na parede celular da planta. As doses de boro alteraram a produção, comprimento e superfície das raízes, as concentrações minerais nos tecidos analisados e as concentrações de carboidratos na parede celular das folhas. As combinações de baixas ou altas doses de cálcio e de boro promoveram alterações nas características anatômicas da soja-perene. Com o suprimento de boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva as plantas apresentaram deformações nas folhas novas e desenvolvimento anormal do sistema radicular.

Palavras-chave: Macronutriente; Micronutriente; Morfofisiologia; *Neonotonia wightii*; Parede celular

ABSTRACT

Calcium and boron for perennial soybean: anatomical and agronomic characteristics and nutrient concentrations

Forage legumes have been mixed with grasses and contributed to improve the sustainability of the soil- plant- animal system. Perennnial soybean (*Neonotonia wightii*) is one forage legume well adapted to the tropical areas. Calcium and boron have resulted in benefits for plant development, particularly in legume species. This study was set with the objectives of verifying the effects of calcium and boron combinations for perennial soybean in plant morphophysiology, production, mineral concentrations, carbohydrate concentrations in cell wall, anatomical changes in leaf tissues and visual symptoms. A greenhouse experiment was carried out with plants grown in plastic pots containing ground quartz and supplied with nutrient solutions. An incomplete factorial 5 x 5, with 13 combinations of calcium and boron rates, was set in randomized block design. Plants were harvested twice, the first harvest one at 46 days after seedlings transplanting to the pots and the second harvest at 38 days after the first one. The upper part (three completely expended leaves) was separated from the lower part of plant tops and roots that were collected too. Calcium x boron interaction was only significant for the calcium concentration in the lower part of perennial soybean. Calcium rates changed leaf area, concentrations of calcium, magnesium and potassium in the sampled plant tissues, and carbohydrate concentrations in the cell wall of perennial soybean. Boron rates influenced changes in roots (dry matter, length and surface), mineral concentrations and carbohydrate concentrations in leaves cell wall. High or low rates of both calcium and boron had resulted in changes in anatomical characteristics of perennial soybean. When boron was supplied at 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ plants presented deformed new leaves and abnormal root system growth.

Keywords: Cell wall; Macronutrient; Micronutrient; Morphophysiology; *Neonotonia wightii*

1 INTRODUÇÃO

A área de pastagens com leguminosas forrageiras no Brasil ainda é muito reduzida em relação à quantidade de pastagens exclusivas de gramíneas. Entretanto, inúmeros estudos já demonstraram as vantagens da utilização de sistemas de pastagens consorciados com espécies de gramíneas e leguminosas, com benefícios na produção animal.

As leguminosas forrageiras são importantes não só pelo valor nutritivo da forragem produzida, mas principalmente pela capacidade de fornecimento de nitrogênio ao sistema solo-planta, em razão da associação com bactérias do gênero *Rhizobium*, contribuindo para a formação de pasto com boa produtividade e garantindo a sustentabilidade do sistema. Para que essa associação leguminosa-rizóbio possa desempenhar adequadamente o papel na fixação de nitrogênio atmosférico é necessário que a planta tenha a demanda nutricional atendida.

A soja-perene (*Neonotonia wightii*) é originária da África, sendo também encontrada no sul e sudoeste da Ásia. Dentre as leguminosas forrageiras a soja-perene é uma das mais utilizadas nas pastagens brasileiras que possuem plantas dessa família, devido a sua adaptabilidade às variações climáticas locais, capacidade de fechamento de área e rebrotação, além de produzir feno com altos valor nutritivo e concentração protéica.

O boro está relacionado a diversos processos do vegetal, tais como absorção iônica, transporte e metabolismo de carboidratos, sínteses de lignina, ácidos nucleicos e proteínas, além de atuar na divisão e diferenciação celular nos tecidos meristemáticos. Estudos sugerem atuação do boro na biogênese da parede celular. A participação do boro no desenvolvimento celular da planta é de suma importância, influenciando propriedades físicas, estruturais e a diferenciação da parede celular.

A deficiência de boro resulta em inibição do crescimento da planta, devido às funções estruturais específicas desse elemento na parede celular e à limitada mobilidade do nutriente na maioria das plantas. Essa deficiência também causa alterações fisiológicas e bioquímicas no vegetal, tais como alteração da integridade e funcionamento da membrana celular, disfunções metabólicas e aumento na produção de compostos fenólicos.

Pesquisas recentes indicam correlação entre a exigência de boro pelas plantas e o teor de pectina na parede celular. Plantas dicotiledôneas necessitam de maiores concentrações de boro, devido à maior concentração de pectina na parede celular em relação às monocotiledôneas.

Nessas plantas, em condições de deficiência de boro, a maior parte do micronutriente se encontra na parede celular associado à pectina.

O cálcio é fundamental para o crescimento e desenvolvimento da planta, sendo mediador de muitas reações químicas. A maioria das atividades desse nutriente está relacionada à sua capacidade de coordenação, providenciando estabilidade e ligações moleculares reversíveis, predominantes na membrana plasmática e parede celular.

É conhecida a importância do cálcio na manutenção da integridade da parede celular. Ao contrário dos outros macronutrientes, grande proporção do total de cálcio nos tecidos vegetais, está localizado na parede celular, onde os pectatos de cálcio (juntamente com os pectatos de magnésio) formam a lamela média, responsável pela ligação de células adjacentes e a consequente extensibilidade da parede celular.

É notória a importância do cálcio e do boro para a planta, principalmente na parede celular. Entretanto, existem poucos estudos sobre a atuação celular desses nutrientes de forma conjunta. Deficiências de boro têm sido registradas quando ocorre aumento no suprimento de cálcio, sendo observadas alterações nas características físicas e químicas da parede celular das plantas deficientes em boro. A associação do cálcio com a pectina na parede celular depende de do fornecimento adequado desse micronutriente.

Considerando a importância do cálcio e do boro para a nutrição das plantas, bem como a relação entre esses dois nutrientes, objetivou-se obter informações para a soja-perene no que diz respeito ao número de folhas, a área foliar, a produção de massa seca da parte aérea e das raízes, a superfície e ao comprimento radicular, as concentrações dos nutrientes catiônicos, as concentrações dos carboidratos na parede celular primária, as diferenças anatômicas e aos sintomas visuais nos tecidos vegetais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Soja-perene

O estabelecimento e a manutenção de plantas forrageiras em pastagens dependem, em grande parte, da fertilidade do solo. A baixa fertilidade natural dos solos destinados à atividade agropecuária é um dos motivos da baixa produtividade das pastagens e dos animais que se alimentam das mesmas. Visando obter altos índices de produtividade vegetal, bem como animal, há necessidade de nutrir adequadamente a planta forrageira, bem como empregar espécies com adequado valor nutritivo, na região de interesse (COLOZZA; WERNER, 1984).

A não utilização de adubação adequada e específica para cada leguminosa forrageira e condição de solo, por ocasião do estabelecimento da pastagem consorciada, é um dos principais fatores que limita a implantação desse tipo de sistema agropecuário no Brasil (GONTARSKI, 1991).

O uso de leguminosas em pastagens pode melhorar a produção animal e reduzir o custo de produção, devido à redução da quantidade de nitrogênio mineral aplicado. A leguminosa pode contribuir com o aumento da disponibilidade de forragem devido ao fornecimento de nitrogênio ao sistema por meio da associação leguminosa-rizóbio, além de melhorar e diversificar a dieta animal (PEREIRA, 2001).

A soja-perene [*Neonotonia wightii* (Arn.) Lackey], anteriormente conhecida como *Glycine javanica* L. e *Glycine wightii* (Arn.) Verde, é originária da África, sendo encontrada também no sul e sudoeste da Ásia (TANG et al., 1987). Foi introduzida no Brasil, tendo sido inicialmente distribuída pelo Instituto Agrônomo de Campinas em 1956 (ALCÂNTARA; MATTOS, 1976). É uma espécie que vegeta bem no verão, particularmente em áreas com precipitação pluvial de 750 a 1500 mm, comporta-se bem desde o nível do mar até altitude de 1800 m, prefere solos profundos e bem drenados, e tem persistência no pasto quando bem estabelecida.

A *Neonotonia wightii* pertence à família Leguminosae e subfamília Papilionoideae. É herbácea, rasteira, volúvel, com folhas trifoliadas e sistema radicular profundo (ALCÂNTARA; BUFARAH, 1983). O sistema radicular é capaz de fixar nitrogênio atmosférico devido à associação com bactérias do gênero *Rhizobium*. Em condições brasileiras a soja-perene apresenta

taxas anuais de fixação de nitrogênio variando entre 40 a 140 kg ha⁻¹ ano⁻¹, desde que as suas exigências nutricionais sejam atendidas e o nível de acidez do solo esteja em faixa adequada ao desenvolvimento da cultura (CARVALHO, 1986).

2.2 Acidez do solo para leguminosas forrageiras

A acidez do solo é um dos principais fatores que afeta o cultivo de plantas leguminosas, sejam produtoras de grãos ou forrageiras, principalmente em regiões tropicais ou subtropicais (RAIJ et al., 1977; OLIVEIRA et al., 1985; COSTA et al., 1989).

Em se tratando de leguminosas forrageiras, inúmeras pesquisas já demonstraram a importância da correção da acidez do solo na produtividade, bem como o cuidado que deve ser dado à adequação dessa técnica para com o sistema de manejo da pastagem (WERNER, 1979, PREMAZZI, 1991; MONTEIRO, 1993; OTSUBO, 1993).

A soja-perene tem sido constantemente destacada como uma das espécies, entre as leguminosas forrageiras tropicais, mais sensíveis às condições de acidez do solo (FRANÇA; CARVALHO, 1970; JONES; FREITAS, 1970; CARVALHO et al., 1971; MUNNS; FOX, 1977; MONTEIRO, 1980; COLOZZA; WERNER, 1984; PREMAZZI, 1991). A caracterização dos efeitos da acidez do solo e da calagem no desenvolvimento de leguminosas, como a soja-perene, é complexa já que um grande número de propriedades químicas é alterado com a aplicação do corretivo. Os efeitos mais citados estão relacionados à correção de um ou mais fatores limitantes, associados à acidez do solo, tais como: toxicidade de alumínio (JANGHORBANI et al., 1975; HORSNELL, 1985); toxicidade de alumínio e manganês (RICE, 1975); deficiência de fósforo e interação com o alumínio tóxico (MAHLER, 1983); deficiência de cálcio (MUNNS et al., 1977) e deficiência de molibdênio (DOERGE et al., 1985).

2.3 Cálcio

O cálcio é absorvido pelas raízes como Ca²⁺ e sua concentração na solução do solo pode ser dez vezes maior que a concentração de potássio, porém no interior das plantas não se verifica o mesmo, pelo fato de sua absorção diminuir competitivamente pela presença de outros cátions, tais como K⁺ e NH₄⁺, que são absorvidos rapidamente pelas raízes. O principal mecanismo

envolvido na absorção desse nutriente é o fluxo de massa. O cálcio é considerado imóvel quanto à redistribuição na planta, fazendo com que os sintomas de deficiência surjam primeiramente nas folhas novas da planta, havendo deformação e clorose foliar e, nos estágios mais avançados, o amolecimento do tecido devido à alteração na estrutura da parede celular (MENGEL; KIRKBY, 2001).

O cálcio é considerado um nutriente estrutural da planta, pois é um dos principais integrantes da parede celular, onde os pectatos de cálcio existentes na lamela média são essenciais para o fortalecimento da parede celular e dos tecidos da planta (MARSCHNER, 1995). A plasticidade da parede celular depende do fornecimento adequado de cálcio para a formação de ligações cálcio-pectina (TING, 1982). Esse macronutriente também exerce inúmeras funções no crescimento e desenvolvimento vegetal. O atraso no amadurecimento de frutos e na senescência e abscisão foliar, a melhoria da qualidade dos frutos e hortaliças e as alterações na resposta geotrópica, na fotossíntese e em outros processos como divisão celular, movimentos citoplasmáticos e aumento do volume celular são algumas funções do cálcio nas plantas (MENGEL; KIRKBY, 2001).

Esse macronutriente possui características notáveis, comparado aos outros nutrientes da planta. Apresenta baixas concentrações no citoplasma em todos os organismos eucariontes. Têm sido registrados na literatura, um grande número de desordens fisiológicas associadas à inadequada nutrição de cálcio, como o “biter pit” na maçã (*Malus domestica*), “coração negro” no aipo (*Apium graveolens*) e morte radicular em tomate (*Lycopersicon esculentum*) (KIRKBY; PILBEAM, 1984). Entretanto, essas desordens não estão relacionadas com inadequado suprimento de cálcio, mas com deficiências localizadas do nutriente na planta. Parece haver exigência crítica nesse nutriente fora do apoplasto, na superfície exterior da membrana plasmática e na parede celular. (MATOH; KOBAYASHI, 1998).

2.4 Cálcio em leguminosas forrageiras

Jones e Freitas (1970) estudaram respostas de quatro leguminosas tropicais a aplicações de fósforo, potássio e calcário num latossolo vermelho-amarelo de campo de cerrado e verificaram aumentos na produção de massa seca das leguminosas *Neonotonia wightii*,

Stylosanthes gracilis, *Centrosema pubescens* e *Macroptilium atropurpureum*, devido à adição de calcário de 250 a 1000 kg ha⁻¹.

França et al. (1973) realizaram trabalho com soja-perene Tinaroo em um latossolo vermelho escuro que tinha pH em água 4,30 e testaram os efeitos da ausência e da presença de carbonato de cálcio e de sulfato de magnésio. Os autores verificaram aumentos significativos da aplicação do carbonato de cálcio para a produção de massa seca, porcentagem e quantidade total de nitrogênio e concentração de cálcio e magnésio na leguminosa.

Andrew (1976) estudou a combinação de três doses de cálcio, quatro valores de pH e duas doses de nitrogênio, em experimento em areia com leguminosas forrageiras, dentre as quais estava a soja-perene Cooper. Verificou aumentos na produção de massa seca dessa espécie, devido as doses de cálcio aplicadas em todos os valores de pH.

Dutra et al. (1995), trabalhando com dois tipos de solo (um planossolo e um podzólico vermelho amarelo) sob condição de casa de vegetação, encontraram reduções na produção da alfafa entre 33% e 46%, respectivamente, em cinco cortes a intervalos de 30 dias, quando suprimiram o calcário dolomítico na dose de 4000 kg ha⁻¹. Monteiro (1993), em experimento com soja-perene Tinaroo e doses de cálcio, também verificou aumentos na produção de massa seca da planta devido ao fornecimento de cálcio.

2.5 Uso de micronutrientes em pastagens

Nas condições de solos das regiões tropicais e subtropicais, tanto a acidez excessiva como a baixa disponibilidade de nutrientes às plantas são de ocorrência generalizada. A correção da acidez excessiva, bem como o suprimento adequado de nutrientes, constituem práticas imprescindíveis para o adequado desenvolvimento das plantas, entre as quais se incluem as leguminosas forrageiras (MONTEIRO, 1993).

O uso de micronutrientes nas pastagens brasileiras, visando à adequada nutrição da planta ainda está distante do adequado (MONTEIRO et al., 2001). Em se tratando de leguminosas forrageiras há que se destacar a importância dos micronutrientes, não somente para a nutrição das plantas em si, mas também para a nodulação da leguminosa (MONTEIRO, 1988). O suprimento de boro é fundamental para o adequado desenvolvimento do sistema radicular e formação dos nódulos radiculares em leguminosas forrageiras (WERNER, 1979).

Aumentos na produção das plantas forrageiras devido à adubação com micronutrientes já foram documentados por pesquisadores (GUPTA; LIPASETT, 1981; McFARLANE et al., 1990). As leguminosas forrageiras são, em geral, mais responsivas à aplicação de boro e de molibdênio, do que aos outros micronutrientes (GUPTA, 1969, 1984; JOHANSEN et al., 1977).

2.6 Boro

A recomendação de boro ou de outros micronutrientes no Brasil ainda é realizada de forma preventiva levando em conta, principalmente, as características da cultura, a exigência da espécie e a frequência de ocorrência de carência desses nutrientes na região (OTSUBO, 1993). Sendo assim, a adubação é realizada sem embasamento em análise de solo ou dos tecidos vegetais, o que pode resultar em danos na produtividade das culturas, devido ao manejo inadequado da adubação, resultando em problemas de toxidez ou deficiência dos nutrientes.

O boro é absorvido pelas plantas na forma de ácido bórico não dissociado (H_3BO_3) e há dúvidas sobre a natureza do processo de absorção, se passivo ou ativo (MALAVOLTA et al., 1997). De acordo com Marschner (1995) as principais funções do boro na planta são: participação no metabolismo de carboidratos e fenóis, transporte de açúcares pela membrana, síntese de ácidos nucléicos e fitohormônios, síntese, integridade e lignificação da parede celular, germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico. É um elemento essencial para a atividade meristemática da planta.

Devido a sua influência na expansibilidade das células e limitada mobilidade na maioria das plantas, o boro deve ser fornecido durante todo o ciclo do vegetal, geralmente via solo (GUPTA, 1979). A exigência nesse micronutriente é normalmente maior durante a fase de florescimento e frutificação, devido à participação no processo de germinação do grão de pólen e crescimento do tubo polínico. Sua carência resulta em aumento da taxa de abortamento foliar, chochamento de grãos e macho-esterilidade (FAQUIN, 2001).

2.7 Boro em leguminosas forrageiras

Experimentos com alfafa (*Medicago sativa*) constataram incrementos na produção de massa seca dessa espécie devido à adubação com esse micronutriente. Gupta (1984) obteve

aumentos na produção de massa seca de plantas de alfafa devido à adição de boro em solos podzólicos do leste canadense.

Experimentos sobre a adubação com micronutrientes para uma série de leguminosas forrageiras na Nova Zelândia demonstraram que as maiores respostas em produção de massa seca devido à adubação com boro foram obtidos com trevo-vermelho (*Trifolium pratense*) e alfafa (*Medicago sativa*) (SHERRELL 1983a).

Werner e Mattos (1974) realizaram um experimento fatorial com boro ($0,5 \text{ kg ha}^{-1}$), cobre ($2,0 \text{ kg ha}^{-1}$), molibdênio ($0,25 \text{ kg ha}^{-1}$) e zinco ($2,0 \text{ kg ha}^{-1}$), com a soja-perene Comum em um latossolo vermelho-escuro, e constataram que a aplicação de boro resultou em aumentos significativos no número e massa de nódulos e na produção de massa seca da planta.

Jones et al. (1970), em experimento com subtração de micronutrientes em leguminosas forrageiras, dentre as quais estava a soja-perene, em três solos de campo-cerrado, constataram que a omissão de boro resultou em decréscimo na produção de massa seca da soja-perene.

Experimentos com plantas de alfafa verificaram que a adição de boro promoveu incrementos significativos na produção de massa seca da planta e na concentração desse micronutriente no tecido vegetal (GUPTA; MACLEOD, 1977; SHERREL, 1983b). Santos et al. (2004), em estudo sobre produção de alfafa em função do suprimento de boro em solução nutritiva, obtiveram aumentos na produção de massa seca devido à aplicação do micronutriente. A adição de boro na solução nutritiva favoreceu o incremento da massa seca tanto das folhas quanto das hastes da leguminosa.

Sintomas de deficiência de boro, em leguminosas forrageiras, têm sido registrados em solos com teores de boro solúvel em água quente menores que $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ (SHERREL, 1983c; GUPTA, 1984), principalmente quando associado a longo período de seca (SHERREL; TOXOPEUS, 1978).

2.8 Parede celular

Estudos sugerem uma atuação do boro na biogênese da parede celular. A parede celular é caracterizada como uma complexa rede de polissacarídeos e outros polímeros secretados pela célula, reunidos em uma rede organizada por meio de ligações covalentes e não covalentes. Essa

estrutura presente nas células vegetais é responsável pela regulação do volume e pela determinação da forma da célula.

A parede celular é essencial para os processos de crescimento, desenvolvimento, manutenção e reprodução da planta. Essa estrutura específica das células vegetais é responsável pela resistência mecânica das estruturas vegetais; promove a junção das células, evitando que deslizem e se separem e determina a relação entre pressão de turgor e volume celular, sendo essencial para a manutenção das relações hídricas da planta. A parede celular atua como um exoesqueleto que controla a forma da célula, possibilitando o desenvolvimento de altas pressões de turgor no meio celular. A morfogênese vegetal depende, em larga escala, do controle das propriedades da parede celular, pois o crescimento expansivo das células vegetais é limitado, sobretudo pela capacidade de expansão da parede; o fluxo de massa de água no xilema exige uma parede mecanicamente rígida, que resista a colapso provocado por pressão negativa no xilema. A parede atua como barreira à difusão, limitando o tamanho de macromoléculas, que podem alcançar a membrana plasmática exterior, além de ser a principal barreira estrutural à invasão de patógenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Morfologicamente, a parede celular é dividida em três regiões distintas: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é a região de intersecção entre duas células, sendo uma camada rica em substâncias pécicas mergulhadas em um meio aquoso (CARPITA; MAcCANN, 2001; RAVEN et al., 2001). A parede primária é composta basicamente por três estruturas independentes, as microfibrilas de celulose (cerca de 30%), os polissacarídeos não-celulósicos, que incluem hemiceluloses (em torno de 30%) e pectinas (aproximadamente 30%) e as proteínas estruturais (por volta de 10%) (HAYASHI, 1989; CARPITA; GIBEAUT, 1993). Quando o crescimento celular é finalizado, inicia-se o processo de diferenciação celular, com início da formação da parede secundária. A transição da parede celular primária para a formação da parede celular secundária é marcada pela redução da síntese de pectina e grande aumento de celulose, hemicelulose e lignina (RAVEN et al., 2001). A parede celular secundária contém tipicamente três camadas distintas (S_1 , S_2 e S_3) as quais são diferenciadas em espessura, composição e orientação das microfibrilas de celulose (FENGEL; WEGENER, 1984; EMONS; MULDER, 2000; MELLEROWICZ et al., 2001; PLOMION et al., 2001).

Os principais componentes químicos da parede celular são:

Celulose - produzida na forma de microfibrilas de celulose, sendo que cada uma das microfibrilas de celulose é formada por aproximadamente 36 cadeias lineares de glicose, cuja organização determina as propriedades mecânicas da célula e conferem o suporte e resistência à parede celular (FRY, 1988; EMONS; MULDER, 2000; EMONS et al., 2002).

Hemicelulose – formada por diversos grupos de polissacarídeos interligados às microfibrilas de celulose. As hemiceluloses mais abundantes na parede primária das plantas dicotiledôneas são as xiloglucanas. A principal função deste componente químico é regular o crescimento celular da parede (MACNEIL et al., 1984; HAYASHI, 1989; FOSKET, 1994).

Pectina – principal componente da lamela média. Sua principal característica é a de funcionar como agente cimentante, fazendo a união entre as células. A pectina é constituída por uma grande variedade de polissacarídeos como: ácido urônico, ácido galacturônico, ácido glucurônico, raminose, galactose, arabinose, glicose, pentose e hexose (TAIZ; ZAIGER, 2004). A pectina abrange o principal grupo de polissacarídeos exclusivos da parede celular primária (WILLATS et al., 2001).

Lignina – é o segundo biopolímero mais abundante na parede celular, sendo superado apenas pela celulose. A lignina é um complexo polimérico com caráter fenólico, resistente à hidrólise. Apresenta como características marcantes elevada rigidez e hidrofobia, que garantem maior resistência da planta a condições adversas e ataque de patógenos. A maior concentração de lignina está localizada na região da lamela média, enquanto a concentração é menor no interior da parede celular secundária (FRY, 1988; TERASHIMA et al., 1993; RAVEN et al., 2001).

Os avanços tecnológicos são significativos, no que tange à determinação dos mecanismos de formação da parede celular. A parede celular é uma estrutura muito complexa, que possui diversas funções na planta, sendo que muitas dessas funções são exigidas ao mesmo tempo em vários estádios de desenvolvimento do vegetal. A parede possui simultaneamente grande flexibilidade e máxima resistência devido a sofisticado controle metabólico, com regiões de extrema complexidade, com altos conteúdos de polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos (NORTHCOTE, 1972; BRETT; WALDRON, 1990; CARPITA; GIBEAUT, 1993; GIBEAUT; CARPITA, 1994; DHUGGA, 2001; RAVEN et al., 2001). Assim, a determinação exata da composição dessas substâncias, bem como dos fatores ambientais e nutricionais que favorecem a síntese das mesmas, pode fornecer importantes informações sobre as funções específicas e a

biossíntese dessa complexa estrutura da célula vegetal, bem como sobre o controle dos processos de crescimento e morfogênese da planta.

2.9 Cálcio e parede celular

Na parede celular existem duas áreas distintas com elevadas concentrações de cálcio: a lamela média e a superfície exterior da membrana plasmática e nessas duas áreas o cálcio tem funções estruturais essenciais (TREVIZAM, 2005).

Os polissacarídeos pécticos da parede celular são interligados com cálcio por meio da ligação desse nutriente com grupos carboxílicos presentes nas regiões dos ácidos poligalacturônicos da parede celular (JARVIS, 1984). Yamauchi et al. (1986), em estudo sobre o metabolismo do cálcio em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), utilizando a técnica de isótopos estáveis, puderam constatar que a maior parte do ⁴⁵Ca fornecido às plantas encontrava-se nas frações da parede celular. Em continuidade aos estudos do metabolismo do cálcio nas plantas de tomate esses mesmos pesquisadores realizaram o fracionamento subcelular, para determinar o padrão de distribuição do cálcio na parede celular das plantas. Com base nesse fracionamento os autores sugeriram que há dois tipos de cálcio ligado à parede celular, sendo que uma das formas do cálcio se encontra ligado aos pectatos da lamela média e a outra é exigida para a formação das proteínas pécticas cimentantes da parede celular.

Eklund e Eliasson (1990) trabalharam com hipocótilos de *Pinus* e observaram que a falta de suprimento de cálcio reduziu a síntese de parede celular, evidenciando o papel deste nutriente na manutenção da estrutura celular.

Estudos conduzidos por Ferreira et al. (2006) demonstraram correlação altamente significativa entre as cadeias oligalacturônicas e os íons de cálcio presentes na parede celular de frutos de azeitona (*Olea europaea*). Esses pesquisadores observaram que os ácidos galacturônicos presentes nessa cadeia apresentam alta afinidade com íons de cálcio, o que garante a formação de ligações entre polissacarídeos pécticos da parede celular. As ligações do cálcio com o ácido galacturônico são comumente observadas na lamela média e são essas ligações que possibilitam os processos de adesão e coesão entre as células da parede celular, garantido a firmeza e extensibilidade dessa estrutura vegetal. A firmeza da parede celular é consideravelmente reduzida pela remoção dos íons de cálcio (PARKER; WALDRON, 1995).

Fry (2004), em extensa revisão sobre o metabolismo da parede celular primária nas plantas superiores, relatou que os polissacarídeos da parede celular ricos em galacturona, um dos componentes químicos dessa estrutura vegetal, são interligados por íons de cálcio. Willats et al. (2001) relataram que os polissacarídeos pécticos de homogalacturona são interligados por íons de cálcio, sendo essas ligações cálcio-homogalacturona responsáveis pela estabilidade de toda a cadeia péctica da parede celular.

2.10 Boro e parede celular

A participação do boro no desenvolvimento da parede celular da planta é de suma importância, influenciando propriedades físicas, estruturais e a diferenciação dessa estrutura. Smith (1944), em estudo sobre o metabolismo do boro em plantas de abóbora (*Cucurbita maxima*), demonstrou que a maior parte do boro insolúvel em água, presente nas folhas, está ligado à parede celular.

Yamanouchi (1971) foi o primeiro a demonstrar que a quantidade de boro insolúvel em água está altamente correlacionado aos polissacarídeos pécticos insolúveis em água da parede celular, em 52 espécies de plantas superiores.

Os polissacarídeos pécticos são ricos em ácido galacturônico, raminose, arabinose e galactose. Eles são característicos da lamela média e da parede celular primária de plantas dicotiledôneas, sendo menos freqüentes em monocotiledôneas (BRETT; WALDRON, 1990).

Estudos demonstraram que o boro está quimicamente localizado e que é estruturalmente importante na parede celular da planta (BROWN; HU, 1997). Em condições de deficiência de boro, cerca de 95 a 98% do nutriente se encontra na parede celular associado com a pectina (MATOH et al., 1992).

Hu e Brown (1994), em estudo sobre a localização do boro na parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), observaram que em condições de deficiência de boro uma quantidade crescente desse micronutriente se encontrava na parede celular da planta em associação com a pectina. Esses pesquisadores também observaram que nas plantas em que a deficiência causou inibição do crescimento, os tecidos permaneceram verdes e não apresentaram sintoma visível adicional até uma semana sem adição de boro. Isso ocorreu mesmo em condições de baixa concentração de boro ao nível citoplasmático. Esses resultados sugerem que o boro está

amplamente associado à parede celular das plantas superiores e que, para as funções citoplasmáticas, é exigida uma pequena quantidade do boro.

As propriedades mecânicas da parede celular, como o alongamento das células, podem ser modificadas por meio da alteração entre as interligações dos componentes minerais da parede e os respectivos polímeros celulósicos, hemicelulósicos e os polissacarídeos pécticos presentes nessa estrutura vegetal. Pesquisas recentes demonstraram relação altamente significativa entre a nutrição em boro e a parede celular primária das plantas superiores (LOOMIS; DURST, 1992). Os primeiros sintomas de deficiência de boro incluem anormalidades na parede celular da planta e na organização da lamela média (LOOMIS; DURST, 1992; MATOH et al., 1992; HU; BROWN, 1994).

Loomis e Durst (1992) e O'Neill et al. (1996), em detalhado estudo sobre o metabolismo do boro nas plantas, relataram que a apiose, um dos polissacarídeos encontrados na parede celular de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas, pode ser um dos principais açúcares responsáveis pela ligação do boro com polímeros da parede celular. Além disso, esses autores descreveram que a ribose, açúcar presente nos ribonucleotídeos, está significativamente relacionada com a toxicidade do boro.

Matoh et al (1993) foram os primeiros pesquisadores a conseguirem isolar e purificar um complexo polissacarídeo específico de boro presente na parede celular de raízes de rabanete (*Raphanus sativus*), no qual o boro estava presente como um complexo tetravalente 1:2 borato-di-ol. Aproximadamente 80% do boro celular encontram-se ligado a esse polissacarídeo específico presente na parede celular das plantas. Esses pesquisadores também realizaram um seqüenciamento dos componentes químicos presentes nesse complexo e constataram a presença dos seguintes componentes interligados ao boro: ácido urônico (52,3%), arabinose (17,4%), raminose (9,8%), galactose (4,9%) e xilose (0,3%).

Análises dos polissacarídeos interligados na parede celular permitiram identificar que o complexo ao qual o boro se encontra ligado na cadeia péctica da parede é o rhamnogalacturônico II (RGH-II) (KOBAYASHI et al., 1995). A ocorrência dos complexos de boro ligado ao açúcar rhamnogalacturônico II das cadeias pécticas foi observada na parede celular de 24 espécies de plantas superiores (MATOH et al., 1996). O RGH-II deve ser o carreador exclusivo do boro na parede celular dessas plantas. Trabalhos de Kobayashi et al. (1997) demonstraram haver alta

correlação entre o 2-keto-3-deoxiaçúcar, o monossacarídeo diagnóstico do RG-II, e a concentração de boro no tecido vegetal de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas.

O rhamnogalacturônico II é um mega-oligossacarídeo péctico, relacionado com a estrutura primária da parede celular de plantas superiores (MAZEAU; PÉREZ, 1998). Estudos recentes comprovaram haver grande afinidade entre esse polissacarídeo e o íon borato, favorecendo a sua complexação na parede celular. (LOOMIS; DURST, 1992; MATOH et al., 1993; HU; BROWN, 1994; O'NEILL et al., 1996).

Kaneko et al. (1997) estudaram os complexos de B-RGH-II formados na parede celular de caules de bambu (*Bambusa vulgaris*). Após purificação e seqüenciamento do polissacarídeo esses autores observaram que os principais constituintes desse complexo são: ácidos galacturônicos (cerca de 29%), raminose (em torno de 19%), arabinose (aproximadamente 12%) e apiose (ao redor de 7%). Resultados similares foram obtidos por Ishii e Matsunaga (2001), em estudo sobre polissacarídeos pécticos com plantas de beterraba (*Beta vulgaris*).

Considerando que a maior exigência em boro pela planta ocorre durante o desenvolvimento do tubo polínico, Matoh e Kobayashi (1998) procuraram determinar a formação das ligações boro e rhamnogalacturona II na parede celular dos tubos polínicos em plantas de rabanete (*Raphanus sativus*). A ocorrência das ligações B-RG-II foi confirmada pela análise dos açúcares dos complexos B-polissacarídeos dos tubos polínicos.

Kobayashi et al. (1996), em estudo sobre as ligações do boro com a rhamnogalacturona II das cadeias pécticas presentes na parede celular das plantas superiores, demonstraram que o boro é responsável pela ligação de dois monômeros de RG-II por meio de ligações boro diol éster, fundamentais para a formação de complexos dímeros de RG-II, e formação das macromoléculas pécticas, essenciais para a manutenção da integridade e extensibilidade da parede celular. Esses resultados sugerem que a principal função fisiológica do boro seja de promover as ligações entre os polissacarídeos pécticos da parede celular na região do RGH-II, favorecendo a formação da rede péctica da planta.

Em pesquisas recentes foram verificadas alterações na estrutura da parede celular, associada à alteração no metabolismo de pectinas em plantas deficientes em boro. Loomis e Durst (1992) relataram que a função do boro na parede celular está relacionada com a sua associação com pectinas. Ishii e Matsunaga (1996) determinaram que a principal localização do boro é verificada essencialmente na parede celular da planta ligada à pectina.

É amplamente aceito que as pectinas possuem um papel fundamental na determinação da extensibilidade plástica da parede celular dos vegetais. Sob deficiência de boro as propriedades físicas da parede celular são notavelmente alteradas, afetando a expansão celular (HU; BROWN, 1994).

Darvill et al. (1980) relataram que gramíneas (monocotiledôneas) apresentam baixo requerimento em boro (3 a 10 mg kg⁻¹ na massa seca) devido à baixa concentração de pectina na parede celular. Por outro lado, dicotiledôneas, caracterizadas por alta concentração de pectina na parede celular, possuem requerimento muito maior em boro (20 a 30 mg kg⁻¹ na massa seca).

2.11 Interação cálcio x boro

Diversos autores verificaram interações cálcio x boro nas plantas. Brenchley e Warington (1927) foram os primeiros pesquisadores que sugeriram a existência de relação entre o cálcio e o boro nas plantas superiores.

Deficiências de boro em plantas superiores têm sido registradas quando ocorre aumento no suprimento de cálcio. A razão cálcio/boro em folhas tem sido usada como índice para a diagnose da toxidez de boro e também para indicar a nutrição do micronutriente (GUPTA, 1979).

Essas interações parecem ocorrer ao nível de membrana e parede celular (PARR; LONGHMAN, 1983). Entretanto os mecanismos envolvidos na interação cálcio x boro ainda não são conhecidos. Sugere-se que as funções apoplásticas do boro na estabilização de componentes da parede celular dependem de atuação conjunta do cálcio (GINSBURG, 1961; LOOMIS; DURST, 1992).

A parede celular tem sido considerada como o sítio de ligação do boro o qual afeta o metabolismo do cálcio. Yamauchi et al. (1986), estudando os efeitos da deficiência de boro no metabolismo do cálcio em plantas de tomate, verificaram que a incorporação de cálcio na parede celular aumentou quando se reduziu o suprimento desse macronutriente, desde que o fornecimento de boro fosse adequado para a planta. Entretanto, na deficiência de boro não foi observado esse comportamento, demonstrando a importância do micronutriente no metabolismo do cálcio na parede celular. Além disso, foi verificado que o teor de ácido urônico na pectina da parede celular dessas plantas foi afetado pela deficiência de boro. Esses autores ainda relataram que na deficiência desses dois nutrientes ocorre alteração no acúmulo de substâncias pécicas da

parede celular, sendo que os pectatos de cálcio, responsáveis pela manutenção da plasticidade e alongamento da parede celular, são substituídos por lignina e celulose, o que acelera o processo de senescência da planta, fazendo com que os tecidos vegetais percam a sua flexibilidade.

Brennan e Shive (1948), estudando a interação cálcio x boro em tecidos vegetais de plantas de tomate, observaram que as plantas que receberam altas doses de cálcio combinadas com as mais baixas doses de boro apresentaram sintomas severos de deficiência do micronutriente. As plantas que receberam as maiores doses de boro (5 mg kg^{-1}) em combinação com as menores doses de cálcio (5, 50, 100 e 250 mg kg^{-1}) desenvolveram sintomas severos de toxidez do boro. As plantas que receberam a dose de boro 5 mg kg^{-1} combinada com a dose de cálcio de 500 mg kg^{-1} não manifestaram os sintomas de toxidez observados nos outros tratamentos. Esses resultados sugerem que em plantas que recebem altas doses de cálcio o excesso de boro solúvel é convertido para insolúvel sendo menos prejudicial à planta.

Reeve e Shive (1944), em experimento sobre as relações entre o cálcio e o boro na nutrição de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) e de milho (*Zea mays*), observaram que com um fornecimento constante de boro (1 mg kg^{-1}) as concentrações de boro solúvel e total nas plantas tenderam a diminuir em função do aumento das doses de cálcio.

Werner (1979) estudou a resposta de duas espécies de estilose a doses de calagem, fósforo, potássio e boro, aplicados em três tipos de solos que diferiam quanto as suas características químicas, e também verificou relações antagônicas entre os nutrientes cálcio e boro. Observou redução na produção de massa seca da parte aérea das plantas em função das doses de boro aplicadas, sendo essa redução mais acentuada quando as doses de boro estavam combinadas com as menores doses de cálcio.

Trabalhos de Drake et al. (1941) demonstraram a importância da relação cálcio: boro nas plantas para o controle da deficiência no micronutriente. Esses pesquisadores observaram que nas plantas de tabaco que receberam adequado fornecimento dos nutrientes, a relação Ca: B era da ordem de 340:1. Nas plantas onde foram observados sintomas de deficiência de boro a relação Ca:B era da ordem de 500:1.

Yamanouchi (1971) verificou que não há relação entre as concentrações de boro e cálcio solúveis em água dentro da planta, mas que a interação cálcio x boro insolúveis em água é altamente significativa. Cálcio e boro insolúveis estão presentes em maior concentração na parede celular das plantas superiores.

Teasdale e Richards (1990), estudando a relação entre cálcio e boro na estrutura e parede celular de *Pinus radiata*, constataram que esses nutrientes podem atuar como aceptores concorrentes na parede celular, sendo que o boro tem uma ligação mais forte que o cálcio, evidenciando o papel desse micronutriente na biossíntese da parede celular. O trabalho desses pesquisadores suporta a idéia de que as ligações do boro com os polissacarídeos, pectinas ou polímeros glicoproteicos da parede celular propiciem locais específicos de ligação para o cálcio e o magnésio nessa estrutura vegetal.

Matoh e Kobayashi (1998) realizaram extração dos componentes inorgânicos da parede celular de folhas de rabanete. Após a lavagem das folhas com a solução extratora de sulfato de sódio (1,5%) foi verificado que 96%, 13% e 6%, respectivamente de cálcio, boro e polissacarídeos pécicos foram liberados da parede celular, sendo que nessas condições a parede teve o tamanho dobrado, demonstrando a importância e a relação entre esses nutrientes para a manutenção da integridade dessa estrutura vegetal.

Yamauchi et al. (1986), em trabalho sobre a distribuição do cálcio e do boro em frações de pectina da parede celular de folhas de tomate, realizaram extração subcelular dos tecidos foliares e verificaram que o padrão de distribuição desses dois nutrientes na parede celular são muito similares, sendo que 72% da concentração de cálcio total e 67% da concentração de boro total foram encontrados ligados à parede celular das plantas.

Clarkson e Hanson (1980) propuseram que o boro possua efeito estabilizador nos complexos de cálcio com a lamela média, de fundamental importância para a manutenção da estrutura da parede celular.

Matoh et al. (1993) identificaram o complexo boro-rhamnogalacturônico-II como o principal polissacarídeo pécico ligado ao boro, presente na parede celular das plantas superiores. A ligação B-RGH-II é essencial para a manutenção da integridade de toda a cadeia pécica da parede. Dando continuidade aos estudos das ligações B-RGH II nas folhas de plantas de rabanete, Matoh e Kobayashi (1998) realizaram seqüenciamento das ligações presentes nesse complexo de polissacarídeos e constataram que além do boro havia duas moléculas de cálcio presentes no complexo.

Pesquisas recentes conseguiram reconstituir as ligações do boro com o RGH-II apenas misturando in vitro RGH-II monomérico e ácido bórico. Entretanto, na ausência de cálcio o complexo se desfez instantaneamente (KOBAYASHI et al., 1999). Van Duin et al. (1987)

determinaram que o cálcio forma complexos coordenados com diésteres borato de grupos carboxílicos polidroxihidratados.

O'Neill et al. (1996) documentaram que os complexos B-RGH-II de células de folhas de plátano (*Musa paradisiaca*) e hastes de ervilha (*Pisum sativum*) contém cátions divalentes como Mg, Ca, Sr, Ba e Pb. A presença desses cátions e do zinco também foi observada nos complexos B-RGH-II da parede celular de plantas de beterraba e de bambu (MATSUNAGA et al., 1997). Em todos esses trabalhos os pesquisadores demonstraram que os dímeros de B-RGH-II são reconstituídos espontaneamente pela mistura de monômeros de RGH-II com o boro. Entretanto, na ausência de cátions divalentes, principalmente o cálcio, o complexo se decompunha rapidamente. Os autores sugerem que a ligação do boro com os complexos RGH-II depende de um adequado fornecimento de cálcio, que favorece a manutenção das ligações B-RGH-II na parede celular. O cálcio estabiliza o complexo B-RGH-II por meio da coordenação das ligações formadas.

Kobayashi et al. (1999), estudando a interação cálcio x boro e rhamnogalacturona II na parede celular de plantas de rabanete, observaram que a extensão da formação das ligações borato-rhamnogalacturona II dimérico foi estimulada pela presença do cálcio. O complexo formado na presença desse macronutriente foi mais estável do que o formado apenas com boro e monômeros de rhamnogalacturona II. A remoção do cálcio dessas ligações induziu a liberação de boro das ligações pécticas da parede celular e decomposição dos complexos. Esses autores realizaram uma reconstituição dos complexos B-RGH-II, misturando monômeros de RGH-II e ácido bórico, e observaram que na presença de cálcio a relação foi de 1,3 mol de Ca para 1,0 mol de B. Esses resultados sugerem que o cálcio seja um componente normal desses complexos e que tanto o cálcio quanto o boro sejam fundamentais na retenção dos polissacarídeos pécticos da parede celular, devido as suas ligações com o RGH-II. Resultados similares foram obtidos por Fleischer et al. (1999) em trabalho com polissacarídeos pécticos de rhamnogalacturona II para espécies de gramíneas.

Pesquisas conduzidas por Ferreira et al. (2006) mostraram alta correlação entre os íons de cálcio e o teor de ácido galacturônico, presentes na parede celular de frutos de azeitona. Tem sido sugerido que a interação cálcio x ácido galacturônico seja responsável pela estabilização dos complexos B-RGH-II da parede celular das plantas superiores (KOBAYASHI et al., 1999),

aproximando os monômeros de RGH-II para a dimerização com o boro (PEREZ; RODRIGUES-CARVAJAL; DOCO, 2003).

Kobayashi et al. (1999) determinaram o padrão de distribuição de cálcio, boro e RGH-II na parede celular das plantas de azeitona e verificaram os mesmos padrões de distribuição para esses dois nutrientes e para o 2-keto-3-deoxiaçúcar, considerado o monossacarídeo diagnóstico da RGH-II e comprovando a interdependência existente entre esses três componentes. Esses autores sugeriram que as cadeias pécticas da parede celular são interligadas devido às ligações B-RG-II, sendo os íons de cálcio presentes nessas ligações os responsáveis pela coordenação e estabilização desse processo, favorecendo a formação de uma cadeia péctica supramolecular.

Considerando-se as semelhanças de funções dos nutrientes cálcio e boro, bem como as relações observadas entre ambos na parede celular das plantas superiores fica evidente a necessidade de estudos mais aprofundados sobre as relações entre os nutrientes ao nível fisiológico, buscando-se entender melhor as funções desses nutrientes, as interações existentes entre os mesmos e as alterações causadas na parede celular pela deficiência ou excesso dos mesmos, visando o adequado manejo nutricional da planta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no Departamento de Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo.

3.2 Instalação e condução do experimento

Sementes de soja-perene (*Neonotonia wightii* cv. Comum) foram colocadas para germinar em bandejas plásticas, contendo areia lavada com água desionizada. Quando as mudas atingiram 12 cm de altura foram transplantadas quinze mudas por vaso plástico, com capacidade de 3,6 litros, contendo quartzo moído como substrato. Inicialmente cada vaso permaneceu por três dias com solução de concentração correspondente a 25% da definitiva para cada combinação Ca x B. Após esse período ocorreu a substituição pela solução definitiva. As soluções foram trocadas a cada 14 dias.

Desbastes foram realizados até permanecerem cinco mudas por vaso, iniciando-se com a retirada de três plantas por dia até atingirem nove plantas por vaso, quando então foram desbastadas duas mudas por dia até restarem cinco plantas por vaso.

As soluções eram circuladas três vezes ao dia para que houvesse aeração das raízes das plantas e no início da noite eram drenadas para recipientes receptores, onde permaneciam até a manhã seguinte. O volume de cada recipiente contendo a solução foi completado toda manhã, com água desionizada.

3.3 Soluções nutritivas

As plantas foram submetidas às combinações de cinco doses cálcio (0,5; 2,75; 5,00; 7,25 e 9,50 mmol L⁻¹) com cinco doses de boro (10; 30; 50; 70 e 90 µmol L⁻¹). As soluções nutritivas

foram preparadas a partir da solução completa de Sarruge (1975), modificada para atender as doses de boro e de cálcio (Tabela 1).

Tabela 1 - Volumes pipetados das soluções estoque, para o preparo de cada solução, de acordo com as doses de cálcio e boro empregadas no experimento

Solução estoque**	10 0,50	10 5,00	10 9,50	30 2,75	30 7,25	50 0,50	50 5,00	50 9,50	70 2,75	70 7,25	90 0,50	90 5,00	90 9,50
KH ₂ PO ₄	1*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
KNO ₃	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0	4,5	9	2,25	6,75	0	4,5	9	2,25	6,75	0	4,5	9
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NH ₄ .NO ₃	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Micronutrientes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₃ BO ₃ ***	1	1	1	3	3	5	5	5	7	7	9	9	9
Fe-EDTA	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* Volume pipetado em mililitros para cada litro de solução nutritiva

** Solução estoque, com concentração de 1 mol L⁻¹, exceto micronutrientes (MgCl₂.4H₂O, 1,81; ZnCl₂, 0,10; CuCl₂, 0,01; H₂MoO₄.H₂O, 0,02 g L⁻¹) e Fe-EDTA (26 g de EDTA dissódico em 286 mL de NaOH 1 mol L⁻¹, misturado com 24 g de FeSO₄.2H₂O)

*** Solução estoque de H₃BO₃: 62 g de ácido bórico em 1L de água desionizada

Empregou-se um estudo de superfície de resposta baseado em desenho experimental composto central modificado de um fatorial 5x5 fracionado, de acordo com Littell e Mott (1975). Conforme esse esquema obtiveram-se 13 combinações entre as doses de cálcio e boro, em mmol L⁻¹/μmol L⁻¹, assim definidas: 0,50-10; 5-10; 9,50-10; 2,75-30; 7,25-30; 0,50-50; 5,00-50; 9,50-50; 2,75-70; 7,25-70; 0,50-90; 5,00-90 e 9,50-90. O delineamento experimental adotado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições.

3.4 Corte das plantas

As plantas foram submetidas a dois cortes. O primeiro corte das plantas foi realizado 46 dias após o transplante das mudas e o segundo 38 dias após o primeiro. Os tecidos vegetais das plantas de soja-perene foram coletados separadamente, sendo divididos da seguinte forma: as três folhas trifolioladas completamente expandidas, contadas a partir do ápice da planta (designadas nesse trabalho como ponteiros das plantas), e o restante da parte aérea (designada como porção inferior das plantas).

Logo após a separação das partes vegetais realizou-se a determinação da área foliar dos limbos foliares com o auxílio do integrador de área foliar LICOR-3000. Todo material vegetal coletado foi secado por 72 horas em estufa de 65°C com circulação forçada de ar e, em seguida foi pesado, moído em moinho tipo Wiley e acondicionado em sacos plásticos para as determinações laboratoriais.

Durante o segundo crescimento das plantas foram coletados tecidos foliares das plantas de soja-perene, situados na região intermediária da planta, entre a 3^a e 8^a folha trifoliolada completamente expandidas contadas a partir do ápice da planta, para realização das análises dos carboidratos e os estudos anatômicos da parede celular.

Após o segundo corte das plantas realizou-se a separação das raízes do substrato, utilizando-se água corrente e peneiras de malha de 0,25 e 1,00 mm para evitar perdas de material. Após a separação, as raízes foram lavadas com água desionizada e uma parcela, de aproximadamente 20% do total de massa fresca, foi separada para as medições radiculares, de acordo com Rossiello et al. (1995).

3.5 Medições radiculares

A parcela de raízes separada e guardada em recipientes plásticos com água desionizada foi colorida com violeta genciana a 50 g L⁻¹. Em seguida essas raízes foram distribuídas sobre transparências, de tal forma a se evitar sobreposição e foram digitalizadas. As imagens das raízes coloridas, digitalizadas foram submetidas ao aplicativo SIARCS (Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo) versão 3.0, para determinar o comprimento e a superfície radicular, utilizando-se a metodologia de Crestana et al. (1994). Posteriormente determinou-se a massa seca dessas sub-amostras de raízes, com o objetivo de corrigir os resultados em função do total de massa seca das raízes.

3.6 Determinações de nutrientes

As determinações de potássio, cálcio, magnésio e manganês em cada fração da parte aérea e das raízes foram determinadas a partir da digestão nítrico-perclórica e a concentração de boro

foi determinada pela digestão por via seca, conforme metodologia descrita por Sarruge e Haag (1974). As concentrações dos nutrientes foram obtidas a partir da fotometria de chama, para o potássio, da espectrofotometria de absorção atômica para o cálcio, magnésio e manganês pela colorimetria da Azometina-H para o boro.

3.7 Determinação dos carboidratos da parede celular em tecido foliar de soja-perene

3.7.1 Quantificação das hemiceluloses

Para a determinação via HPAE-PAD (*High Performance Anion Exchange-Pulsed Amperometric Detection*) das concentrações das hemiceluloses (arabinose, rhamnose, galactose, glicose, xilose e manose) e dos ácidos urônicos (ácido galacturônico e ácido glucurônico) da parede celular primária das folhas de soja-perene, aproximadamente 500 mg de tecido foliar da região intermediária das plantas, situada entre a 3^a e 8^a folhas trifolioladas completamente expandidas contadas a partir do ápice da planta, foram coletados e macerados em cadinhos de porcelana sob nitrogênio líquido, com auxílio de um pistilo. Cada amostra foi transferida para tubo tipo *Falcon*TM (15 mL) nos quais foram adicionados 10 mL de etanol 80% (v/v) para lavagem e remoção dos extrativos e componentes não estruturais. Durante esse processo os tubos foram mantidos em banho-maria por 50 minutos a 80°C. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2348 g. Esse processo de lavagem foi repetido por mais quatro vezes. Para a remoção de resíduos de amido adicionou-se uma solução de DMSO (dimetilsulfóxido) 90% (v/v), com incubação a 30 °C por 24 horas. Após esse período o material foi lavado mais três vezes com água “milliq” de acordo com a metodologia descrita por Selvendran e O'Neill (1987). Ao término das lavagens, o material foi liofilizado por 48 horas, até completa secagem do resíduo de parede celular.

Para a hidrólise das hemiceluloses adotou-se a metodologia de Dubois et al. (1956). Pesou-se aproximadamente 5 mg do resíduo de parede celular, transferindo 2 mL para um tubo “*ependorf*”, ao quais adicionou-se 1,5 mL de 2 mol L⁻¹ de TFA (ácido trifluoroacético). Após homogeneização, os tubos foram mantidos em autoclave a 120 °C e 15 psi por 90 minutos. Em seguida as amostras foram resfriadas em banho de gelo e centrifugadas por 10 minutos a 5435 g. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi submetida à secagem a vácuo a 30 °C por 12 horas no

“*concentrator 5301 eppendorf*” para completa remoção do TFA e o pélete restante foi reservado para a quantificação da celulose. O precipitado resultante da secagem do sobrenadante no “*concentrator 5301*” foi ressuspendido em 1 mL de água “milliq” e injetado no HPAE-PAD para a quantificação das hemiceluloses e ácidos urônicos da parede celular primária do tecido foliar.

3.7.2 Quantificação da celulose

O resíduo remanescente do ataque químico da parede celular com o TFA, utilizado na quantificação das hemiceluloses, pode ser considerado como um composto rico em cadeias de celulose (resíduo microfibrilar), sendo hidrolisado novamente para a liberação dos seus monômeros (glicose).

Para a realização da hidrólise da celulose em amostras de tecido foliar das plantas de soja-perene foi adotada a metodologia segundo TAPPI T249 cm 85 (1991) e ASTM E 1758-01 (2001). O pélete contendo o resíduo microfibrilar, foi secado a vácuo em temperatura de 30 °C por 10 horas no “*concentrator 5301 eppendorf*” até completa remoção do TFA e, posteriormente lavado com água “milliq” cinco vezes até total remoção dos resíduos de hemiceluloses. Ao término da lavagem, o pélete foi submetido novamente à secagem a vácuo. Adicionaram-se ao pélete 200 µL de H₂SO₄ 72% padronizado, de acordo com as normas TAPPI T222 cm 88 (1996). Logo após a adição do H₂SO₄ 72%, as amostras foram mantidas por uma hora a 30°C, sob agitação com bastão em intervalos de 15 minutos. Após esse período adicionou-se à amostra 1,5 mL de água “milliq”, diminuindo-se a concentração do ácido sulfúrico para aproximadamente 6 %. As amostras foram submetidas ao processo de autoclavagem (120 °C, 15 psi) por uma hora, seguido de resfriamento em banho de gelo, para completa paralisação do processo de hidrólise. As amostras foram então centrifugadas e o sobrenadante final, que contém a glicose proveniente da quebra da celulose, foi injetado no equipamento HPAE-PAD.

3.8 Parâmetros do HPAE-PAD para análise dos carboidratos

3.8.1 Parâmetros utilizados para a quantificação dos carboidratos hemicelulósicos e celulósicos

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação das amostras tratadas com TFA e H₂SO₄ 72% foram utilizados para a quantificação de monossacarídeos via HPAE-PAD, de acordo com Bragatto (2007).

As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construídas de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: L-Arabinose, L-Rhamnose, D-Galactose, D-Glicose, D-Xilose e D-Manose, todos da Sigma[®], utilizando-se a L-fucose como padrão interno. Para a quantificação da celulose utilizou-se D-Glicose como padrão, com a utilização do fator de correção 0,9. Essas determinações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex[®] equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste utilizado foi H₂O “milliq” e o eluente de limpeza foi de NaOH de 200 mmol L⁻¹, com fluxo de 1 mL min⁻¹, a pressão no sistema foi de aproximadamente 2500 psi. O eluente de pós-coluna utilizado foi de NaOH de 300 mmol L⁻¹ com pressão de gás nitrogênio externo de 20 psi. As amostras foram injetadas com volume de 25 µL determinado pelo “loop” de amostragem. A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250 mm), com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50 mm) e o detector amperométrico associado ao eletrôdo de ouro foi ajustado com os seguintes potenciais: +100 mV (0 a 200 ms), +100 mV de integração (200 a 400 ms), -2000 mV (410 a 420 ms), +600 mV (430 ms) e -100 mV (440 a 500 ms).

3.8.2 Parâmetros utilizados para quantificação dos ácidos urônicos

Os sobrenadantes resultantes da centrifugação das amostras de tecido foliar após o tratamento com TFA foram utilizados para a quantificação do conteúdo de ácidos urônicos via HPAE-PAD, de acordo com a metodologia descrita por Bragatto (2007). Para a quantificação dos ácidos urônicos, construiu-se uma curva de concentração para cada ácido urônico de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões: ácido D-Glucurônico (Sigma[®]) e

ácido D-Galacturônico (Fluka®). Essas determinações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex® equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. Para as separações dos ácidos urônicos o eluente de arraste foi uma mistura de NaOH de 100 mmol L⁻¹ com NaOAc de 150 mmol L⁻¹, e o eluente de limpeza foi de NaOH de 200 mmol L⁻¹ com fluxo de 1 mL min⁻¹ e pressão de aproximadamente 2500 psi. As amostras foram injetadas com volumes de 25 µL determinado pelo “loop” e a coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex® CarboPac PA1 (4 x 250 mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50 mm).

3.9 Cortes histológicos

No segundo período de crescimento tecidos foliares da região intermediária da planta, situada entre a 3^a e o 8^a folhas trifolioladas completamente expandidas, contadas a partir do ápice das plantas, foram fixados por 48 horas em solução de Karnovski (KARNOVSKI, 1965). Em seguida essas amostras foram levadas a uma bomba a vácuo para retirada total do ar dos espaços intercelulares.

Depois de retirado todo o ar dos espaços intercelulares, as amostras foram desidratadas por meio de soluções alcoólico-etílicas (com concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%), permanecendo em cada uma delas por 10 minutos.

Uma vez desidratadas as amostras foram colocadas em moldes de plástico contendo resina glicol metacrilato da Reichert-Jung®, formando estruturas sólidas regulares. Os blocos resultantes foram seccionados a 0,5 µm de espessura, com uso de navalhas de aço tipo C, acopladas a micrótomo rotativo manual. Para cada bloco foram confeccionadas aproximadamente 15 lâminas, sendo dispostos oito cortes anatômicos em cada lâmina de vidro, respeitando-se a seqüência natural de corte das estruturas.

Os cortes foram posteriormente corados com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) por 15 minutos e montados em resina sintética Entellan (Merck) e cobertos com lamínulas de vidro. A partir daí, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico acoplado à câmara fotográfica para captura de imagens, com a devida escala métrica identificada.

3.10 Análises estatísticas

Os resultados foram digitados em planilha eletrônica e as análises estatísticas foram executadas com o auxílio do programa “SAS” (SAS INSTITUTE, 2000). Inicialmente utilizou-se o teste F e em seguida, nos casos de significância da interação doses de cálcio x doses de boro, as análises de regressão polinomial (superfície de resposta), por meio do procedimento RSREG. Para as variáveis-resposta nas quais a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa, efetuaram-se as análises de regressão para as doses de cada nutriente. As médias de produção de massa seca da parte aérea foram comparadas, nas mais variadas combinações entre elas, por contraste. Para a concentração de carboidratos na parede celular também foram efetuadas análises de correlação com as concentrações de cálcio e de boro da porção inferior das plantas de soja-perene. Adotou-se o nível de significância de 5% em todos os casos analisados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros produtivos

4.1.1 Produção de massa seca da parte aérea

Na análise de variância para a produção de massa seca da parte aérea, verificou-se que a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa nos dois cortes da soja-perene. No estudo dos efeitos isolados de cada um dos nutrientes não se constatou efeitos estatisticamente significativos das doses de cálcio e de boro na produção de massa seca das plantas, tanto para o primeiro quanto para o segundo cortes e o mesmo também foi constatado quando se tratou de contrastar as médias das produções obtidas nas doses estudadas (Figuras 2 a 5).

Figura 2 – Produção de massa seca da parte aérea no primeiro corte da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva (a = médias, comparadas por contraste a 5 % não diferiram significativamente entre si)

Figura 3 – Produção de massa seca da parte aérea no primeiro corte da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva (a = médias, comparadas por contraste a 5 % não diferiram significativamente entre si)

Figura 4 – Produção de massa seca da parte aérea no segundo corte da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva (a = médias, comparadas por contraste a 5 % não diferiram significativamente entre si)

Figura 5 – Produção de massa seca da parte aérea no segundo corte da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva (a = médias, comparadas por contraste a 5 % não diferiram significativamente entre si)

Análises da concentração de nutrientes na água desionizada utilizada no preparo das soluções nutritivas não constatarem concentrações de cálcio e de boro que pudessem interferir no fornecimento desses nutrientes nas combinações estudadas. Uma possibilidade que deve ser considerada é o fato da soja-perene ser uma planta fixadora de nitrogênio, sendo colocada em cultivo em solução nutritiva, onde o nitrogênio é prontamente disponível, ter mostrado menor exigência em cálcio e boro, que foi atendida pelas doses mais baixas desses nutrientes. Uma possível reserva de cálcio e boro na semente também pode ter contribuído com o fornecimento desses dois nutrientes para a planta.

Haddad e Kaldor (1982) pesquisaram o desenvolvimento de plantas de alfafa em solos aluviais e de origem basáltica e não constatarem aumentos significativos na produção de massa seca das plantas devido ao suprimento de boro. Resultados similares foram obtidos por Otsubo (1993), em experimento em casa de vegetação, com plantas de alfafa cultivadas em um latossolo vermelho escuro com fornecimento de calcário e de boro.

Gontarski (1991), em estudo sobre limitações de fertilidade em um latossolo vermelho-amarelo para o cultivo de macrotiloma (*Macrotyloma axillare*) e galaxia (*Galactia striata*) também não constatou diferenças significativas para a produção de massa seca das plantas que receberam o tratamento completo e as que não receberam o boro.

Freitas (1969) relatou que algumas espécies forrageiras tropicais podem produzir quantidades apreciáveis de massa seca em condições de baixo fornecimento de cálcio. Brazon (1971), trabalhando com plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) em um latosso vermelho amarelo, verificou que a aplicação de calcário não teve efeitos significativos na produção de massa seca das plantas.

Norris (1964), em experimentos com plantas de *Centrosema pubescens* e *Pueraria phaseoloides*, relatou que o incremento na produção de massa seca das plantas devido à adição de cálcio esteve mais relacionado com a liberação de molibdênio do que aos efeitos do cálcio na planta. Esse pesquisador ainda descreveu que os aumentos de produção poderiam ser obtidos igualmente pela adição de molibdato de sódio.

Werner (1986) salientou que as diversas espécies de leguminosas, bem como variedades dentro de uma mesma espécie, variam em tolerância à acidez e, portanto, possuem diferentes necessidades de cálcio. Neme e Lovadini (1967) pesquisaram os efeitos do calcário (doses de 4.000, 6.000 e 8.000 kg ha⁻¹) no desenvolvimento da soja-perene e não constataram diferenças significativa na produção de massa seca das plantas devido ao emprego dessas doses.

4.1.2 Área foliar

Na análise de variância para a área foliar, verificou-se que a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa, tanto no material coletado à época do primeiro quanto do segundo corte da soja-perene. Estudando-se os efeitos isolados do suprimento de cálcio e boro, constatou-se variação segundo modelo linear na área foliar da soja-perene, em função tanto de doses de boro quanto de cálcio, para o primeiro corte (Figuras 6 e 7). Para o segundo corte não se constatou efeito significativo das doses dos nutrientes na área foliar das plantas.

Figura 6 – Área foliar no primeiro corte da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Figura 7 – Área foliar no primeiro corte da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Trabalhos na literatura sobre a ação do cálcio e do boro na parte aérea das plantas, levando em conta os efeitos desses nutrientes na morfologia das folhas, destacam a importância dos mesmos para a obtenção de plantas dotadas de grande área foliar, estabelecendo condições para alta atividade fotossintética, visando a produção de massa foliar (GALLAHER et al., 1976; MALAVOLTA, 1980; ROSOLEM, 1980 e GUPTA, 1993).

França et al. (1973) verificaram os efeitos do boro no desenvolvimento da soja-perene Tinaroo cultivada em um latossolo vermelho escuro e constataram efeitos significativos desse micronutriente na área foliar das plantas.

Monteiro et al. (2003), em trabalho sobre características morfogênicas do capim-Aruana em resposta ao suprimento de boro, relataram aumentos significativos na área foliar das plantas devido ao fornecimento desse micronutriente em solução nutritiva. Dentre as cinco doses de boro (0,0625; 0,1250; 0,2500; 0,500 e 1,0000 mg L⁻¹) fornecidas às plantas, o maior incremento nessa variável ocorreu entre a não aplicação de boro e a dose de 0,1250 mg L⁻¹.

Rodrigues et al. (1993), em pesquisa sobre o desenvolvimento de *Stylosanthes guyanensis* “Cook” com o fornecimento de quatro doses de cálcio (0; 66,66; 133,33 e 200 mg L⁻¹), verificaram aumentos lineares na área foliar das plantas em função do incremento nas doses de cálcio aplicadas.

Silveira (2005), estudando a nutrição do capim-Tanzânia (*Panicum maximum*) com variável disponibilidade de cálcio, obteve aumentos lineares na área foliar das plantas em resposta ao suprimento de cálcio na solução nutritiva. Essa autora também observou que o fornecimento de cálcio foi fundamental para a maximização da área foliar do capim quando se combinou doses de cálcio com doses de nitrogênio. Os resultados de Rodrigues (2002) também enfatizam a importância do cálcio para a maximização da área foliar de plantas forrageiras quando adubadas com nitrogênio.

4.1.3 Número de folhas

Estudando-se os efeitos do suprimento de cálcio e de boro no número de folhas da soja-perene, observou-se que houve significância apenas para as doses de boro no primeiro período de crescimento. Houve incremento linear no número de folhas em função do aumento nas doses de boro, demonstrando que a dose de 90 µmol L⁻¹ de boro não foi suficiente para maximizar a produção de folhas da soja-perene (Figura 8).

Figura 8 – Número de folhas no primeiro crescimento da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Schunke (1980), em experimento sobre crescimento e composição química da *Galactia striata*, trabalhou com três doses de boro (0; 0,5 e 2,5 mg L⁻¹) fornecidas em solução nutritiva e verificou que a dose de boro de 2,5 mg L⁻¹ resultou em maior número de folhas da leguminosa.

França et al. (1973) também verificaram aumentos no número de folhas da soja-perene Tinaroo devido ao suprimento de boro. Monteiro et al. (2003) estudaram cinco doses de boro (0,0625; 0,1250; 0,2500; 0,500 e 1,0000 mg L⁻¹) no crescimento do capim-Aruana e observaram que a dose de 0,1250 mg L⁻¹ propiciou os maiores aumentos no número de folhas, em relação à não aplicação desse micronutriente.

4.1.4 Produção de massa seca de raízes

A interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa para a produção de massa seca de raízes da soja-perene. O estudo dos efeitos isolados do suprimento de cálcio e boro mostrou variação significativa na produção de massa seca de raízes em função das doses de boro. A produção de massa seca de raízes se ajustou a uma equação do segundo grau, sendo a produção máxima atingida na dose de boro de 68 μmol L⁻¹ (Figura 9).

Figura 9 – Produção de massa seca de raízes da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

França et al. (1973) estudaram o efeito de micronutrientes, magnésio e calagem na soja-perene Tinaroo cultivada em um latossolo vermelho-escuro e verificaram que o boro foi o micronutriente, que quando aplicado isoladamente e em presença de calagem, determinou os maiores acréscimos na produção de massa seca de raízes.

Werner (1979) trabalhou com doses de boro variando de 0 a 1 mg kg⁻¹ aplicadas a dois tipos de solo da Flórida cultivados com dois tipos de estilosantes (*Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes hamata*) e verificou redução na produção de massa seca de raízes nas plantas que receberam a maior dose de boro.

Werner e Mattos (1974), em experimento sobre a aplicação de micronutrientes em plantas de soja-perene, constataram aumentos na produção de massa seca das plantas devido ao suprimento de boro.

Bonfim da Silva et al. (2004), estudando as respostas do capim-Tanzânia submetido a doses de boro, verificaram aumento na produção de massa seca de raízes em função do suprimento desse micronutriente em solução nutritiva. Vendemiatti et al. (2001), ao estudarem os efeitos de doses de boro no *Panicum maximum* cv. Aruana, constataram respostas significativas na produção de massa seca de raízes do capim, devido ao suprimento de boro.

Santos et al. (2003), em trabalho sobre o desenvolvimento do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) submetido a cinco doses de boro em solução nutritiva (0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 μmol L⁻¹),

também constataram aumentos na produção de raízes das plantas em resposta ao boro aplicado. Entretanto, esses autores destacaram que a partir da dose de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ as diferenças encontradas não foram significativas.

França e Carvalho (1970) e Eira et al. (1972) testaram a aplicação conjunta de boro, cobre, ferro, molibdênio e zinco para plantas leguminosas forrageiras e constataram aumentos significativos na produção de massa seca de raízes devido à aplicação desses micronutrientes. Ao discutirem os resultados, esses autores levantaram a hipótese de que o boro seria, entre os micronutrientes empregados, o grande responsável pelos efeitos favoráveis observados.

Camacho-Cristóbal et al. (1999), em estudo sobre o suprimento de boro em plantas de tabaco, constataram que a deficiência desse micronutriente causou redução na massa seca de raízes das plantas e resultou em aumento significativo na relação hastes:raízes em comparação com as plantas supridas adequadamente com boro.

Vargas e Döbereiner (1974) estudaram a aplicação de doses de boro (0 a 8 kg ha^{-1}) em um podzólico vermelho-amarelo no qual cultivaram a estilosantes guyanensis e verificaram que, quando na presença da calagem, as doses de boro resultaram em significativos acréscimos na produção de massa seca das raízes dessa leguminosa.

4.1.5 Comprimento e superfície radicular

A análise de variância para a superfície e o comprimento radicular demonstrou que a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa. Observou-se significância apenas para as doses de boro, tanto para a superfície quanto para o comprimento radicular, sendo observadas em ambos os casos, variações lineares em resposta às doses de boro (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Superfície radicular da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Figura 11 – Comprimento radicular da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Os resultados de comprimento e superfície radicular da soja-perene caracterizam o papel que o boro possui no alongamento e divisão celular das plantas. A deficiência de boro inibe rapidamente o alongamento das células do tecido radicular (GUPTA, 1993; MARSCHER, 1995; MENGEL; KIRKBY 2001).

Malavolta (1980), descrevendo as funções dos micronutrientes, destacou que o boro é essencial para o desenvolvimento de raízes e pontos de crescimento das plantas, atuando nos processos de multiplicação celular dos tecidos vegetais.

Bohnsack e Albert (1977) verificaram que a deficiência de boro reduziu o alongamento celular em plantas de abóbora (*Cucurbita pepo*) em um período de três horas após o suprimento de boro ter sido removido do meio, sendo que em 24 horas houve inibição completa do alongamento radicular das plantas. Quando o suprimento desse micronutriente foi estabelecido novamente, o alongamento radicular foi recuperado dentro de 18 horas. Esses resultados corroboram os apresentados por outros autores em estudos com outras espécies vegetais (DAVE; KANNAN, 1981; MOORE; HIRSCH, 1983; KRUEGER et al., 1987). Redução no alongamento radicular devido ao suprimento inadequado de boro também foi documentado por Kouchi e Kumazawa (1976), em plantas de tomate.

4.2 Concentração de nutrientes no ponteiro das plantas

4.2.1 Cálcio

A análise de variância para a concentração de cálcio demonstrou que a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa. Estudando-se os efeitos isolados do suprimento de cálcio e de boro verificou-se significância apenas para as doses de cálcio, tanto nos tecidos colhidos no primeiro quanto no segundo corte da soja-perene.

Nos ponteiros amostrados na ocasião do primeiro corte das plantas a concentração de cálcio se ajustou a uma equação do segundo grau em função das doses de cálcio, sendo que a maior concentração de cálcio ($6,50 \text{ g kg}^{-1}$) foi obtida com a dose de cálcio de $8,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 12). Para os ponteiros do segundo corte da leguminosa observou-se variação linear da concentração de cálcio em resposta às doses de cálcio (Figura 13).

Figura 12 – Concentração de cálcio no ponteiro da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Figura 13 – Concentração de cálcio no ponteiro da soja-perene no segundo corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Carriel et al. (1983), em experimento com a soja-perene cultivar Comum em um latossolo vermelho-escuro, testaram os efeitos da correção do solo com uma mistura de CaO e MgO e

verificaram aumentos significativos na concentração de cálcio das plantas, devido a adição do corretivo ao solo.

Colozza e Werner (1984) estudaram os efeitos da aplicação da mistura de CaO com MgO, em um podzólico vermelho-amarelo “intergrade” para latossolo vermelho-amarelo, no desenvolvimento da soja-perene cultivar Tinaroo. As doses do corretivo aplicadas resultaram em pH em água do solo de 4,7; 5,7 e 6,4 e em cálcio trocável de 0,4; 2,2 e 3,7 mmol_c dm⁻³. Esses autores também verificaram aumentos significativos na concentração de cálcio na parte aérea da leguminosa colhida, as quais foram da ordem de 4,0; 10,5 e 11,9 g kg⁻¹ em função das doses do corretivo aplicadas.

Premazzi (1991) trabalhou com um latossolo vermelho-amarelo distrófico, cultivando várias forrageiras tropicais, dentre as quais estava a soja-perene Tinaroo, e avaliou o crescimento dessas plantas forrageiras em resposta à saturação por bases no solo. A autora verificou aumentos na concentração de cálcio nas plantas de soja-perene em função das doses de corretivo aplicados de acordo com um modelo quadrático.

Monteiro (1993), em experimento com doses de cálcio e de magnésio para a soja-perene Tinaroo, cultivada em um latossolo vermelho-amarelo distrófico, verificou aumento significativo na concentração de cálcio na parte aérea das plantas em resposta às doses de cálcio, sendo essa variação ajustada a modelo linear e a modelo quadrático, para o primeiro e segundo período de crescimento das plantas, respectivamente. Nesse trabalho a concentração de cálcio no ponteiro variou entre 5,6 e 9,7 g kg⁻¹ e entre 2,9 e 7,6 g kg⁻¹ para os ponteiros da soja-perene coletados na ocasião do primeiro e segundo corte das plantas, respectivamente.

Considerando-se os padrões nutricionais sugeridos por Malavolta et al. (1997) para a cultura da soja-perene verifica-se que as concentrações de cálcio observadas tanto na primeira quanto na segunda amostragens das plantas de soja-perene estão abaixo das consideradas adequadas. Entretanto, durante a condução do experimento não foram observados sintomas visuais que caracterizassem a deficiência desse macronutriente.

4.2.2 Boro

Houve variação significativa na concentração de boro nos ponteiros da soja-perene apenas em função das doses de boro. Tanto no tecido vegetal coletado no primeiro quanto no segundo corte das plantas os resultados para a concentração de boro ajustaram-se a modelo quadrático, sendo que as máximas concentrações de boro foram obtidas na dose de boro de 87,80 e 70,37 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente para o primeiro e segundo corte das plantas (Figuras 14 e 15). Esses resultados corroboram os de outros autores (OYEWOLE; ADUAYI, 1992; GUPTA; MACLEOD, 1977). Capoani (2001), estudando doses de cálcio e de boro em solução nutritiva para dois cultivares de girassol (*Helianthus annuus*), verificou aumentos na concentração de boro da ordem de 10 a 200 mg kg^{-1} , dependendo da dose de boro e da parte vegetal analisada.

Figura 14 – Concentração de boro no ponteiro da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Figura 15 – Concentração de boro no ponteiro da soja-perene no segundo corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Morikawa (1993) estudou as limitações nutricionais de boro para *Brachiaria brizantha* e *Andropogon gayanus* num latossolo variação Una da região dos Campos das Vertentes em Minas Gerais e verificou aumentos significativos na concentração desse micronutriente na parte aérea das duas gramíneas avaliadas devido à adubação com boro.

No presente trabalho as concentrações de boro no ponteiro das plantas de soja-perene, para o primeiro e segundo corte das plantas, variaram entre 15 e 60 mg kg⁻¹. Em pesquisas com plantas de alfafa, consideradas muito exigentes nesse micronutriente, alguns autores observaram variações entre 11 a 66 mg kg⁻¹ (SANTOS et al., 2004), sendo muito próximas às observadas neste experimento. Cihacek (1994) recomendou concentrações de boro entre 30 e 80 mg kg⁻¹ como sendo adequado ao desenvolvimento da alfafa. Malavolta et al. (1997) consideraram a faixa de concentração de boro entre 40 a 60 mg kg⁻¹ como a recomendada para a nutrição adequada da soja-perene.

4.2.3 Potássio

A interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa para a concentração de potássio no ponteiro das plantas de soja-perene. O estudo do efeito isolado das doses de cada um desses nutrientes revelou variação significativa para a concentração de potássio em função das doses de boro, tanto para as amostras do primeiro quanto do segundo corte das plantas.

No material coletado no primeiro corte da soja-perene, a concentração de potássio no ponteiro das plantas se ajustou a uma equação do segundo grau sendo que a menor concentração de potássio foi obtida na dose de boro de 53,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 16). Nos tecidos coletados à época do segundo corte houve aumento linear da concentração de potássio em função do incremento nas doses de boro (Figura 17).

Figura 16 – Concentração de potássio no ponteiro da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Figura 17 – Concentração de potássio no ponteiro da soja-perene no segundo corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Estudos referentes à relação entre potássio e boro são escassos na literatura. Reeve e Shive (1943 e 1944), em estudos com plantas de tomate, e Hill (1975), em pesquisa sobre amendoim, verificaram alterações na concentração desses nutrientes devido a excesso ou deficiência de boro e de potássio supridos em solução nutritiva. Entretanto esses pesquisadores não observaram conformidade nos resultados, sendo constatados aumentos e decréscimos nas concentrações foliares desses nutrientes em função das doses aplicadas.

Werner (1979) observou aumentos significativos na concentração de potássio na parte aérea das leguminosas forrageiras *Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes hamata*, devido à aplicação de boro em três tipos de solos estudados. Entretanto, França et al. (1973) obtiveram diminuição na concentração de potássio em plantas de soja-perene quando aplicaram boro.

Camacho-Cristóbal et al. (1999) estudaram o suprimento de boro para plantas de tabaco e verificaram que nos tratamentos em que houve omissão desse micronutriente a concentração dos nutrientes catiônicos cálcio, magnésio e potássio foi inferior à observada no tratamento completo e, particularmente para o potássio, a concentração foi significativamente reduzida nos tecidos foliares das plantas deficientes em boro.

Os mecanismos envolvidos na interação potássio x boro ainda não estão adequadamente detalhados. Problemas de toxicidade de boro têm sido registrados em condições de alto suprimento de potássio, sendo que em condições de baixos teores de boro no solo, adubações

potássicas em excesso têm intensificado os problemas de deficiência no micronutriente. (GUPTA, 1993).

4.2.4 Magnésio

Não foi observada significância para a interação doses de cálcio x doses de boro para a concentração de magnésio no ponteiro das plantas de soja-perene, em ambas as épocas de coleta das amostras. Entretanto, houve variação significativa na concentração de magnésio nessa parte da leguminosa em resposta às doses de cálcio fornecidas na solução nutritiva.

No material colhido no primeiro corte das plantas houve variação na concentração de magnésio de acordo com um modelo quadrático em resposta às doses de cálcio (Figura 18). A menor concentração de magnésio ($1,28 \text{ g kg}^{-1}$) no tecido do primeiro corte foi obtida na dose de cálcio de $7,40 \text{ mmol L}^{-1}$. No tecido amostrado no segundo corte, a redução na concentração de magnésio em resposta as doses de cálcio ocorreu de acordo com modelo linear (Figura 19). Esses resultados comprovam o efeito antagônico existente entre os nutrientes cálcio e magnésio.

Figura 18 – Concentração de magnésio no ponteiro da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Figura 19 – Concentração de magnésio no ponteiro da soja-perene no segundo corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Andrew e Johnson (1976) estudaram o efeito da combinação de três doses de cálcio, quatro valores de pH e duas doses de nitrogênio mineral na composição química de plantas de soja-perene cultivar Cooper e verificaram decréscimos significativos na concentração de magnésio na leguminosa forrageira, com o aumento de cálcio no substrato.

John et al. (1972) evidenciaram que, com a adição de corretivo da acidez para elevar a saturação por bases do solo a 100%, a concentração de magnésio na parte aérea das plantas de alfafa (*Medicago sativa*) foi reduzida pela metade quando comparada com o tratamento que não recebeu corretivo. Esses autores sugeriram que o declínio na concentração de magnésio deva ter sido devido ao antagonismo do cálcio em relação ao magnésio.

Schunke (1980) trabalhou com a *Galactia striata* submetida ao fornecimento de boro, potássio, cálcio em solução nutritiva e constatou redução nas concentrações foliares de magnésio nas plantas que receberam a dose de cálcio de 600 mg kg⁻¹. Resultados de Carvalho et al. (1971), em estudo com seis leguminosas tropicais cultivadas em um latossolo vermelho-escuro, também verificaram reduções na concentração de magnésio nos tecidos foliares de todas as espécies estudadas, devido a aplicação de cálcio.

Silveira (2005) também verificou redução na concentração de magnésio nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim-Tanzânia em resposta ao suprimento de cálcio na solução nutritiva, para os três períodos de crescimento avaliados.

Ventura (1987) trabalhou com plantas de soja de variedade Paraná, em vasos com quartzo moído e solução nutritiva contendo potássio de 3; 6 e 9 mmol_c L⁻¹; cálcio de 5; 10 e 15 mmol_c L⁻¹ e magnésio de 2; 4 e 6 mmol_c L⁻¹ em combinação fatorial. Os resultados demonstraram a relação negativa existente entre esses cátions e a concentração de magnésio nas folhas superiores da soja foi reduzida de 6,3 g kg⁻¹ para 5,3 g kg⁻¹ devido ao cálcio adicionado na solução.

4.2.5 Manganês

Foi constatada variação significativa para a concentração de manganês nos ponteiros da soja-perene apenas em função das doses de boro. Tanto para a amostragem no primeiro quanto no segundo corte das plantas, a concentração de manganês se ajustou a modelo quadrático, sendo que os valores máximos de concentração de manganês foram obtidos com as doses de boro de 77,45 e de 66,23 µmol L⁻¹, respectivamente para a primeira e segunda amostragens (Figuras 20 e 21). Os valores de concentração de manganês na época do segundo corte da soja-perene foram sempre superiores aos observados no primeiro.

Os valores da concentração de manganês nos ponteiros da soja-perene encontram-se dentro da faixa considerada adequada para essa leguminosa e problemas de toxidez desse micronutriente podem ocorrer quando as concentrações no tecido vegetal forem superiores a 120 mg kg⁻¹ (Malavolta et al., 1997).

Figura 20 – Concentração de manganês no ponteiro da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Figura 21 – Concentração de manganês no ponteiro da soja-perene no segundo corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Werner et al. (1975) estudaram a aplicação de micronutrientes na forma usual e na forma de FTE, em espécies leguminosas tropicais, e verificaram sintomas visuais de toxidez de manganês em plantas de soja-perene e de toxidez de boro em estilósante. A concentração de manganês no ponteiro dessas plantas com excesso de boro era de 54 mg kg^{-1} , 114 mg kg^{-1} e

87 mg kg⁻¹, para os tratamentos controle, micronutrientes na forma FTE e micronutrientes aplicados na forma usual, respectivamente.

4.3 Concentração de nutrientes na porção inferior das plantas

4.3.1 Cálcio

A interação doses de cálcio x doses de boro foi significativa para a concentração de cálcio na porção inferior da soja-perene coletada no primeiro corte das plantas, tendo os resultados sido ajustados ao modelo polinomial. Por meio da equação de regressão polinomial observa-se que a maior concentração de cálcio foi obtida na combinação da dose de cálcio de 9,50 mmol L⁻¹ com a dose de boro de 70 µmol L⁻¹ (Figura 22). Observa-se que para todas as doses de cálcio, a partir da dose de boro de 70 µmol L⁻¹ ocorre redução na concentração de cálcio na porção inferior das plantas de soja-perene, ilustrando um possível efeito antagônico existente entre os dois nutrientes.

$$Y = 4,7488 + 0,1060*B - 0,0011*(B*B) + 0,1562*Ca + 0,0090*(Ca*Ca) + 0,0056*Ca*B$$

$$R^2=0,75$$

Figura 22 – Concentração de cálcio na porção inferior da soja-perene no primeiro corte, em função das combinações de doses de cálcio e boro na solução nutritiva

São José et al. (2003) pesquisaram a interação cálcio x boro no desenvolvimento de clones de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*), trabalharam com duas doses de boro combinadas com cinco doses de cálcio e constaram variações na exigência de cálcio nas plantas em função das doses de boro aplicadas.

Gupta (1972) verificou interação significativa para calagem x boro, na concentração de cálcio em tecidos vegetais de cevada (*Hordeum vulgaris*). Esse autor observou um aumento de pequena magnitude na concentração de cálcio nos tecidos avaliados, em resposta à aplicação do micronutriente.

Miranda (1979), em estudo sobre a aplicação de calcário e da adubação mineral no desenvolvimento do siratro, galactia e soja-perene, cultivados em um solo podzólico vermelho-amarelo e uma areia quartzosa distrófica, verificou aumentos na concentração foliar de cálcio das três espécies avaliadas em resposta à aplicação de boro. Resultados similares foram obtidos por Camacho - Cristóbal et al. (1999), em estudo sobre o suprimento de boro em plantas de tabaco.

Pesquisas de Schunke (1980), conduzidas com plantas de *Galactia striata*, e de Mattos (1972), em experimento com plantas de sirato (*Phaseolus atropurpureus* cultivar Siratro), também constataram significância para a interação cálcio x boro nas plantas estudadas, sendo verificadas variações na concentração foliar de cálcio devido ao suprimento de boro.

Para as amostras coletadas na ocasião do segundo corte das plantas a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa. Entretanto, verificou-se variação significativa na concentração de cálcio em resposta às doses de cálcio aplicadas, de acordo com modelo quadrático. A maior concentração de cálcio ($13,92 \text{ g kg}^{-1}$) seria obtida na dose de cálcio de $9,65 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 23). Silveira (2005) verificou aumentos significativos na concentração de cálcio no capim-Tanzânia, devido ao incremento de cálcio na solução nutritiva, para todos os tecidos vegetais analisados. Sutton (1993), estudando doses de calcário e de potássio para quatro cultivares de alfafa em um latossolo vermelho-amarelo distrófico, constatou aumentos na concentração de cálcio na parte aérea de todos os cultivares estudados em resposta às doses de calcário utilizadas.

Colozza et al. (1998) e Monteiro et al. (1983) também verificaram aumentos significativos na concentração foliar de cálcio devido à aplicação de calcário no solo para diversas espécies de leguminosas forrageiras tropicais.

Figura 23 – Concentração de cálcio na porção inferior da soja-perene no segundo corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

4.3.2 Boro

A concentração de boro na porção inferior das plantas de soja-perene apresentou variação significativa apenas para as doses de boro testadas. Tanto nos tecidos colhidos no primeiro quanto no segundo cortes das plantas foi observada variação na concentração de boro em função das doses de boro aplicadas, a qual ocorreu segundo um modelo quadrático (Figuras 24 e 25). Nas amostras provenientes de ambos os cortes a dose de boro de 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ proporcionou as mais elevadas concentrações de boro nesse tecido vegetal.

Figura 24 – Concentração de boro na porção inferior da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Figura 25 – Concentração de boro na porção inferior da soja-perene no segundo corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Santos et al. (2004) estudaram a nutrição e produção da alfafa cultivar Crioula em resposta ao suprimento de boro e verificaram aumentos na concentração de boro nos tecidos foliares analisados, devido ao fornecimento desse micronutriente na solução nutritiva. Esses pesquisadores observaram que os maiores incrementos de boro foram obtidos com a dose de boro

de 1,62 mg L⁻¹. Aumentos na concentração de boro em leguminosas forrageiras em tecidos vegetais, em resposta à aplicação do micronutriente também foram relatados por Smith (1970) e Rominger et al. (1975).

Otsubo (1993) verificou aumentos na concentração de boro na parte aérea de plantas de alfafa cultivadas em um latossolo vermelho escuro, da ordem de 50 a 140 mg kg⁻¹ devido à aplicação de boro, em dois períodos de crescimento da planta, sendo esses aumentos maiores para o primeiro período estudado.

Aumentos na concentração de boro nos tecidos foliares de leguminosas tropicais também foram constatados por Monteiro et al. (1980), para plantas de soja-perene Tinaroo, centrosema, siratro e galactia. Resultados similares foram obtidos por Gontarski (1991) para plantas de macrotiloma guatá e de galáxia yarana, enquanto Schunke (1980) verificou que a aplicação de boro em solução nutritiva aumentou a concentração foliar desse micronutriente nos tecidos foliares em plantas de *Galactia striata*.

Buzetti (1988), em trabalho sobre o fornecimento de boro em condições de acidez de solo para a cultura da soja, constatou aumentos lineares na concentração de boro na parte aérea da planta devido à adubação com esse micronutriente. De acordo com as doses estudadas a concentração de boro nos tecidos foliares variou de 47,5 a 84,5 mg kg⁻¹, independentemente das doses de corretivo utilizados.

Touchton et al. (1980), conduzindo experimento em quatro locais com a cultura da soja e quatro doses de boro (0; 0,56; 1,12 e 2,24 kg ha⁻¹), verificaram aumentos na concentração de boro nos tecidos foliares, variando de 30 a 70 mg kg⁻¹, quando se comparam as doses de boro de 0 e 2,24 kg ha⁻¹, respectivamente.

4.3.3 Potássio

A análise de variância para a concentração de potássio na porção inferior das plantas de soja-perene demonstrou que a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa. O estudo dos efeitos isolados para as doses de cada um dos nutrientes revelou que houve variação significativa para a concentração de potássio no material coletado no primeiro corte das plantas, em resposta às doses de cálcio. Foi observada variação na concentração de potássio em função

das doses de cálcio de acordo com um modelo quadrático (Figura 26). A menor concentração de potássio foi obtida com a dose de cálcio de 3,08 mmol L⁻¹.

Figura 26 - Concentração de potássio na porção inferior da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de boro na solução nutritiva

Monteiro (1993) trabalhou com a soja-perene Tinaroo, cultivada em um latossolo vermelho-amarelo distrófico e constatou aumentos lineares na concentração de potássio na parte aérea das plantas em função das doses de cálcio.

Werner (1979) estudou cinco doses de calcário combinadas com cinco doses de potássio, sendo essas combinações aplicadas em três tipos de solos, cultivados com duas espécies de estilósante (*Stylosanthes guianensis* e *Stylosanthes hamata*). Verificou aumentos na concentração de potássio na parte aérea das duas espécies estudadas devido à aplicação do corretivo nos solos.

Deon (2007), em experimento sobre o crescimento e nutrição mineral da soja submetida a excesso de nutrientes, relatou que quando o magnésio ou o cálcio foram adicionados à solução nutritiva acompanhados de fosfato, houve incremento na concentração foliar de potássio.

Um estudo detalhado sobre os mecanismos de absorção de íons pelo do sistema radicular conduzido por Overstreet e Jacobson (1952) destacou que o cálcio pode aumentar ou diminuir a absorção do potássio, dependendo das concentrações desses dois macronutrientes no meio.

4.3.4 Magnésio

A concentração de magnésio na porção inferior da soja-perene sofreu variação significativa em resposta às doses de cálcio, tanto nos tecidos colhidos no primeiro quanto no segundo cortes das plantas. Para ambas as ocasiões de coleta dessas amostras de soja-perene constatou-se redução na concentração de magnésio em função das doses de cálcio, comprovando o efeito antagônico existente entre os dois nutrientes. No material do primeiro corte da leguminosa essa variação foi representada por uma equação do segundo grau, sendo a menor concentração de magnésio obtida na dose de cálcio de 7,03 mmol L⁻¹ (Figura 27). No tecido vegetal amostrado no segundo corte das plantas a redução na concentração de magnésio em função das doses de cálcio se adequou a um modelo linear (Figura 28).

Figura 27 – Concentração de magnésio na porção inferior da soja-perene no primeiro corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Figura 28 – Concentração de magnésio na porção inferior da soja-perene no segundo corte, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Monteiro (1993), em pesquisa sobre o crescimento da soja-perene cultivar Tinaroo em um latossolo vermelho-amarelo distrófico, verificou decréscimos na concentração de magnésio nas plantas em função das doses de cálcio aplicadas ao solo, independentemente da estrutura vegetal avaliada. Sanzonowicz e Vargas (1980) estudaram o efeito de doses de calcário e potássio na produção e na composição química do *Stylosanthes guianensis* em um latossolo vermelho-escuro do cerrado e constataram redução na concentração de magnésio nas plantas em função das doses de corretivo.

Efeito antagônico do potássio também pode ter ocorrido na absorção de magnésio e, por conseguinte na concentração de magnésio nos tecidos amostrados da soja-perene, visto que as doses de cálcio aplicadas no primeiro período de crescimento favoreceram ao aumento na concentração de potássio nas plantas. Mattos et al. (2002) verificaram em dois cortes do capim-Tanzânia que a concentração de magnésio nas lâminas foliares analisadas mostrou redução significativa em consequência do aumento do suprimento de potássio na solução nutritiva.

De acordo com Quaggio (2000), a presença de um cátion em alta concentração exerce influência direta na absorção de outros cátions, provocando desbalanço nutricional por competição na absorção. Além disso, esse autor acrescentou que devido à relação de saturação de

íons no complexo coloidal do solo, a disponibilidade de cálcio, de magnésio ou de potássio depende mais da relação entre eles, do que da concentração isolada de cada um no solo.

4.4 Concentração de nutrientes nas raízes

4.4.1 Cálcio

De forma similar ao observado para os tecidos vegetais da parte aérea da soja-perene verificou-se variação significativa para a concentração de cálcio nas raízes em respostas às doses de cálcio aplicadas, e essa variação foi traduzida por aumento linear na concentração de cálcio nas raízes com o incremento das doses de cálcio (Figura 29). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (WERNER, 1979; PREMAZZI, 1991; MONTEIRO et al., 1995; SILVEIRA, 2005).

Mattos (1972), Monteiro et al. (1983) e Colozza et al. (1998), em detalhadas pesquisas sobre limitações de fertilidade para diversas espécies leguminosas forrageiras tropicais, constataram aumentos significativos na concentração de cálcio em todas as partes vegetais analisadas devido ao suprimento de cálcio.

Figura 29 – Concentração de cálcio nas raízes da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

4.4.2 Boro

Estudando-se os efeitos isolados do suprimento de cálcio e de boro na concentração de boro nas raízes verificou-se variação significativa para a concentração de boro em resposta às doses de boro aplicadas. Esses resultados ajustaram-se a um modelo quadrático, onde a mais alta concentração de boro foi obtida com a dose de boro de 75,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 30).

Figura 30 – Concentração de boro nas raízes da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Monteiro et al. (1980), em pesquisa sobre aplicação de micronutrientes em quatro espécies de leguminosas forrageiras, e Mattos (1972), em estudo sobre o crescimento do siratro (*Macroptilium atropurpureum*) com fornecimento de boro, também constataram aumentos na concentração de boro nos tecidos vegetais analisados devido ao fornecimento desse micronutriente.

Observa-se que as concentrações de boro nas raízes das plantas de soja-perene foram inferiores às observadas nos outros tecidos vegetais avaliados. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores para diversas espécies vegetais estudadas, como girassol, tabaco, abóbora (HU; BROWN, 1994) e cevada (OERTLI; GRIGUREVIC, 1975). De acordo com Marschner (1995) esse acúmulo preferencial de boro na parte aérea da planta pode ser justificado pela perda de água nas folhas devido ao processo de transpiração.

4.4.3 Potássio

A análise de variância mostrou que a interação doses de cálcio x doses de boro, para a concentração de potássio nas raízes das plantas de soja-perene, não foi significativa. Entretanto houve variação significativa para as doses de boro na concentração de potássio, sendo os resultados representados por uma equação de segundo grau (Figura 31). A mais baixa concentração de potássio foi obtida com a dose de boro de 61,52 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Observa-se que o comportamento obtido para as concentrações de potássio nas raízes em função das doses de boro é similar ao verificado para a concentração desse cátion no ponteiro das plantas de soja-perene, no primeiro período de crescimento em resposta à aplicação de boro.

Figura 31 – Concentração de potássio nas raízes da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Schunke (1980), em trabalho sobre o crescimento e composição química da *Galactia striata* em função do boro, potássio, cálcio e calagem, verificou significância para a interação potássio x boro. Constatou reduções na concentração de potássio nas plantas quando o boro foi fornecido na dose de 1 mg kg^{-1} em relação as plantas que não receberam o micronutriente. Resultados similares foram obtidos por Miranda (1979), para as leguminosas forrageiras siratro, galactia e soja-perene.

4.5 Análise de carboidratos da parede celular

Para as análises dos carboidratos da parede celular primária dos tecidos foliares da soja-perene verificou-se que a interação doses de cálcio x doses de boro não foi significativa. Entretanto, o estudo dos efeitos de cada um dos nutrientes revelou variações significativas nesses componentes da parede celular devido aos tratamentos aplicados.

4.5.1 Ácido galacturônico

Constatou-se variação significativa para a concentração de ácido galacturônico em resposta às doses de boro. Os resultados foram representados por modelo quadrático, onde a mais alta concentração de ácido galacturônico foi obtida com a dose de boro de 57,75 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 32).

Figura 32 – Concentração de ácido galacturônico nas folhas da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

De acordo com Loomis e Durst (1992), Matoh et al. (1993) e Hu e Brown (1994) a maior parte do boro celular das plantas está localizado na parede celular formando complexos com derivados pécnicos e galacturônicos de configuração cis-diol presentes na parede celular das plantas superiores.

Kakegawa et al. (2005) verificaram os efeitos da deficiência de boro em células de *Populus alba* cultivadas em meio de cultura e constataram reduções significativas nas concentrações de arabinose e ácido galacturônico na parede celular das células cultivadas com as doses de boro de 0, 1, 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Pelos resultados desse trabalho esses pesquisadores sugeriram que os polissacarídeos pécnicos compostos por ácido galacturônico, como arabinanas e homogalacturanas, apresentam um desarranjo entre as suas ligações devido ao não suprimento de boro.

Kaneko et al. (1997), em estudo sobre os complexos de polissacarídeos ligados ao boro, presentes na parede celular de plantas de bambu, verificaram que aproximadamente 29% da concentração de ácidos galacturônicos presentes na parede celular dos caules analisados estavam interligados ao boro por meio dos complexos B-RGH-II.

4.5.2 Ácido glucurônico

A análise de variância para a concentração de ácido glucurônico revelou variação significativa em resposta às doses de boro aplicadas. Essa variação ocorreu de acordo com um modelo quadrático e a mais alta concentração de ácido glucurônico foi obtida com a dose de boro de 64,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 33).

Figura 33 – Concentração de ácido glucurônico nas folhas da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

4.5.3 Ácidos urônicos totais

Foi verificada variação significativa para a concentração de ácidos urônicos totais em resposta às doses de boro. Os resultados se ajustaram a um modelo quadrático, sendo que a maior concentração de ácidos urônicos totais foi obtida com a dose de boro de 58,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 34).

Figura 34 – Concentração de ácidos urônicos nas folhas da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Hu et al. (1996) realizaram estudo sobre a relação entre o teor de pectina na parede celular e a exigência de boro em 14 espécies vegetais, envolvendo plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Constataram relação altamente significativa entre a concentração de ácidos urônicos no tecido foliar das espécies dicotiledôneas e a concentração de boro fornecida as plantas em solução nutritiva, sendo verificado aumento linear na concentração de ácidos urônicos nos tecido vegetais analisados em respostas às doses de boro de 0 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Yamauchi et al. (1986) pesquisaram a distribuição do cálcio e do boro em frações de pectina da parede celular de folhas de tomateiro e observaram que a concentração de ácido urônico na pectina da parede celular dessas plantas foi significativamente reduzida em condição de deficiência de boro. Resultados similares foram relatados por Matoh et al. (1993), em pesquisa sobre os complexos polissacarídeos ligados ao boro presentes na parede celular de raízes de

rabanete. Esses autores observaram que aproximadamente 52% da concentração de ácidos urônicos presentes na parede celular está interligado ao boro por meio dos complexos B-RGH-II.

Miyagawa (1997) realizou caracterização dos componentes químicos presentes nos polissacarídeos ligados ao boro na parede celular da espécie vegetal *Lemma minor* e verificou que os principais componentes desses complexos polissacarídeos eram apiose, xilose e ácidos urônicos.

4.5.4 Raminose

O estudo dos efeitos do suprimento de cálcio e de boro para a concentração de raminose nos trifólios completamente expandidos das plantas de soja-perene revelou variação significativa para as doses de boro e os resultados ajustaram-se a um modelo quadrático, tendo sido a mais elevada concentração de raminose obtida com a dose de boro de 59,39 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 35).

Figura 35 – Concentração de raminose nas folhas da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Kobayashi et al. (1995), em estudo sobre a associação do boro com polissacarídeos pécnicos presentes na parede celular das plantas superiores, relataram que o principal polissacarídeo presente nas cadeias pécnicas associado ao boro é o raminogalacturônico II (RGH-II), o qual apresenta como principais componentes químicos ácidos urônicos e raminose. A

ocorrência dos complexos de boro ligado ao açúcar raminogalacturônico II das cadeias pécicas foi observada na parede celular de 24 espécies de plantas superiores (MATOH et al., 1996). A RGH-II deve ser o carreador exclusivo do boro na parede celular dessas plantas.

Considerando que a maior exigência em boro pela planta ocorre durante o desenvolvimento do tubo polínico, Matoh e Kobayashi (1998) procuraram determinar a formação das ligações boro e raminogalacturona II na parede celular dos tubos polínicos em plantas de rabanete. A ocorrência das ligações B-RG-II foi confirmada pela análise dos açúcares dos complexos B-polissacarídeos dos tubos polínicos.

Kobayashi et al. (1996), em trabalho sobre as ligações do boro com a ramnogalacturona II das cadeias pécicas presentes na parede celular das plantas superiores, demonstraram que o boro é responsável pela ligação de dois monômeros de RG-II através de ligações boro diol éster, fundamentais para a formação de complexos dímeros de RG-II, e formação das supramoléculas pécicas, essenciais para a manutenção da integridade e extensibilidade da parede celular. Esses resultados sugerem que a principal função fisiológica do boro seja de promover as ligações entre os polissacarídeos pécicos da parede celular na região do RGH-II, favorecendo a formação da rede pécica da planta.

Matoh et al. (1993) realizaram um seqüenciamento dos componentes químicos presentes nos complexos B-RGH-II e constataram a presença dos seguintes componentes interligados ao boro: ácido urônico (52,3%), arabinose (17,4%), raminose (9,8%), galactose (4,9%) e xilose (0,3%).

Kaneko et al. (1997) pesquisaram os complexos de B-RGH-II formados na parede celular de caules de bambu. Após purificação e seqüenciamento do polissacarídeo esses autores observaram que os principais constituintes desse complexo são: ácidos galacturônicos (em torno de 29%), raminose (cerca de 19%), arabinose (aproximadamente 12%) e apiose (por volta de 7%).

Resultados de Hu et al. (1996) comprovam haver significativa relação entre a concentração de raminose e o suprimento de boro. Nas espécies dicotiledôneas analisadas esses pesquisadores obtiveram aumento linear na concentração foliar de raminose na parede celular das plantas em resposta às doses de boro.

4.5.5 Galactose

A concentração de galactose nas plantas de soja-perene mostrou variação significativa com as doses de cálcio fornecidas na solução nutritiva. Os resultados ajustaram-se a uma equação do segundo grau, sendo que a maior concentração de galactose foi obtida com a dose de cálcio de 4,47 mmol L⁻¹ (Figura 36).

Figura 36 – Concentração de galactose nas folhas da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Pesquisas conduzidas por Ferreira et al. (2006) sugeriram haver correlação significativa entre a concentração de galactose e a concentração de cálcio presentes na parede celular de frutos de azeitona. Esses autores acrescentaram que os resultados sugeriram que íons de cálcio são os responsáveis pela ligação desses açúcares na parede celular.

Fry (2004), em extensa revisão sobre o metabolismo da parede celular primária nas plantas superiores, relatou que os polissacarídeos da parede celular ricos em galacturona, um dos componentes químicos que compõe essa estrutura vegetal, são interligados por íons de cálcio.

Willats et al. (2001) relataram que os polissacarídeos pécticos de homogalacturona são interligados por íons de cálcio, sendo essas ligações cálcio-homogalacturona responsáveis pela estabilidade de toda a cadeia péctica da parede celular. Tanto para os polissacarídeos pécticos de galacturona como para os de homogalacturona verificam-se inúmeras cadeias de galactose entre as suas ligações.

A concentração de galactose apresentou o mesmo comportamento que o dos ácidos urônicos e raminose, sendo que esses três componentes são considerados como os principais constituintes da pectina (HU et al., 1996). Tanto para as doses de boro, no caso dos ácidos urônicos e da raminose, quanto para as doses de cálcio, no caso da galactose, observaram-se aumentos lineares nas concentrações foliares desses componentes químicos até as doses de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$, para boro e cálcio, respectivamente. Cabe ressaltar que essas doses de nutrientes são as recomendadas para uso na solução de Sarruge (1975).

4.5.6 Glicose

Observou-se variação significativa na concentração de glicose nas folhas trifolioladas completamente expandidas das plantas de soja-perene em resposta às doses de cálcio. Essa variação foi traduzida por incremento linear na concentração de glicose, em função do aumento das doses de cálcio na solução nutritiva (Figura 37).

Figura 37 – Concentração de glicose nas folhas da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Arruda (2000), em estudo sobre o efeito do cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophilla*, verificou aumentos lineares na concentração de glicose nas plantas em

resposta às doses de cálcio. Também observou que a maior concentração de glicose (36 mg g^{-1}) foi verificada no tratamento em que se aplicou a maior dose de cálcio ($12,12 \text{ mmol L}^{-1}$).

4.5.7 Celulose

O estudo dos efeitos isolados do suprimento de cálcio e de boro revelou variação significativa para as doses dos dois nutrientes, sendo que em ambos os casos os resultados puderam ser ajustados a modelo quadrático. As mais altas concentrações de celulose foram obtidas com a dose de cálcio de $4,87 \text{ mmol L}^{-1}$ e com a dose de boro de $59,50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente (Figuras 38 e 39).

Figura 38 – Concentração de celulose nas folhas da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Cabe ressaltar o efeito que doses excessivas de cálcio podem ter na concentração de celulose no material vegetal que venha a ser ofertado ao animal. Doses elevadas de cálcio podem resultar em elevação na concentração de celulose na pastagem, tornando o tecido vegetal mais rígido e resistente, reduzindo o valor nutritivo e a palatabilidade do alimento oferecido ao ruminante.

Figura 39 – Concentração de celulose nas folhas da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

Estudos sobre as funções bioquímicas do boro mostram que há redução na atividade da enzima UDPG-pirofosforilase em plantas deficientes nesse micronutriente, o que resulta em diminuição na síntese de celulose (DELMER, 1987; GUPTA, 1993). Essas observações podem justificar o ocorrido no presente experimento, onde a menor concentração de celulose foi obtida na dose de boro de 10 μmol L⁻¹.

Yamauchi et al. (1986) pesquisaram as exigências de boro e de cálcio em plantas de tomateiro e observaram que na deficiência desses dois nutrientes ocorre alteração no metabolismo das substâncias pécticas da parede celular e acúmulo de lignina e de celulose, que resulta em aceleração nos processos de senescência da planta, fazendo com que os tecidos vegetais tenham diminuída a flexibilidade.

Hu e Brown (1994), em trabalho sobre a localização do boro na parede celular de plantas de tabaco e de abóbora, verificaram que uma pequena porcentagem da celulose (aproximadamente 3%) presente na parede celular das plantas avaliadas está associada ao boro.

4.5.8 Hemicelulose

Houve variação significativa na concentração de hemicelulose nas folhas de soja-perene, em resposta às doses de boro fornecidas na solução nutritiva e os resultados ajustaram-se a modelo do segundo grau, sendo a mais alta concentração de hemicelulose obtida com a dose de boro de 29,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 40). Reduções na concentração de hemiceluloses são observadas em tecidos vegetais em processo de senescência (TAIZ; ZEIGER, 2004). Sendo assim, as doses de boro podem ter alterado o processo de senescência da soja-perene, que causou redução na concentração de hemiceluloses.

Figura 40 – Concentração de hemicelulose nas folhas da soja-perene, em função das doses de boro na solução nutritiva

4.5.9 Pentoses

A concentração de pentoses nas folhas trifolioladas completamente expandidas das plantas de soja-perene variou significativamente apenas com as doses de cálcio, sendo observado decréscimo linear nessa concentração com o incremento das doses desse macronutriente na solução nutritiva (Figura 41).

Figura 41 – Concentração de pentoses nas folhas da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Os principais componentes das pentoses são moléculas de arabinose e de xilose (TAIZ; ZEIGER, 2004). Tecidos vegetais em processo de senescência podem apresentar aumento nas concentrações de lignina e de celulose, o que, por sua vez, reduz a concentração de xilose no tecido (CARPITA; MACCANN, 2001). Dessa forma, pode-se supor que as doses de cálcio alteraram os processos de senescência da planta, induzindo ao aumento na concentração de celulose e redução na concentração de xilose, a qual pode ter reduzido a concentração de pentoses no tecido foliar da soja-perene.

4.5.10 Hexoses

O estudo dos efeitos isolados do suprimento de cálcio e de boro na concentração de hexoses revelou variação significativa com as doses de cálcio, sendo observado aumento linear na concentração de hexoses em função da elevação das doses de cálcio na solução nutritiva (Figura 42).

Figura 42 – Concentração de hexoses nas folhas da soja-perene, em função das doses de cálcio na solução nutritiva

Hexoses são constituídas principalmente por lignina e celulose, sendo que esses dois componentes são considerados característicos da formação da parede celular secundária da planta (CARPITA; MACCANN, 2001). Aumentos na concentração de celulose e de lignina nos tecidos vegetais ocorrem quando cessam os processos de crescimento e diferenciação da parede celular primária (TAIZ; ZEIGER, 2004). As doses de cálcio alteraram os processos de senescência das plantas de soja-perene, induzindo ao aumento linear na concentração de hexoses e redução na concentração de pentoses.

4.5.11 Análise de correlação entre as concentrações de carboidratos da parede celular e as concentrações de cálcio e boro

A análise de correlação entre os carboidratos estruturais, presentes na parede celular primária, e as concentrações de cálcio e boro na porção inferior das plantas de soja-perene revelou correlações significativas entre a concentração de boro na porção inferior das plantas e a concentração dos seguintes carboidratos da parede celular: ácido galacturônico ($r = 0,59$), ácido glucurônico ($r = 0,62$), ácidos urônicos totais ($r = 0,59$), raminose ($r = 0,66$) e celulose ($r = 0,58$). Para a concentração de cálcio não foram verificadas correlações significativas estatisticamente.

Hu et al. (1996) verificaram correlação altamente significativa entre a concentração de boro nos tecidos foliares de espécies dicotiledôneas e as concentrações dos principais constituintes da pectina (ácidos urônicos, raminose e galactose).

Matoh et al. (1993), em experimento com plantas de rabanete (*Raphanus sativus*), realizaram análise de correlação entre a concentração de raminose nos tecidos radiculares dessas plantas e a concentração de boro e obtiveram correlação altamente significativa entre elas.

4.6 Análises anatômicas

De maneira complementar às alterações ocorridas nos carboidratos que compõem a parede celular das folhas de soja-perene, verificaram-se alterações ao nível anatômico no arranjo estrutural das células dos tecidos foliares dessa leguminosa em função das combinações dos nutrientes na solução nutritiva.

Nos trifólios completamente expandidos das folhas de soja-perene desenvolvidas na combinação de boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ (que representam as mais baixas doses avaliadas dos dois nutrientes) observou-se um desarranjo histológico do mesófilo foliar, caracterizado pela presença de espaços intercelulares atípicos no parênquima lacunoso e paliçádico, maiores que os normalmente observados na espécie (Figura 43). Ainda para essa combinação das doses de cálcio e de boro, as células epidérmicas mostraram-se maiores do que as observadas na combinação de boro de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 43 – Cortes transversais das folhas de soja-perene coletadas no segundo período de crescimento na combinação de dose de boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ com dose de cálcio de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, destacando a epiderme (a), o parênquima paliçádico (b) e lacunoso (c), o mesófilo (d) e os espaços intercelulares (e) (Barra = $100 \mu\text{m}$)

Na combinação de boro de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$, foi possível observar que as células do mesófilo encontravam-se distribuídas de maneira compacta, praticamente sem espaços intercelulares, com parênquima paliçádico denso e biestratificado, ao passo que o parênquima lacunoso mostrou-se reduzido a um único extrato, com a formação de

uma faixa de aerênquima distribuída longitudinalmente na região de conexão com o parênquima paliçádico (Figura 44).

Figura 44 – Cortes transversais das folhas de soja-perene coletadas no segundo período de crescimento na combinação de dose de boro de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com dose de cálcio de $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$, destacando a epiderme (a), o parênquima paliçádico (b) e lacunoso (c) e o mesófilo (d) (Barra = $100 \mu\text{m}$)

Na combinação de dose de boro de $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ com dose de cálcio de $9,5 \text{ mmol L}^{-1}$, as maiores doses dos dois nutrientes avaliados, foi possível observar que o mesófilo apresentou-se com constituição semelhante ao verificado em boro de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de $5,00 \text{ mmol L}^{-1}$, porém menos compacto e mais desarranjado, como o observado em boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, com a presença de alguns espaços intercelulares atípicos no mesófilo (Figura 45).

Figura 45 – Cortes transversais das folhas de soja-perene coletadas no segundo período de crescimento na combinação de dose de boro de $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ com dose de cálcio de $9,50 \text{ mmol L}^{-1}$, destacando a epiderme (a), o parênquima paliçádico (b) e lacunoso (c), o mesófilo (d) e os espaços intercelulares (e) (Barra = $100 \mu\text{m}$)

Dugger (1983) reuniu uma série de trabalhos sobre as funções do boro no metabolismo das plantas e enfatizou alterações na estrutura e na organização das membranas e paredes celulares nas plantas superiores devido à deficiência em boro.

Kakegawa et al. (2005), estudaram os efeitos da deficiência de boro em células de *Populus alba* cultivadas em meio de cultura e constataram alterações na forma e na estrutura da parede celular das células que foram mantidas em meio com baixo fornecimento desse micronutriente. Trabalhos de Starck (1963), conduzidos com plantas de girassol, também mostraram alterações anatômicas na parede celular das plantas devido à deficiência de boro.

Kouchi e Kumazawa (1975, 1976) observaram que tecidos radiculares de plantas de tomate deficientes em boro apresentaram desarranjos estruturais e engrossamento da parede celular. Hu e Brown (1994) pesquisaram a localização do boro na parede celular de plantas de tabaco e de abóbora e observaram redução na espessura dos tecidos vegetais deficientes em boro.

Suutarinen et al. (2000), em trabalho sobre os efeitos da aplicação de cloreto de cálcio e de sacarose em frutos de morango (*Fragaria spp.*) pré-congelados, verificaram que os frutos que receberam o tratamento com cloreto de cálcio mantiveram a estrutura da parede celular inalterada. Os frutos que não receberam qualquer tipo de tratamento eram menos resistentes e firmes, devido à alteração na microestrutura da parede celular desses tecidos não tratados.

Arruda (2000), em estudo sobre o efeito do cálcio na embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla*, realizou análise histológica dos calos dessas plantas e observou que nos tratamentos em que não foi fornecido cálcio ou em que o macronutriente foi suprido inadequadamente ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) as células dos tecidos avaliados estavam colapsadas e desagregadas, causando desestruturação da parede e da membrana celulares. Eklund e Eliasson (1990) também verificaram esse comportamento em hipocótilo de *Pinus*.

Trevizam (2005), em análise histológica de calos de *Eucalyptus urophylla* cultivados in vitro sob combinações de doses de cálcio e boro, verificou que as raízes desenvolvidas aos 21 dias de cultivo apresentaram estruturas compostas por células desestruturadas, com paredes celulares rompidas e colapsadas nas combinações de boro de $0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de 3,75; 7,5; 11,25 e 15 mmol L^{-1} , boro de $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de 0 mmol L^{-1} , boro de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de 0 mmol L^{-1} e boro de $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ com cálcio de 0 mmol L^{-1} . Esses resultados demonstram a importância que esses dois nutrientes exercem nas características estruturais da parede celular das plantas superiores, bem como o cuidado que deve ser dado ao equilíbrio nutricional entre os mesmos.

4.7 Observações visuais

No segundo período de crescimento as plantas de soja-perene submetidas à dose de boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, independente da combinação de cálcio utilizada, desenvolveram sintomas visuais nas folhas trifolioladas novas completamente expandidas devido ao desequilíbrio nutricional estabelecido. Nessas plantas observou-se a má-formação dos novos tecidos vegetais, caracterizado pelo surgimento de folhas novas “encarquilhadas” e deformadas (Figura 46).

Figura 46 – Folhas novas de soja-perene desenvolvidas na dose de boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, destacando-se a má-formação dos tecidos vegetais

Os efeitos das doses de boro no sistema radicular das plantas de soja-perene também resultaram em alterações que puderam ser observadas visualmente. Na figura 47 observa-se que o incremento das doses de boro contribuiu com o desenvolvimento das raízes das plantas de soja-perene, sendo esse efeito mais significativo até a dose de boro de $70 \mu\text{mol L}^{-1}$. Interessante observar também que, a partir da dose de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, recomendada na solução nutritiva de Sarruge (1975), as diferenças observadas para a produção de raízes em função do fornecimento de boro são menos evidentes.

Figura 47 – Raízes da soja-perene desenvolvidas nas doses de boro em $\mu\text{mol L}^{-1}$

5 CONCLUSÕES

Dentro das doses de cálcio e de boro empregadas na solução nutritiva no presente experimento é possível concluir que:

- ✓ A interação doses de cálcio x doses de boro é significativa apenas para a concentração de cálcio na porção inferior da soja-perene coletada no primeiro corte das plantas;
- ✓ As doses de cálcio alteram a área foliar, as concentrações de cálcio, magnésio e potássio em vários tecidos amostrados e as concentrações de galactose, glicose, celulose, pentose e hexose na parede celular dos tecidos foliares da leguminosa;
- ✓ As doses de boro influenciam a produção de massa, o comprimento e a superfície das raízes, o número de folhas, a área foliar, as concentrações de boro, potássio e manganês em tecidos coletados na leguminosa e as concentrações dos ácidos galacturônico, glucurônico e urônicos totais e de raminose, celulose e hemicelulose nas folhas da soja-perene;
- ✓ Com o suprimento de boro de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva são observadas deformações nas folhas trifolioladas recentemente expandidas e menor desenvolvimento no sistema radicular das plantas de soja-perene;
- ✓ As combinações de baixas ou altas doses de cálcio e de boro promovem alterações anatômicas na organização celular dos tecidos foliares da leguminosa.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, P. B.; MATTOS, H. B. de. Caracterização de algumas variedades de soja-perene, *Glycine wightii* Wild. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 3, p. 87-93, 1976.
- ALCÂNTARA, P. B.; BUFARAH, G. **Plantas Forrageiras**: gramíneas e leguminosas. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1983. 150p.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E 1758-01**: Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography. New York. 2001.
- ANDREW, C. S. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes: Nodulation and growth. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 27, p. 611-623, 1976.
- ANDREW, C.S; JOHNSON, A.D. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. II. Chemical composition (calcium, nitrogen, potassium, magnesium, sodium and phosphorus). **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.27, p.625-636, 1976.
- ARRUDA, S. C. C. **Efeito do cálcio na indução de embriogênese somática de *Eucalyptus urophylla***. 2000. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- BOHNSACK, C.W.; ALBERT, L. S. Early effects of boron deficiency on indoleacetic acid oxidase levels of squash root tips. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 59, p. 1047-1050, 1977.
- BONFIM-DA-SILVA, E.M.; GIACOMINI, A.P.; QUISPE, J. F. S.; MONTEIRO, F. A. Produção e perfilhamento do capim-Tanzânia submetido a doses de boro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais eletrônicos...**Campo Grande:SBZ, 2004. 1 CD-ROM.
- BRAGATTO, J. **Avaliação da composição química da parede celular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que superexpressam o gene *ugdH* de soja, que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22)**. 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz e Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- BRAZON, C. A. A. **Efeitos da aplicação de calcário, fósforo, potássio e inoculante sobre a produção de matéria seca, nodulação e composição química de *Phaseolus atropurpureus* DC cv. Siratro**. 1971. 61p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1971.
- BRENCHLEY, W.E.; WARINGTON, K. The role of boron in the growth of plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 41, p.167-187, 1927.

BRENNAN, E.G.; SHIVE, J.V. Effect of calcium and boron nutrition of the tomato on the relation between these elements in the tissues. **Soil Science**, Philadelphia, v. 66, p. 65-75, 1948.

BRETT, C.; WALDRON, K.W. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin, 1990. p.75-111.

BROWN, P.H; HU, H. Does boron play only a structural role in growing tissues of higher plants? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 196, p.211-215, 1997.

BUZETTI, S. **Efeito de doses de boro e de zinco, em diferentes condições de acidez de um solo de cerrado, na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. 1988. 112p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency causes a drastic decrease in nitrate content and nitrate reductase activity, and increases the content of carbohydrates in leaves from tobacco plants. **Planta**, Berlin, v. 209, p.528-536, 1999.

CAPOANI, M.T. **Níveis de cálcio e de boro na solução nutritiva para os cultivares de girassol IAC-URUGUAI e RUMBOSSOL-91**. 2001. 57p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N. C.; McCANN, M. C. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Biology , 2001. chap.7, p. 52-109.

CARRIEL, J. M.; MONTEIRO, F. A.; PAULINO, V. T.; SARTINI, H. J. Limitações nutricionais ao desenvolvimento da soja-perene em pastagem consorciada com o capim-jaraguá. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 40, p. 241-250, 1983.

CARVALHO, M. M.; FRANÇA, G. E.; BAHIA FILHO, A. F. C.; MOZZER, O. L. Ensaio exploratório de fertilização de seis leguminosas tropicais em um latossolo vermelho escuro, fase mata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 285-290, 1971.

CARVALHO, M. M. Fixação biológica como fonte de nitrogênio para pastagens. In: SIMPÓSIO SOBRE CALAGEM E ADUBAÇÃO DE PASTAGENS, 1., 1985, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa: IZ, 1986. p. 125-143.

CIHACEK, L. J. Alfalfa nutrient needs and fertilization. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DA ALFAFA (*Medicago sativa* L.) NOS TRÓPICOS, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA, CNPGL, 1994. p. 93-97.

CLARKSON, D. T.; HANSON, J. B. The mineral nutrition of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 31, p. 239-298, 1980.

COLOZZA, M. T. ; WERNER, J. C. Aplicação de nutrientes em três leguminosas forrageiras cultivadas num solo da região do Vale da Ribeira. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 22, p. 327-353, 1984.

COLOZZA, M. T.; MONTEIRO, F. A.; MATTOS, H. B. Níveis de saturação por bases em um latossolo vermelho escuro para cultivo de duas leguminosas forrageiras. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.55, p. 37-43, 1998.

COSTA, N. L.; PAULINO, V. T.; SCHAMMAS, E. A. Produção de forragem, composição mineral e nodulação do guandu afetadas pela calagem e adubação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 13, p. 51-58, 1989.

CRESTANA, S.; GUIMARÃES, M. F.; JORGE, L. A. C.; RALISH, R.; TOZZI, C. L.; TORRE, A.; VAZ, C. M. P. Avaliação da distribuição de raízes no solo auxiliada por processamento de imagens digitais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.18, p.365-371, 1994.

DARVILL, A.; McNEIL, M.; ALBERSHEIM, P.; DELMER, D. P. The primary cell wall of flowering plants. In: TOLBERT NE. (Ed.). **The biochemistry of plants: A comprehensive treatise**. New York: Academic Press, 1980. p.91-161.

DAVE, I. C.; KANNAN, S. Influence of boron deficiency on micronutrients absorption by *Phaseolus vulgaris* and protein contents in cotyledons. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v.3, p. 27-32, 1981.

DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.38, p. 259-263, 1987.

DEON, M. D. **Crescimento e nutrição mineral da soja submetida a excesso de P, S, K, Ca e Mg em solução nutritiva**. 2007. 71p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

DHUGGA, K. S. Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p.488-493, 2001.

DOERGE, T. A.; BOTTOMLEY, P. J.; GARDNER, E. H. Molybdenum limitations to alfalfa growth and nitrogen content on a moderately acid, high-phosphorus soil. **Agronomy Journal**, Madison, v. 77, p. 895-901, 1985.

DRAKE, M.; SIELING, D. H.; SCARSETH, G. D. Calcium-boron ratio as an important factor controlling the boron starvation of plants. **Journal of the American Society of Agronomy**, Washington, v.33, p. 454-462, 1941.

DUBOIS, M.; GILLES, D.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, p. 350-356. 1956.

DUGGER, W. M. Boron in plant metabolism. In: LAUCHLI, A.; BIELESKI, R. L. (Ed.). **Plant physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. p. 626-650 :Encyclopedia of Plant Physiology (New Series, 15).

DUTRA, I. M. de S.; SIEWERDT, L.; SIEWERDT, F. e SILVEIRA JR., P. Efeitos da adubação e da calagem na produção de matéria seca das alfafas crioula e huinca, em dois solos ácidos, no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.24, p. 494-501, 1995.

EIRA, P. A.; ALMEIDA, P. L.; SILVA, W. C. Fatores nutricionais limitantes do desenvolvimento de três leguminosas forrageiras em solo podzólico vermelho-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.7, p.185-192, 1972.

EKLUND, L.; ELIASSON, L. Effects of calcium ion concentration on cell wall synthesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.41, p. 863-867, 1990.

EMONS, A. M. C.; MULDER, M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science**, London, v. 5, p. 35-40, 2000.

EMONS, A. M. C.; SCHEL, J. H. N.; MULDER, M. The geometrical model for microfibril deposition and the influence of the cell wall matrix. **Plant Biology**, New York, v. 4, p.22-26, 2002.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 178p.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1984. 613p.

FERREIRA, J. A.; MAFRA, I.; SOARES, M. R.; EVTUGUIN, D. V. Dimeric calcium complexes of arabinan-rich pectic polysaccharides from *Olea europaea* L. cell walls. **Carbohydrate polymers**, Oxford, v.65, p.535-543, 2006.

FLEISCHER, A.; O'NEILL, M. A. EHWALD, R. Pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. **Plant Physiology**, Rockville, v.121, p. 829-838, 1999.

FOSKET, D. E. Characteristics of plants cells that are important in development. In: _____. **Plant growth and development**, San Diego: Academic Press, 1994. p.258-261.

FRANÇA, G. E.; CARVALHO, M. M. Ensaio exploratório de fertilização de cinco leguminosas tropicais em um solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 147-153, 1970.

FRANÇA, G. E.; BAHIA FILHO, A. F. C.; CARVALHO, M. M. Influência de magnésio, micronutrientes e calagem no desenvolvimento e fixação simbiótica de nitrogênio na soja-perene var. Tinaroo (*Glycine wightii*) em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 197-202, 1973.

FREITAS, L. M. M. Nutrição de leguminosas forrageiras tropicais. In: ENCONTRO DE TÉCNICOS DA REGIÃO CENTRO-SUL PARA DISCUSSÃO DE PROBLEMAS RELACIONADOS ÀS LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS, 1, 1969, Nova Odessa, **Anais...**Nova Odessa: IZ, 1969, 10p.

FRY, S. C. **The growing plant cell wall**: chemical and metabolic analysis. London: Longman Scientific and Technical, 1988. 246p.

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, London, v.161, p. 641-675, 2004.

GALLAHER, R. N.; BROWN, R. H.; ASHLEY, D. A.; JONES Jr, J. B. Photosynthesis and ¹⁴CO₂ photosynthate translocations from calcium – deficient leaves of crops. **Crop Science**, Madison, v.16, p. 116-119, 1976.

GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v.8, p. 904-915, 1994.

GINSBURG, B. Z. Evidence for a protein gel structure crosslinked by metal cations in the intercellular cement of plant tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.12, p. 85-107, 1961.

GONTARSKI, E. C. **Limitações de fertilidade de um latossolo vermelho-amarelo para o cultivo de macrotiloma guatá e galáxia yarana**. 1991. 107p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

GUPTA, U. C. Effect and interaction of molybdenum and limestone on growth and molybdenum content cauliflower, alfafa, bromegrass on acid soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 33, p. 929-932, 1969.

GUPTA, U. C. Effects of boron and lime on boron concentration and growth of forage legumes under greenhouse conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.3, p.355-365, 1972.

GUPTA, U.C. Boron nutrition of crops. **Advances in Agronomy**, New York, v.31, p.273-307, 1979.

GUPTA, U.C. Boron nutrition of alfalfa, red clover and timothy grown on Podzol soils of eastern Canada. **Soil Science**, Philadelphia, v.137, p.16-22, 1984.

GUPTA, U. C. **Boron and its role in crop production**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 250p.

GUPTA, U. C.; MACLEOD, J. A. Influence of calcium and magnesium sources on boron uptake and yield of alfalfa and rutabagas as related to soil pH. **Soil Science**, Philadelphia, v. 124, p.279-284, 1977.

GUPTA, U. C.; LIPSETT, J. Molybdenum in soils, plants and animals. **Advances in Agronomy**. New York, v. 34, p. 73-113, 1981.

HADDAD, K. S.; KALDOR, C. J. Effect of parent material, natural available soil boron, and applied boron and lime on the growth and chemical composition of Lucerne on some acid soils of the central Tablelands of New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 22, p. 317-323, 1982.

HANSON, C.H. **Alfalfa science and technology**. Madison: Wisconsin: American Society of Agronomy, 1972. 812p.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 40, p. 139-168, 1989.

HILL, W. E.; MORRILL, L. G. Boron, calcium and potassium interactions in Spanish peanuts. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.39, p.80-83, 1975.

HONDA, C.S.; HONDA, A.M. **Cultura da alfafa**. Marília: UNIMAR, 1990.245p.

HORSNELL, L. J.; The growth of improved pastures on acid soils. 1. The effect of superphosphate and lime on soil pH and on the establishment and growth of phalaris and lucerne. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v.25, p. 149-156, 1985.

HU, H; BROWN, P.H. Boron uptake by sunflower, squash and cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, Frederiksberg, v. 91, p.435-441, 1994.

HU, H.; BROWN, P. H.; LABAVITCH, J. M. Species variability in boron requirement is correlated with cell wall pectin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.47, p.227-232, 1996.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron rhamnogalacturonan-II complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.284, p.1-9, 1996.

- ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Pectic polysaccharide rhamnogalacturonan-II is covalently linked to homogalacturonan. **Phytochemistry**, Oxford, v.57, p. 969-974, 2001.
- JANGHORBANI, M.; ROBERTS, S.; JACKSON, T. L. Relationship of exchangeable acidity to yield and chemical composition of alfalfa. **Agronomy Journal**, Madison, v.67, p. 350-354, 1975.
- JARVIS, M. C. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 7, p. 153-164, 1984.
- JOHANSEN, C.; KERRIDGE, P. C.; LUCK, P. E.; COOK, B. G.; LOWE, K. F.; OSTROWSKI, H. The residual effect of molybdenum fertilizer on growth of tropical pasture legumes in a sub-tropical environment. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Melbourne, v. 17, p. 961-968, 1977.
- JOHN, M. K.; EATON, G. W.; CASE, V. W.; CHUAH, H. H. Liming of alfalfa (*Medicago sativa* L.). II. Effect on mineral composition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.37, p.363-374, 1972.
- JONES, M. B.; FREITAS, L. M. M. de. Resposta de quatro leguminosas tropicais a fósforo, potássio e calcário num Latossolo Vermelho-Amarelo de campo cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p. 91-99, 1970.
- KAKEGAWA, K.; ISHII, T. MATSUNAGA, T. Effects of boron deficiency in cell suspension cultures of *Populus alba* L. **Plant Cell Reports**, New York, v.23, p. 573-578, 2005.
- KANEKO, S.; ISHII, T.; MATSUNAGA, T. A boron-rhamnogalacturonan-II complex from bamboo shoot cell walls. **Phytochemistry**, Oxford, v.44, p.243-248, 1997.
- KARNOVSKI, M. J. A. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v.27, p. 137-138, 1965.
- KIRKBY, E. A.; PILBEAM, D. J. Calcium as a plant nutrient. **Plant Cell Environment**, Oxford, v.7, p. 397-405, 1984.
- KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZUMA, J. Structure and glycosyl composition of the boron-polysaccharide complex of radish roots. **Plant and Cell Physiology Supplements**, Oxford, v.36, p. 139, 1995.
- KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZUMA, J. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate diol ester bonds in higher plant cell walls. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, p. 1017-1020, 1996.
- KOBAYASHI, M.; OHNO, K.; MATOH, T. Boron Nutrition of Cultured Tobacco BY-2 Cells. II. Characterization of the Boron-Polysaccharide Complex. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.38, p. 676-683, 1997.

KOBAYASHI, M.; NAKAGAWA, H.; ASAKA, T.; MATOH, T. Borate-rhamnogalacturonan II Bonding Reinforced by Ca^{2+} Retains Pectic Polysaccharides in Higher-Plant Cell Walls. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p. 199-203, 1999.

KOUCHI, H. KUMAZAWA, K. Anatomical response of root tips to boron deficiency I. Effects of boron deficiency on elongation of root tips and their morphological characteristics. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.21, p. 21-28, 1975.

KOUCHI, H. KUMAZAWA, K. Anatomical response of root tips to boron deficiency III. Effect of boron deficiency on sub-cellular structure of root tips, particularly on morphology of cell wall and its related organelles. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.22, p. 53-71, 1976.

KRUEGER, R. W.; LOVATT, C. J.; ALBERT, L. S. Metabolic requirement of *Cucurbita pepo* for boron. **Plant Physiology**, Rockville, v.83, p. 254-258, 1987.

LITTELL, R. C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings**, Ona, v.34, p.94-97, 1975.

LOOMIS, W.D.; DURST, R.W. Chemistry and biology of boron. **Biofactors**, Amsterdam, v.3, p.229-239, 1992.

MACNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.53, p. 625-663, 1984.

MAHLER, R. L. Influence of pH on yield and N and P nutrition of alfalfa grown on an andic Mission silt loam. **Agronomy Journal**, Madison, v.75, p.731-735, 1983.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 889p.

MATOH, T.; KOBAYASHI, M. Boron and calcium, essential inorganic constituents of pectic polysaccharides in higher plant cell walls. **Journal of Plant Research**, Kyoto, v.111, p. 179-190, 1998.

MATOH, T.; KAWAGUCHI, S.; KOBAYASHI, M. Ubiquity of a borate-rhamnogalacturonan II complex in the cell walls of higher plants. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.37, p. 636-640, 1996.

MATOH, T.; ISHIGAKI, K.; OHNO, K.; AZUMA, J. Isolation and characterization of a boron-polysaccharide complex from radish roots. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.34, p. 639-642, 1993.

- MATOH, T.; ISHIGAKI, K.I.; MIZUTANI, M.; MATSUNAGA, W.; TAKABE, K. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. 1. Requirement for and intracellular localization of boron and selection of cells that tolerate low levels of boron. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.33, p.1135-1141, 1992.
- MATSUNAGA, T.; ISHII, T. WATANABE-ODA, H. HPLC/ICP-MS study of metals bound to borate-rhamnogalacturonan-II from plant cell walls. In: ANDO, T.; FUJITA, K.; MAE, T.; MATSUMOTO, H.; MORI, S.; SEKIYA, J. (Ed). **Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 81-82.
- MATTOS, H. B. **Efeitos da aplicação de calcário e micronutrientes sobre a produção de matéria seca, nodulação e composição química de Phaseolus atropurpureus DC. cv. sirato**. 1972. 117p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.
- MATTOS, H. B.; COLOZZA, M. T. Micronutrientes em pastagens. In: MATTOS, H. B.; WERNER, J. C.; YAMADA, T.; MALAVOLTA, E. (Ed.). **Calagem e adubação de pastagens**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 233-256.
- MATTOS, H. B.; COLOZZA, M. T.; MONTEIRO, F. A. Limitações de fertilidade de um latossolo vermelho escuro para o cultivo de macrotiloma. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 50, p. 7-12, 1993.
- MATTOS, W. T.; SANTOS, A. R.; ALMEIDA, A. A. S.; CARREIRO, B. D. C.; MONTEIRO, F. A. Aspectos produtivos e diagnose nutricional do capim-Tanzânia submetido a doses de potássio. **Magistra**, Cruz das Almas, v.14, p. 37-44, 2002.
- MAZEAU, K.; PÉREZ, S. The preferred conformations of the four oligomeric fragments of rhamnogalacturonans II. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.311, p.203-217, 1998.
- Mc FARLANE, J. D.; JUDSON, G. J.; GOUZO, J. Copper deficiency in ruminants in the south east of south Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 30, p. 187-193, 1990.
- MELLEROWICZ, E.; BAUCHER, M.; SUNDBERG, B.; BOERJAN, W. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.47, p.239-274, 2001.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Dordrechth: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.
- MIRANDA, T. M. **Contribuição ao estudo da nutrição mineral e da adubação do siratro (*Macroptilium atropurpureum*, DC cv. Siratro), galactia (*Galactia striata*, (Jacq) Urb.) e soja-perene comum (*Glycine wightii*) em dois solos do Estado de São Paulo**. 1979. 132p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1979.

MIYAGAWA, I. **Purification and characterization of a borate-binding polysaccharide from cell walls of *Lemna minor* L.** BSc. thesis, Kyoto University, Kyoto, Japan, 1997.

MONTEIRO, F. A. **Efeitos da aplicação de micronutrientes e de níveis de calagem em quatro leguminosas forrageiras tropicais.** 1980. 146p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

MONTEIRO, F. A. Micronutrientes em Forrageiras. In: SIMPÓSIO SOBRE MICRONUTRIENTES NA AGRICULTURA, 1, 1988, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: POTAFOS, 1988. p. 910-961.

MONTEIRO, F. A. **Níveis de cálcio e de magnésio em soja-perene Tinaroo.** 1993. 119p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1993.

MONTEIRO, F. A.; RODRIGUES, L. R. A.; WERNER, J. C. Forrageiras. In: Ferreira, M. E.; da Cruz, M. C. P.; Raij, B. V.; de Abreu, C. A. (Org.). **Micronutrientes e Elementos Tóxicos na Agricultura.** Jaboticabal, SP: CNPq/FAPESP/POTAFOS, 2001. cap. 15, p 375-392.

MONTEIRO, F. A.; LIMA, S. A. A.; WERNER, J. C.; MATTOS, H. B. Adubação potássica em leguminosas e em capim-colonião (*Panicum maximum* Jacq.) adubado com níveis de nitrogênio ou consorciado com leguminosas. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.37, p.127-148, 1980.

MONTEIRO, F. A.; COLOZZA, M. T.; WERNER, J. C.; OLIVEIRA, J. B. Limitações de fertilidade em solos de seis localidades paulistas para o cultivo da soja-perene. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 21, p. 181-212, 1983.

MONTEIRO, F. A.; CONSOLMAGNO NETO, D.; VENDEMIATTI, J. A.; MAIQUE, T.; SILVEIRA, C. P. Boron nutrition and some characters of Aruana grass morphogenesis. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9, 2003, Porto Alegre. **Abstracts...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 1 CD-ROM.

MONTEIRO, F. A.; RAMOS, A. K. B.; CARVALHO, D. D.; ABREU, J. B. R.; DAIUB, J. A. S.; SILVA, J. E. P.; NATALE, W. Cultivo de *Brachiaria brizantha* Stapf. cv. Marandu em solução nutritiva com omissões de macronutrientes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.52, p. 135-141, 1995.

MOORE, H. M.; HIRSCH, A. M. Effects of boron deficiency on mitosis and incorporation of tritiated thymidine into nuclei of sunflower root tips. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 70, p. 165-172, 1983.

- MORIKAWA, C. K. **Limitações nutricionais para o *Andropogon* (*Andropogon gayanus*) e *Braquiário* (*Brachiaria brizantha*) em latossolo da região dos campos vertentes-MG.** 1993. 136p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 1993.
- MUNNS, D. N.; FOX, R. L. Comparative requirements of tropical and temperate legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.46, p. 533-548, 1977.
- MUNNS, D. N.; FOX, R. L.; KOCH, B. L. Influence of lime on nitrogen fixation by tropical and temperate legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.46, p. 591-601, 1977.
- NEME, N. A.; LOVADINI, L. A. C. Efeito de adubos fosfatados e calcário na produção de forragem de soja-perene em terra de cerrado. **Bragantia**, Campinas, v.26, p. 165-371, 1967.
- NORRIS, D. O. Lime in relation to the nodulation of tropical legumes. In: HALLSWORHT, E. G. (Ed.). **Nutrition of the legumes**. New York: Academic Press, 1964, p. 16482.
- NORTHCOTE, D. H. Chemistry of the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 23, p. 113-132, 1972.
- OERTLI, J. J.; GRIGUREVIC, E. Effect of pH on the absorption of boron by excised barley roots. **Agronomy Journal**, Madison, v.67, p. 278-283 1975.
- OLIVEIRA, F. T. T.; SARAIVA, O. F.; CARVALHO, M. M.; VERNEQUE, R. S. Efeito da calagem, potássio, enxofre e micronutrientes sobre o crescimento de *Centrosema pubescens* em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 755-759, 1985.
- O'NEILL, M. A.; WARRENFELTZ, D.; KATES, K.; PELLERIN, P.; DOCO, T.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. Rhamnogalacturonan-II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimmer that is covalently cross-linked by a borate ester. *In vitro* conditions for the formation and hydrolysis of the dinner. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.271, p.22506-22513, 1996.
- OTSUBO, A. A. **Calagem e boro em um latossolo vermelho escuro cultivado com alfafa (*Medicago sativa* L.).** 1993. 94p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista” Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1993.
- OVERSTREET, R.; JACOBSON, B. Mechanism of ion absorption by roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Stanford, v.3, p. 189-206, 1952.
- OYEWOLE, O. I.; ADUAYI, E. A. Evaluation of the growth and quality of the “Ife plum” tomato as affected by boron and calcium fertilization. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 15, p. 199-209, 1992.

PARKER, M. L.; WALDRON, K. W. Texture of Chinese water chestnut: Involvement of cell wall phenolics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.68, p. 337-346, 1995.

PARR, A. J.; LONGHMAN, B. C. Boron and membrane function in plants. In: ROBB, D. A.; PIERPOINT, W. S. (Ed). **Metal and micronutrients: uptake and utilization by plants**. New York: Academic Press, 1983. p. 87-107.

PEREIRA, J.M. Produção e persistência de leguminosas em pastagens tropicais. In: SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2001. p.111-142.

PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. **Biochimie**, Paris, v.85, p. 109-121, 2003.

PLOMION, C.; LEPROVOST, G.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p.1513-1523, 2001.

PREMAZZI, L. M. **Saturação por bases como critério para recomendação de calagem em cinco forrageiras tropicais**. 1991. 188p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

QUAGGIO, J. A. **Acidez e calagem em solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2000. 111p.

RAIJ, B. van; CAMARGO, A. P. de; MASCARENHAS, H. A. A.; HIROCE, R.; FEITOSA, C. T.; NERY, C.; LAUN, C. R. P. Efeito de níveis de calagem na produção da soja em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.1, p. 28-31, 1977.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biology of plants**. New York: Worth Publisher, 2001. 791p.

REEVE, E.; SHIVE, J. W. Potassium-boron relations in plants. **Better crops with Plant Food**, New York, v. 27, p. 14-19, 1943.

REEVE, E.; SHIVE, J. W. Potassium-boron and calcium-boron relationships in plant nutrition. **Soil Science**, Philadelphia, v.57, p. 1-14, 1944.

RICE, W. A. Effect of CaCO₃ and inoculum level on nodulation and growth of alfalfa in an acid soil. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 55, p. 245-250, 1975.

RODRIGUES, J. D.; RODRIGUES, S. D.; PEDRAS, J. F.; DELACHIAVE, M. E. A.; BOARO, C. S. F.; ONO, E. O. Diferentes níveis de cálcio e o desenvolvimento de plantas de estilosantes (*Stylosanthes guyanensis* (Aubl.) Sw. cv. “Cook”) **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 50, p. 166-175, 1993.

RODRIGUES, R. C. **Calcário, nitrogênio e enxofre para a recuperação do capim-Braquiária cultivado em solo proveniente de uma pastagem degradada**. 2002. 141p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ROMINGER, R.S.; SMITH, D.; PETERSON, L.A. Yields and elemental composition of alfalfa plant parts at late bud under two fertility levels. **Canadian Journal of Plant Science**, Agricultural Institute of Canada, v.55, p.69-75, 1975.

ROSOLEM, C. A. **Nutrição mineral e adubação da soja**. Piracicaba: POTAFOS, 1980. 80p.

ROSSIELO, R. O. P.; ARAÚJO, A. P.; MANZATTO, C. V.; FERNANDES, M. S. Comparação dos métodos fotoelétrico e da interseção na determinação da área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, p. 633-638, 1995.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of parafilm embedded plant material using toluidine blue 01. **Stain Technology**, Baltimore, v.48, p. 247-249, 1973.

SANTOS, F. P.; OLIVEIRA, R. H.; ROSOLEM, C. A. Resposta do boro aplicado via solução nutritiva no algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais eletrônicos...**Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

SANTOS, A.R.; MATTOS, W.T.; SILVA, A.A.; MONTEIRO, F.A.; CORRÊA, B.D.; GUPTA, U.C. Boron nutrition and yield of alfalfa cultivar crioula in relation to boron supply. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.61, p. 496-500, 2004.

SANZONOWICZ, C.; VARGAS, A. A. T. Efeito do calcário e do potássio na produção e na composição química de *Stylosanthes guianensis* em um latossolo vermelho escuro de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.4, p.165-160, 1980.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.1, p.231-233, 1975.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. 54p.

SAS INSTITUTE INC. SAS/STAT. **User's guide**, version 8.0. Cary: SAS Institute, 2000.

SÃO JOSÉ, J. F. B.; SILVA, I. R.; NOVAIS, R. F. BARROS, N. F.; LEITE, F. O.; GEBRIM, F. O.; CARDOSO, J. A. Interação cálcio x boro no crescimento e seca de ponteiro de clones de eucalipto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais eletrônicos...**Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROM.

SCHUNKE, R. M. **Crescimento e composição química da Galactia striata (Jacqu.) Urb. Em função do boro, potássio, cálcio e calagem**. 1980. 96p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

SELVENDRAN, R.R.; O'NEILL, M.A. Isolation and analysis of cell walls from plant material. In: GLICH, D. (Ed.). **Methods of Biochemical Analysis**. London: John Wiley , 1987. v. 32. p 25-153.

SHERREL, C. G. Comparison of materials of different solubility as source of boron for plants. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.11, p. 325-329, 1983a.

SHERREL, C. G. Boron deficiency and response in white and red clovers and lucerne. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v.26, p.197-203, 1983b.

SHERREL, C. G. Plant and soil boron in relation to boron deficiency in Lucerne. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 26, p. 209-214, 1983c.

SHERREL, C. G.; TOXOPEUS, M. R. J. Effect of boron applications on yield and boron concentration of alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown on yellow-brown pumice soils. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v. 6, p. 145-150, 1978.

SILVEIRA, C. P. **Produção e nutrição mineral do capim-Tanzânia com variável disponibilidade de nitrogênio e cálcio**. 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2005.

SMITH, M. E. The role of boron in plants metabolism. 1. Boron in relation to the absorption and solubility of calcium. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, Adelaide, v. 22, p. 257-263, 1944.

SMITH, D. Yield and chemical composition of leaves and stems of alfalfa at intervals up the shoots. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v.18, p.652-656, 1970.

STARCK, J. R.; Effect of boron on cell walls structure of sunflower. **Acta Society of Botany**, Poznan, v.32, p. 619-623, 1963.

SUTTON, M. **Níveis de calcário e potássio em um Latossolo Vermelho-Amarelo para quatro cultivares de alfafa**. 1993. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1993.

SUUTARINEN, J.; HEISKA, K.; AUTIO, K. The effects of calcium chloride and sucrose prefreezing treatments on the structure of strawberry tissues. **LWT-Food Science and Technology**, Shinfield, v.33, p. 89-102, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Paredes celulares: estruturas, biogênese e expansão. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 15 p.339-364.

TANG, M.; HERNÁNDEZ, L.; HERNÁNDEZ, C. A. *Neonotonia wightii* e Arn. Lackey. **Pastos y Forajes**, Matanzas, v. 10, p. 1-24, 1987.

TEASDALE, R. D.; RICHARDS, D. K. Boron deficiency in cultured line cells. Quantitative studies of interaction with Ca and Mg. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 1071-1077, 1990.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **TAPPI. Test method T249 cm-85**: carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography. Atlanta, 1991. 1v.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Test method T222 om-88**: acid insoluble lignin wood and pulp. Atlanta, 1996. 1v.

TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K. HE. L. F.; TAKABE, K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall In: JUNG, H. G.; BUXTON, D. R.; HATFIELD, R. D.; RALPH, J. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1993. p. 247-270.

TING, I. P. **Plant Physiology**. Riverside: Addison-Wesley, University of California, 1982. 642p.

TOUCHTON, J. T.; BOSWELL, F. C.; MARCHANT, W. H. Boron for soybeans grown in Georgia. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.11, p. 369-378, 1980.

TREVIZAM, R. **Análises histológicas e bioquímicas em calos de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Cultivados *in vitro* sob interação nutricional de boro e cálcio**. 2005. 167p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais com opção em Silvicultura e Manejo Florestal) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

VAN DUIN M.; PETERS, J. A.; KIEBOOM, A. P. G.; VAN BEKKUM, H. Synergic coordination of calcium in borate-polyhydroxy-carboxylate systems. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 162, p. 65-78, 1987.

VARGAS, M. A. T.; DOBEREINER, J. Efeito de níveis crescentes de calagem, manganês, magnésio e boro na simbiose e desenvolvimento vegetativo de *Stylosanthes guianensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.9, p. 21-28, 1974.

VENDEMIATTI, J. A. CONSOLMAGNO NETO, D.; LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F. A. Massa seca da parte aérea e do sistema radicular do capim Aruana associado a doses de boro. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 9, 2001, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba:USP, 2001. p.40.

VENTURA, C. A. D. **Níveis de potássio, cálcio e magnésio em solução nutritiva influenciando o crescimento e a composição da soja [*Glycine max* (L.) Merrill], cv. Paraná**. 1987. 65p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

VILELA, A. D. Comparação de um sistema de pastejo rotacionado em alfafa com um sistema de confinamento para vacas de leite. In: REUNION LATINO AMERICANA DE PRODUCCION ANIMAL, 12., 1993, Santiago do Chile. **Anais...** Santiago do Chile: SLAPA, 1993. p.228.

WERNER, J. C. **Response of two species of Stylosanthes Sw. to leves of lime, phosphorus, potassium and boron on three mineral soils.** 1979. 205p. Dissertation (PhD) – University of Florida, Gainesville, 1979.

WERNER, J. C. **Adubação de pastagens.** Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, 1986. 50p.

WERNER, J. C.; MATTOS, H. B. Ensaio de fertilização com alguns micronutrientes em soja-perene, *Glycine wightii*, Wild. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v. 31, p. 313-324, 1974.

WERNER, J. C.; MONTEIRO, F. A.; MATTOS, H. B. Uso de elementos traços como FTE em leguminosas forrageiras tropicais. **Boletim de Indústria Animal**, São Paulo, v. 32, p. 347-361, 1975.

WILLATS, W. G. T.; MCCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J. P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.47, p. 9-27, 2001.

YAMANOUCHI, M. The role of boron in higher plants I. The relations between boron and calcium or the pectic substances in plants. **Japanese Journal of Soil Science and Manure**, Kagawa, v. 42, p. 207-213, 1971.

YAMAUCHI, T.; HARA, T.; SOMODA, Y. Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell walls. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.27, p.729-732, 1986