**ESTUDOS E ANÁLISES DOS EFEITOS DO CÁLCIO SOBRE
O CRESCIMENTO INICIAL DO HÍBRIDO DE *Eucalyptus*
urophylla x *Eucalyptus grandis* CULTIVADO *in vitro***

MARCELO LANGER
Engenheiro Florestal

Orientador: Prof. Dr. **ANTONIO NATAL GONÇALVES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências - Área de Concentração:
Ciências Florestais.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Langer, Marcelo

Estudos e análises dos efeitos do cálcio sobre o crescimento inicial do híbrido de
Eucalyptus urophylla x *Eucalyptus grandis* cultivado *in vitro* / Marcelo Langer. - -
Piracicaba, 2000.

101 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Cálcio 2. Clone de eucalipto 3. Crescimento vegetal 4. Cultivo "in vitro" 5.
Meio de cultura I. Título

CDD 634.9734

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

O objetivo supremo
Que supera até a jóia-dos-desejos
Possa eu, constantemente, apreciar todos os seres vivos

Sempre que me relacionar com os outros,
Possa eu considerar-me o mais humilde,
E com perfeita intenção,
Possa eu apreciá-los como supremos.

Examinando meu continuum em todas as minhas ações,
Logo que uma delusão se desenvolva,
Pela qual, eu e os outros, agiríamos inadequadamente,
Possa eu, firmemente, enfrentá-la e evitá-la.

Sempre que encontrar seres desafortunados,
Oprimidos por maldade ou violento sofrer
Possa eu apreciá-los como se houvesse encontrado
Um raro e precioso tesouro.

Mesmo alguém que eu tenha ajudado
E em quem depositava grandes esperanças,
Não obstante, prejudicar-me sem nenhum motivo,
Possa eu vê-lo como meu sagrado Guia Espiritual.

Quando, por ciúme, os outros
Abusarem ou insultarem-me,
Possa eu assumir a derrota
E oferecer-lhes a vitória.

Em resumo, possa eu direta ou indiretamente,
Oferecer ajuda e felicidade a todas as minhas mães,
E secretamente tomar sobre mim
Todos os seus males e sofrimentos.

Ademais, por tudo o que foi dito,
Incotaminado pelas manchas das concepções dos oito extremos,
E com uma mente que vê todos os fenômenos como ilusórios,
Que eu seja libertado das amarras do conhecedor.

DEDICO

Ao meu pai *Francisco* - CARÁTER, HONESTIDADE E SABEDORIA,

A minha mãe *Carolina* - FORÇA, AMOR E BONDADE...

...que permanecerão eternos.

A todos os meus familiares - DISPONIBILIDADE, AMIZADE E APOIO.

Especialmente a minha filha LUÍSA - RAZÃO DE VIDA.

MUITO OBRIGADO

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Antônio Natal Gonçalves pela orientação, confiança e encorajamento - Amigo de todos os momentos.

Ao meu Mestre Professor Dr. Rudi Arno Seitz por sua honestidade à Ciência, apoio e amizade sempre presentes.

Ao meu grande amigo Eng. Agr. Roberto Bretzel Martins por sua amizade e companheirismo.

Aos amigos Eng. Agr. Carla D. Câmara, Eng. Agr. Simone Ap. Vieira, Eng. Ftal. Silvio P. P. de Sá, Eng. Ftal. Lúcio V. C. de Araújo e ao Biólogo Gustavo Maia Souza pelo incentivo e amizade durante todo este período

Ao Biólogo Edson Namita Higashi, por seus extensos auxílios e inesgotável interesse .

Aos amigos Eng. Ftal. Alexandre Monteiro, Biol. Andrea Vanini, Eng. Ftal. Kátia Georgia Gonçalves e todos os demais que facilitaram e estimularam este trabalho.

Aos meus especiais “padrinhos” Robson Vieira e Valéria Freixedas Vieira por seu amor e carinho tão oportunos.

Ao técnico de laboratório, José Roberto Romanini, e as estagiárias Rosa Maria F. Luccas e Angela Ap. Ferrari, pelo auxílio e atenciosidade.

Ao Departamento de Ciências Florestais da ESALQ/USP pela credibilidade depositada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa - CNPq, pelo aporte financeiro deste trabalho.

Ao meu Grande Mestre e Guru Geshe Kelsang Gyatso Rinpoche fonte de sabedoria e bondade que sempre mostrou-me o caminho correto para a Paz e Felicidade.

Aos meus sinceros amigos do Dharma, sempre amparando e mostrando os caminhos da verdadeira felicidade.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca	Cálcio	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônia
Ca ²⁺	Íon Cálcio	NaOH	Hidróxido de sódio
AIA	Ácido Indol Acético	PMF	Peso da matéria fresca
TCR	Taxa de crescimento relativo	PMS	Peso da matéria seca
N	Nitrogênio	NG	Número de gemas
P	Fósforo	(%S)	Porcentagem de sólidos
K	Potássio	TIBA	Ácido Triiodobenzóico
Mg	Magnésio	TFP	Trifluorperazine
S	Enxofre		
Fe	Ferro		
Na	Sódio		
Se	Selênio		
Co	Cobalto		
Cu	Cobre		
Mn	Manganês		
Si	Silício		
Ni	Níquel		
Cl	Cloro		
H	Hidrogênio		
C	Carbono		
Zn	Zinco		
B	Boro		
ATP	Adenosina trifosfato		
CaCl ₂	Cloreto de cálcio		
mM	Milimol		
PI	Fosfatidilinositol		
PIP ₂	PI 4,5-bifosfato		
InsP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato		
GA ₃	Ácido giberílico		
CK	Citocininas		
ABA	Ácido Abscísico		
PEP	Ácido Fosfoenolpiruvico		
TFP	Trifluorperazina		
CaAc	Acetato de cálcio		
g	Gramas		
ml	Mililitros		
W	Woltz		
BAP	Benzil-adenina		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	Nitrato de cálcio		
(NO ₃) ₂	Nitrato		

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1 Nutrientes minerais constituintes do vegetal	03
2.2 O nutriente mineral cálcio	03
2.2.1 Forma disponível e local de ação	03
2.2.2 Conteúdo e fatores que o determinam	05
2.2.3 Função do cálcio	07
2.2.3.1 Estrutura celular	07
2.2.3.2 Parede celular	08
2.2.3.3 Membrana celular	09
2.2.3.4 Alongamento celular	12
2.2.4 Segundo mensageiro	14
2.2.4.1 Relação entre a calmadulina e o cálcio	14
2.2.4.2 Relação entre a auxina/AIA e o cálcio	17
2.2.4.3 Relação entre outros hormônios vegetais e o cálcio	17

	Página
2.2.4.4 Relação das enzimas e o cálcio	18
2.2.5 Velocidade de absorção	19
2.2.6 Mecanismos de ação	21
2.2.7 Equilíbrio iônico	22
2.2.8 Sintomas de deficiência do Cálcio	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material Vegetativo	26
3.2 Padrão inicial do material cultivado	27
3.3 Condições de crescimento	27
3.4 Meio de cultura	28
3.5 Determinação do equilíbrio dinâmico dos íons do meio de cultura	30
3.6 Coleta de dados	31
3.6.1 Determinação do peso da matéria fresca (PMF)	31
3.6.2 Determinação do número de gemas (NG)	32
3.6.3 Determinação do peso da matéria seca (PMS)	32
3.6.4 Obtenção de informações qualitativas	32
3.6.4.1 Análise morfológica e sintomas nutricionais	33
3.6.4.2 Determinação química nutricional da matéria	33
3.7 Análise dos resultados	34
3.7.1 Delineamento estatístico	34
3.7.2 Determinação das taxas de crescimento relativo (TCR)	35
3.7.3 Análise estatística	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Peso da matéria fresca (PMF)	37
4.2 Peso da matéria seca (PMS)	40
4.3 Porcentagem da massa de água constituinte da matéria fresca	45
4.4 Porcentagem de sólidos totais constituintes da matéria seca (%S)	47
4.5 Número de gemas (classe II)	49

	Página
4.6	Porcentagem dos nutrientes totais analisados 54
4.7	Teor de cálcio constituinte da matéria seca 56
4.8	Taxa de crescimento relativo (TCR) 59
4.9	Inter-relações entre os nutrientes 61
4.10	Estado de equilíbrio dinâmico dos íons – Geochem 64
4.11	Sintomas de deficiência 65
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS 68
6	CONCLUSÕES 71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 72

**ESTUDOS E ANÁLISES DOS EFEITOS DO CÁLCIO SOBRE
O CRESCIMENTO INICIAL DO HÍBRIDO *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus
grandis* CULTIVADO *in vitro*.**

Autor: Marcelo Langer

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do cálcio sobre o crescimento inicial do clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* cultivado em meio de cultura. Foram definidos seis tratamentos com quatro repetições cada, em intervalos de observação de 7 dias, durante o período de 35 dias (0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias). Foi utilizado o meio de cultura JADS (Correia, 1993) com 0,0, 2,5, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio. Para estudar o efeito da concentração na assimilação deste elemento e o seu efeito no desenvolvimento vegetativo, foram medidos o peso da matéria fresca (g); o peso da matéria seca (g); o número de gemas e o teor de nutriente constituinte. A análise dos resultados permitiu obter as seguintes conclusões: i) as concentrações de cálcio causaram diferentes respostas à planta, determinando níveis de produtividade diferenciados em relação ao peso da matéria seca e ao número e homogeneidade de gemas, variando em função do período de cultivo; ii) as concentrações de cálcio diferenciadas alteraram os teores de absorção dos nutrientes minerais que variaram em função do período de cultivo e mantiveram o estado nutricional da planta; iii) altas concentrações de cálcio não mostraram efeito tóxico sobre a planta. Porém, a ausência de cálcio no meio provoca deficiências severas na planta; iv) o período de 21 dias de cultivo mostrou melhor resultados, tanto para o peso da matéria seca, número e homogeneidade de gemas, como também, para a absorção de nutrientes; v) as concentrações a partir de 7,5 mM de cálcio, podem ter possibilitado à planta atingir novos patamares de crescimento e desenvolvimento.

STUDIES AND ANALYSIS OF THE EFFECTS OF THE CALCIUM ON THE INITIAL GROWTH OF THE HIBRID *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis* CULTIVATED *IN VITRO*

Author: Marcelo Langer

Adviser: Professor Doctor Antonio Natal Gonçalves

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the effects of the calcium on the initial growth of an *Eucalyptus urophylla* and *Eucalyptus grandis clone* cultivated *in vitro*. Six treatments were defined with four repetitions each with evaluations at 0, 7th, 14th, 21st, 28th and 35th days of culture. The basic culture medium was JADS with 0,0, 2,5, 7,5, 10,0 and 15,0mM of calcium. In order to study the effect of the calcium concentration, fresh and oven dry weight; shoot number and nutrient content were determined. The analysis of the results allowed to draw the following conclusions: i) calcium concentrations caused different plant responses, determining different shoot numbers, homogeneity and oven dry weight, varying with the time of cultivation; ii) calcium concentration changed the nutrient content according of the time cultivation and keeping nutrition of the plants; iii) high calcium concentration were not toxic for the plants. Culture medium without calcium caused severe deficiency in the plant; iv) 21st day evaluation showed the best result for oven dry weight, number and homogeneity of shoots as well as for nutrient absorption; v) concentrations higher than 7,5 mM of calcium could let the plants achieve new growth and development.

1 INTRODUÇÃO

Um dos fatores de maior influência e determinação no rendimento da produtividade vegetal é o seu estado de equilíbrio nutricional e do meio em que a planta se desenvolve. O conjunto e as relações de certos elementos minerais determinam este estado nutricional ótimo para cada espécie, assim como o estabelecimento do equilíbrio deste conjunto mineral favorecerá a expressão da máxima potencialidade de produção da espécie.

O cálcio (Ca^{2+}) está relacionado a diversas atividades metabólicas e eventos morfofisiológicos conhecidos e/ou ainda em estudos. Acreditando-se que a determinação de sua concentração ótima, nas diversas fases de crescimento e desenvolvimento das plantas, poderá homogeneizar e aumentar a sua produtividade.

O cálcio possui ações diretas sobre os mecanismos de crescimento das plantas como também interage com outros nutrientes e componentes químicos contribuintes para o estímulo e a manifestação de atividades metabólicas de crescimento e desenvolvimento da planta. Apesar da unanimidade a respeito da essencialidade do Cálcio para o crescimento dos vegetais, muitos eventos a ele ligados ainda não foram completamente elucidados.

A importância do cálcio está ainda relacionada a sua ligação e dependência indireta à outras atividades celulares, internas ou externas. Também, certas características

estruturais e funcionais da célula, definem as suas taxas de absorção e assimilação e de outros elementos minerais, carácter de seletividade da membrana.

As técnicas laboratoriais de cultura de tecidos possibilitam a obtenção de dados e resultados mais rápidos, quando comparados ao tempo de obtenção dos dados e resultados à outras técnicas. Permitindo, desta forma um isolamento e delineamento mais preciso da variável a ser mensurada ou de seus efeitos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de várias concentrações de cálcio no crescimento inicial de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*, através da avaliação semanal do peso da matéria seca, número de gemas e teor de nutrientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nutrientes minerais constituintes do vegetal

O fornecimento de nutrientes deve ser tratado como uma dinâmica variável que é relatada como taxa de crescimento relativo. Define-se estado de equilíbrio dinâmico da planta quando as concentrações de nutrientes da planta permanecem constante sobre o tempo e o estado de equilíbrio dinâmico (steady-state) é obtido quando a taxa de adição de nutrientes é igual a taxa de absorção e a taxa de crescimento relativo (Ingestad & Agren, 1995).

2.2 O nutriente mineral cálcio

2.2.1 Forma disponível e local de ação

O cálcio é um cátion divalente (Ca^{2+}). Está localizado no apoplasto em uma forma trocável na parede celular e na superfície exterior da membrana plasmática. Sua taxa de absorção no citoplasma é severamente restrita e parece ser duplamente perdida somente por processos metabólicos. O cálcio, por exemplo, é usualmente menos concentrado no floema que

no xilema (Ting, 1982). A mobilidade do cálcio de célula para célula e no floema é muito baixa e é o único mineral que pode ter atividade fora do citoplasma (no apoplasma). A maioria das suas atividades esta relatada com a capacidade de coordenação, providenciando estabilidade e ligações intermoleculares reversíveis, predominantemente na parede celular e na membrana plasmática. Estes íons Ca^{2+} mediadores de ligações respondem localmente a mudanças das condições ambientais e são parte do controle dos mecanismos e processos de crescimento e desenvolvimento da planta. Cálcio é um nutriente mineral não tóxico, mesmo em alta concentração, e é muito eficiente na desintoxicação a altas concentrações de outros elementos minerais na planta (Marschner, 1986).

Para Poovaiah (1985), é bem conhecido que o cálcio tem um importante papel no crescimento e desenvolvimento da planta. E segundo Ting (1982), o cálcio tem papel importante no metabolismo da planta. Está intimamente envolvido na divisão celular porque é, como pectato de cálcio, um componente integrante da lamela média. Também, o cálcio é encontrado em vacúolos e como umceptor de íons para cargas negativas nas proteínas. O cálcio não é prontamente translocado depois de absorvido. Talvez mais importante, é a relação do seu papel estrutural na lamela média das células que sem ele a divisão celular não pode ser processada. Assim, os pontos de crescimento morrem na falta de cálcio. O cálcio também atua como o mais importante ator na manutenção da integridade da membrana, e sua deficiência causa mal funcionamento na seletividade de transporte. Outros sintomas da ausência de cálcio incluem cloroses generalizadas exceto ao longo dos vasos, os quais mantêm-se verdes e aparece um dobramento nas folhas (encarquilhamento). Raízes são quase sempre pobremente desenvolvidas e podem ser gelatinosas. A frutificação é heterogênea (Ting, 1982).

Stocking & Ongun (1962) e Larkum (1968) concluíram, que os cloroplastos atuam como sítios para a acumulação do cálcio. Mitocôndrias são ricas em cálcio, e este nutriente mineral tem um importante papel na sua estrutura e função. A acumulação de cálcio na mitocôndria providencia outros significados para o transporte do cálcio intracelular e o seu controle no citoplasma (Marmé, 1983). A liberação de cálcio da mitocôndria e dos vacúolos, ou ambos, e subsequente mudanças na permeabilidade da membrana induzida pelo cálcio mais

parecem um essencial passo na regulação do turgor sistomático do movimento dos folíolos das mimosas (Marschner, 1986).

2.2.2 Conteúdo e fatores que o determinam

O conteúdo de cálcio na planta varia entre 0,1 a > 5,0% da matéria seca dependendo das condições de crescimento, espécie da planta e órgãos da planta. Diferenças genotípicas no requerimento de cálcio são relatadas para os sítios de ligação do cálcio na parede celular, isto é, a capacidade de trocas de cátions. Outro fator que determina um requerimento de cálcio para um ótimo crescimento é a concentração de outros cátions na solução externa. Porque o cálcio é prontamente substituído por outros cátions em seus sítios de ligação na superfície exterior da membrana plasmática, a demanda de cálcio aumenta com o aumento da concentração externa de metais pesados, cloreto de sódio ou prótons (Marschner, 1986).

As concentrações de cálcio nos tecidos sadios de muitas plantas cultivadas variam de 0,2% (base da matéria seca) e vários por cento. É muito provável, entretanto que esses valores excedam as exigências metabólicas mínimas. Como valores tão baixos são toleráveis somente em baixas concentrações de outros cátions divalentes, parece que os níveis de cálcio normalmente mais altos sirvam para tornar inócuas concentrações desses metais que de outro modo seriam tóxicos (Malavolta, 1980).

O nível de cálcio livre no citoplasma e nos cloroplastos é muito baixo. Tais níveis devem ser mantidos em ordem de prever uma precipitação de fósforo, competição com o magnésio por sítios de ligação e inativação ou ativação incontrolada de certas enzimas. A membrana plasmática apresenta uma barreira efetiva para a penetração do cálcio. Se existe adicional ativação da bomba de saída do cálcio na membrana plasmática das células das plantas é ainda uma especulação (Marschner, 1986).

Plantas cresceram em solução nutritiva em que a concentração de cálcio era mantida baixa e constante em valores que iam de 0,0003 a 1mM. As plantas cresceram cada vez

melhor na faixa 0,003 a 0,0025 mM de cálcio mas em concentrações mais altas houve pouco ganho adicional no crescimento, embora mais do elemento fosse absorvido (Epstein, 1975).

Em experimentos com tecido do pericarpo do tomate durante o desenvolvimento de frutos, o conteúdo de cálcio na parede celular aumentou fortemente nos estádios de desenvolvimento imaturos, mas foi seguido por uma queda no conteúdo exatamente antes do início do surgimento dos frutos (amolecimento do tecido). Simultaneamente uma mudança no estágio de ligação do cálcio ocorreu para o cálcio solúvel em água que é favorável ao limite de cálcio da parede. Esta mudança está associada com o alto aumento na formação de etileno no tecido do fruto.

Teasdale & Richards (1990), cultivaram células de *Pinus radiata* em suspensão, em diferentes concentrações de Ca (0,2 mM e 3,0mM) e Mg (1,5mM e 7,5mM). Após 16 dias de cultura, os autores verificaram que um nível elevado de Mg (7,5mM) no meio de cultura provocou um ligeiro aumento na produção de células; e resultado similar foi obtido quando a concentração de Ca (0,2mM) foi reduzida. Entretanto, quando ambas estas mudanças foram combinadas, verificou-se uma grande diminuição na concentração de ácido bórico nas células em suspensão. Os mesmos autores verificaram os efeitos no crescimento de cultura de células variaram com a concentração de Mg devido a presença da variação da concentração de B. Em baixa concentração de Ca^{2+} houve um aumento na concentração de Mg.

Um aumento na concentração de cálcio na solução externa apresenta um aumento no nível de cálcio nas folhas, mas não necessariamente em órgãos com baixas taxas de transpiração tais como frutos e tubos do floema. As plantas têm desenvolvido mecanismos para restringir o transporte do cálcio para estes órgãos pela manutenção de baixas concentrações de cálcio na seiva elaborada (floema) ou pela precipitação de cálcio como oxalato ao longo dos vasos de condução ou em cascas de sementes (Mix & Marschner, 1976a). Diluição da concentração de cálcio pelo crescimento é um outro caminho para manter o nível de cálcio baixo, o qual é necessário em frutas e tecidos de reserva para rápida expansão celular e alta permeabilidade da membrana (Mix & Marschner, 1976b).

A taxa de saída de cálcio depende da concentração de cálcio no meio em que se encontra a planta (muda). O cultivo de segmentos de hipocótilo de girassol em 10,0mM de CaCl_2

por 24 horas não eliminou o fluxo líquido acropetal de cálcio a zona apical final (De Guzman & Dela Fuente, 1984).

2.2.3 Função do cálcio

Existem duas áreas distintas na parede celular com alta concentração de cálcio: a lamela média e a superfície exterior da membrana plasmática. Em ambas as áreas o cálcio tem função estrutural essencial, a regulação da permeabilidade da membrana e os processos relacionados a ela e o fortalecimento da parede celular, respectivamente (Marschner, 1986).

O cálcio é o principal cátion da lamela média da parede celular e está na forma de pectato. O elemento tem por isso importante relação com a resistência mecânica dos tecidos. Nas algas, outros polissacarídeos de cálcio e de magnésio são componentes importantes da parede celular. Em algumas plantas, algas inclusive, os sais de cálcio ocorrem em forma sólida, o oxalato e o carbonato sendo os mais comuns e o fosfato e o sulfato menos freqüentes (Malavolta, 1980).

2.2.3.1 Estrutura celular

A arquitetura de uma célula vegetal determina que um íon da solução externa para chegar ao vacúolo central deva passar por várias regiões. O íon deve primeiro atravessar a parede celular, em seguida deve passar pela membrana plasmática externa. Finalmente caminha através da membrana plasmática interna, o tonoplasto, chegando ao vacúolo. Assim o plasmalema, do ponto de vista funcional, forma o limite externo da célula onde ela está em contato com o fluido extracelular. A implicação dessa afirmação é que a parede celular externa

ao plasmalema não é uma barreira funcional entre a célula e o meio. Observações fisiológicas e químicas dão apoio a essa conclusão (Epstein, 1975).

2.2.3.2 Parede celular

Em contraste com outros elementos minerais, o cálcio está largamente localizado na parede celular (apoplasto). Esta distribuição única é o resultado da existência de abundantes sítios de ligação para o cálcio na parede celular como também no restrito transporte de cálcio através da membrana plasmática para dentro do citoplasma. Na lamela média, ele é limitado pelo R.COO- grupos de ácido poligalacturônico (pectinas) ,em algumas formas trocáveis. As formas do cálcio, mais comuns são: pectato, oxalato e fosfato de cálcio .O oxalato de cálcio e a maioria do fosfato de cálcio são precipitados nos vacúolos. A maioria do cálcio solúvel em água está no vacúolo e é acompanhado por ânions de ácido orgânicos (malato) e íons inorgânicos (nitrato). A concentração de cálcio no citosol é extremamente baixa (Marschner, 1986).

A proporção de pectato de cálcio na parede celular serve sem dúvida para determinação da susceptibilidade do tecido à infecções fúngicas. Estes resultados suportam fortemente o ponto de vista que a solubilização do cálcio liga-se em sítios na parede celular e subsequente a redistribuição do cálcio nas células (provavelmente via transporte para os vacúolos), depressão da polygalacturonase e também as atividades do sistema de geração do etileno, o qual é localizado no complexo parede da célula-membrana plasmática, que é, na interface da membrana-parade celular (Mattoo & Lieberman, 1977).

2.2.3.3 Membrana celular

O papel fundamental do cálcio na estabilização da membrana e na integridade celular é refletido de várias formas. Isto pode ser demonstrado pelo aumento da perda dos solutos de baixo peso molecular das células de tecido deficiente de cálcio, e em plantas severamente deficientes, pela geral desintegração das estruturas da membrana e perda da compartimentalização celular.

O cálcio estabiliza as membranas celulares por trazer grupos de fosfato e carboxilas de fosfolipídeos e proteínas, preferencialmente para a superfície da membrana. Poderia haver uma troca entre o cálcio e outros cátions naqueles sítios de ligação (isto é, K, Na ou H) embora o atraso não possa substituir o cálcio no seu papel de estabilização das membranas, mesmo o cátion divalente Mg não poderia substituir o cálcio nesta função. Para completar suas funções na membrana plasmática, o cálcio na maioria das vezes está presente na solução externa, onde ele regula a seletividade da absorção de íons e previne perdas de solutos do citoplasma. O efeito do cálcio na membrana de proteção é mais proeminente sob várias condições de estresse tal como temperatura baixa e condições anaeróbicas (Marschner, 1986).

Para Malavolta (1980), quanto maior a demanda na maquinaria seletiva do plasmalema, através da presença, no meio de cultivo, de íons potencialmente prejudiciais quando em alta concentração, mais crucial parece ser o papel do cálcio na manutenção da integridade da membrana.

A lentidão dos processos de convecção e difusão é suficiente para manter as soluções separadas e conservar a composição respectiva durante muito tempo. Por outro lado, se duas soluções de composição química muito diferentes forem separadas por uma distância medida em frações de uma micra, deverá existir uma barreira à difusão dos solutos das duas. Sem essa barreira a agitação térmica do solvente e dos solutos, causando difusão e convecção, resultaria na rápida mistura das duas soluções. O fato de que as soluções externa e interna possam diferir marcadamente em sua composição química é, por conseguinte, evidência da

existência de uma barreira à difusão livre. A membrana citoplasmática das células é essa barreira essencial (Epstein, 1975).

É essa membrana que representa a linha de demarcação entre a solução externa com sua composição particular e o interior da célula que tem composição caracteristicamente diferente. Existem organelas intracelulares que por sua vez estão separadas do citoplasma por membranas e que mantêm, no volume limitado por suas próprias membranas, concentrações e relações distintas dos vários solutos. Mas o sistema citoplasmático como um todo é separado do meio externo pela membrana citoplasmática. Sem essa barreira a célula seria inundada pelo meio químico externo, uma situação incompatível com a intrincada e quimicamente delicada maquinaria da vida (Epstein, 1975).

Somente a parte da célula que é externa ao plasmalema está em equilíbrio de difusão e troca com a solução externa. Além do plasmalema jazem os espaços "interiores". As espécies e concentrações dos íons nesses espaços estão sob o controle ativo e metabólico da célula. Esses íons fixos ou não difusíveis segurariam eletrostaticamente os íons potencialmente difusíveis no interior da célula. Entretanto, numerosos experimentos com íons marcados mostraram que mesmo a troca de um íon interior por outro da mesma espécie situado no exterior é grandemente impedida pela membrana celular (Epstein, 1975).

Quando as membranas responsáveis por essa retenção são danificadas, dá-se uma migração rápida do cloreto marcado para fora do tecido e o interior da célula se torna indistingüível da solução externa no que tange a distribuição de íons cloreto marcados e inertes. Em tecidos normais e sadios a membrana atua como uma barreira a difusão livre à troca (Epstein, 1975).

Tem sido, às vezes, argumentado que existe um trânsito iônico apreciável para dentro e fora do tecido vegetal graças a difusão e a troca através do plasmalema. A perda inicial e rápida de íons é atribuída a difusão e troca dos íons radioativos das paredes celulares ou espaço "livre". A fração seguinte, que é perdida mais lentamente, é interpretada como representando os íons do citoplasma que atravessam o plasmalema tido como permeável. A fase final representa a perda lenta de íons do vacúolo. Nessa interpretação o tonoplasto é menos permeável que o plasmalema e, por conseguinte, a saída de íons do vacúolo é o mais lento dos

saídas observados. A análise da saída foi interpretada em termos da difusão de íons através do plasmalema e do tonoplasto (Epstein, 1975).

De acordo com a hipótese do carregador e mais especificamente com a formulação da cinética enzimática, o íon é preso de forma transitória ao carregador. Isto implica que da mesma forma que as enzimas têm "sítios ativos" (subgrupos moleculares que se ligam com o substrato) os carregadores devem tê-los também para segurar os íons. Há muitas provas da existência de uma especificidade ou seletividade semelhante no transporte iônico por meio do carregador (Epstein, 1975).

Em termos da formulação de cinética enzimática da hipótese do carregador esse resultado é interpretado como prova de que os sítios ativos do carregador que prendem e transportam o potássio devem ter baixa afinidade pelo sódio: o sódio, portanto, deixa de competir com o potássio. É encontrado freqüentemente que em baixas concentrações de potássio sua absorção não é afetada pela presença de cálcio em alto excesso. Não obstante, certos íons são tão parecidos quimicamente que os mecanismos de transporte não os identificam. Tais íons competem uns com os outros no processo de absorção. Essa competição indica que os dois íons se ajustam a um sítio comum no carregador (Epstein, 1975).

Com respeito à absorção de um íon dado (o íon substrato), a presença de outro de mesmo sinal na solução pode diminuir o transporte do primeiro, acelerá-lo ou não ter efeito. Muitas vezes a velocidade de absorção de um íon é completamente indiferente à presença de outro íon do mesmo sinal, como se viu no caso da absorção do potássio na presença de excesso de sódio; esta seletividade depende absolutamente da presença de cálcio no meio. Em sua ausência ela se rompe e daí resulta uma competição indiscriminadamente e não seletiva entre os membros de praticamente qualquer par de ânions ou de cátions. O papel do cálcio no funcionamento da membrana é, pois, duplo: mantém sua impermeabilidade aos íons tornando mínimo o transporte por difusão e garante a seletividade dos mecanismos de transporte iônico. Na presença de cálcio a configuração molecular do sítio ativo do carregador conduz ao "ajustamento" preferencial para o potássio (e rubídio). Na ausência de cálcio a geometria do sítio ativo é afrouxada de modo que outros íons, o sódio, inclusive são admitidos (Epstein, 1975).

É certo que a interferência na síntese proteica por inibidores adequados interfere

também com a absorção iônica e uma produção da capacidade de absorção em discos recém cortados de tecidos de reserva; isso entretanto não prova que os carregadores sejam proteínas – virtualmente qualquer atividade celular pode em última instância depender de produção, manutenção e renovação das proteínas. Não obstante permanece provável que os carregadores estejam diretamente relacionados com as proteínas ou sejam de natureza protéica (Pardee, 1968).

De acordo com as provas cinéticas os carregadores devem ter a propriedade de prenderem íons seletivamente. Há prova de que estes sítios de ligação no tecido vegetal deve ser extremamente reduzidos. Quando se acompanha a absorção em função do tempo a relação é linear e os dados, por extrapolação, dão absorção zero no tempo zero (Epstein, 1975).

Pressman e Pressman & Haynes (1969), descreveram certos antibióticos polipeptídicos que se ligam ao potássio com alto grau de especificidade e aceleram o seu movimento através de membranas biológicas. Isto é, eles agem como ionóforos ou carregadores de íons. A valinomicina é um desses compostos. A elucidação da estrutura do complexo valinomicina-potássio mostra que a molécula do polipeptídio forma uma “jaula” molecular em que o íon potássio não hidratado é aprisionado (Ohnishi & Urry, 1970). Foram encontrados outros desses polipeptídeos que se ligam a íons (Pressman & Haynes, 1969). Existem, portanto, configurações moleculares precisamente do tipo contemplado com base nos experimentos de cinética do transporte iônico e nos conceitos daí desenvolvidos sobre os carregadores através de membranas e seu modo de operação.

2.2.3.4 Alongamento celular

Na ausência de suprimento de cálcio exógeno, a extensão radicial cessa em poucas horas. O efeito é distinto no cálcio livre em solução com água destilada, o que é uma observação consistente em função do cálcio contrabalançar os efeitos negativos da concentração de outros íons na membrana plasmática. Embora o cálcio possa estar também envolvido na

divisão celular (Burstrom, 1968), a paralisação do crescimento radicial na falta de cálcio exógeno tem primeiramente um resultado na inibição da extensão celular. O papel do cálcio na extensão celular ainda não é claro, existem indicações, de que o cálcio seja requerido para o transporte e incorporação do material para dentro da parede celular (Reiss & Herth, 1979)

Experiências tem mostrado uma correlação positiva entre a plasticidade da parede celular e o crescimento da célula. Assim, isto representa que durante a expansão celular há um aumento na plasticidade da parede celular. Sendo assim, a plasticidade vem através de uma alteração entre os íons e as ligações covalentes com a parede celular apropriada. Para isto a pectina compõem uma ligação das paredes celulares com os íons cálcio. E a retirada do cálcio quebra esta atração pelas pectinas. Esta ligação iônica é feita através de carboxilas de pectinas (Ting, 1982).

Como o cálcio, o ácido Indolacético (AIA), e o aumento da extensão celular estão interrelacionados é ainda um ponto de controvérsia (Burstrom, 1968; Hertel, 1983). As auxinas estão envolvidas no transporte de cálcio no tecido da planta e na inibição do transporte do cálcio ou um declínio no nível da auxina (isto é, pela aplicação do TIBA) induz a sintomas de deficiência de cálcio. Mais ainda, a auxina induz o aumento da excreção de prótons, que é um pré-requisito para os processos de perda pela parede e assim para a extensão celular, exigindo para isso a presença de cálcio exógeno (Cohen & Nadler, 1976).

O papel crucial da auxina na indução da redistribuição do cálcio na graviestimulação tem sido demonstrado nas raízes. A inibição pela auxina é igual a inibição pela TIBA, ambas estão ligadas a redistribuição do cálcio e seu gravitropismo (Lee *et al.*, 1984). Estes resultados refletem o complicado controle funcional que o cálcio exerce na extensão radicial. Pode-se perceber que em plantas intactas o crescimento em extensão da raiz é diminuído somente um pouco pela alta concentração de cálcio exógeno.

O cálcio pode também ser importante para a regulação hormonal do crescimento radicial. Embora, muitos níveis mínimos de cálcio sejam essenciais para o crescimento normal da raiz (Burström, 1952), aumentos repentinos em cálcio no meio em torno das raízes de mudas causa forte breve inibição do alongamento. Similar breve inibição no alongamento das raízes é observado pela aplicação de baixas concentrações de auxina (Gougler & Evans, 1981). A forte

dependência do alongamento celular em ambos, cálcio e auxina, aumentam a ênfase do cálcio como segundo mensageiro da ação dos hormônios das plantas (Hepler & Wayne, 1985). Isto, tem sugerido que a indução hormonal tem ocasionado uma flutuação no nível de cálcio no citoplasma o que pode ser um fator chave na expressão dos efeitos hormonais (Hasenstein & Evans, 1986).

Assim, ao mesmo tempo, que o cálcio estabiliza a parede celular, existe uma ação que é contrária induzindo o crescimento em extensão pela auxina (Cleland & Rayle, 1977). Consistindo com isto a observação de que o início do crescimento dos coleóptilos graviestimulados, e a redistribuição do cálcio no apoplasto ocorrem com o movimento do cálcio da parte de baixo do coleóptilo em direção a parte alta (Slocum & Roux, 1983).

2.2.4 Segundo mensageiro

Na década de 80, muitas publicações (Chandra *et al.*, 1982; Daye *et al.*, 1984; Evans & Lee, 1984; Evans *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Marmé, 1983; Sievers *et al.*, 1984; Slocum *et al.*, 1984; Slocum & Roux, 1983) e revisões (Hepler & Wayne, 1985; Moore & Evans, 1986; Pickard, 1985; Roux & Slocum, 1982) têm atribuído ao íon cálcio um importante papel na gravipercepção e resposta pelas gemas e raízes da planta. Isto surge da corrente geral de interesse no cálcio como segundo mensageiro e a partir da assimetria de cálcio observada seguida de resposta gravitrópica.

2.2.4.1 Relação entre a calmodulina e o cálcio

O cálcio é conhecido por intermediar um número de funções celulares relacionadas ao crescimento e desenvolvimento da planta (Roux & Slocum, 1982), e o papel de

segundo mensageiro desenvolvido pelo complexo Ca-calmodulina tem sido proposto (Marmé, 1982). Sistemas de absorção geral de cálcio tem sido descobertos: há sustentações de que sistemas derivados da membrana plasmática (Gross & Marmé, 1978; Kubowicz *et al.*, 1982) e retículo endoplasmático (Buckhout, 1983; Buckhout, 1984), para uma associação de Ca/H com vesículas presumivelmente derivadas do tonoplasto (Rasi-Caldogno, *et al.*, 1982), e também para absorção de cálcio pela mitocôndria (Day & Wiskich, 1984; Lew *et al.*, 1986).

Para Migliaccio & Galston (1989), os resultados encontrados em estudos com epicótilos de ervilhas suportam o ponto de vista de que, adequada taxa de cálcio no apoplasto é requerida para uma normal absorção, transporte e graviresposta. Experimentos com protoplasto indicaram que o cálcio pode estar controlando um carregamento da membrana, provavelmente localizado na superfície externa da membrana celular, enquanto experimentos com inibidores sugerem que a calmodulina está também implicada em ambos os movimentos do AIA e graviresposta. Apesar da maior transferência de cálcio através dos espaços livres durante a graviresposta, não foi ainda comprovado, e desde de que a inibição dos canais de cálcio não afetam a redistribuição do AIA (Migliaccio & Galston, 1987), estes autores, concluíram que evidências não claras ligam principalmente o movimento do cálcio com a redistribuição do AIA durante a graviresposta do ramo.

Recentes evidências têm sido acumuladas indicando que o regulador da dependência-cálcio proteína calmodulina esta envolvido no processo regulado pelo íons cálcio (Hepler & Wayne, 1985). Poovaiah (1985), sugeriu um possível envolvimento da calmodulina na ação de hormônios nas plantas.

Evidências têm sido apresentadas sobre a ligação do cálcio com a calmodulina, determinando uma ação na regulação de enzimas. A calmodulina é um componente de baixo peso molecular que liga o cálcio reversivelmente e com alta afinidade e seletividade. Isto ativa um número de enzimas chaves tais como fosfolipases e NAD kinase, provavelmente pela formação de complexo cálcio-calmodulina com as enzimas. Isto pode também controlar o transporte de cálcio nas células como também mediar a transferência de cálcio para os vacúolos. Elevados níveis de ligações entre ca-proteína (calmodulina) foram encontrados no citoplasma de plantas calcícolas mas somente em baixos níveis nas plantas calcífugas. Isto pode refletir um mecanismo

para a adaptação de plantas em solos calcáreos. Por tais mecanismos as plantas podem manter um baixo nível de cálcio livre no citoplasma das células de raízes (Marschner, 1986).

Se a calmadulina também controla a saída de cálcio na membrana plasmática ainda não se pode afirmar. Porém, Hertel (1983), tem oferecido uma interessante hipótese no fluxo reverso de cálcio e auxina através da membrana plasmática mediado pelo transporte ativo de auxina, os quais abrem portões para a saída de cálcio ao longo do gradiente eletroquímico. Esta hipótese pode auxiliar a explicação de algumas interrelações entre o transporte e ação a nível celular tanto do cálcio como da calmadulina, particularmente em relação a extensão celular.

A proteína calmadulina é um regulador essencial sub-unitário para algumas proteínas kinases, contudo, a calmadulina não pode se ligar e ativar a enzima a menos que primeiro ela esteja ligada a quatro íons de cálcio (Fosket, 1994).

A calmadulina consiste de somente 148 aminoácidos e ela tem quatro sítios de ligação para os íons cálcio, dois no domínio da terminação carboxila e dois no domínio da ligação amino-terminal. Após a ligação dos íons cálcio com a calmadulina, ele é apto a ativar outras proteínas celulares. O complexo cálcio-calmadulina não tem atividade enzimática por si próprio; contudo, ele freqüentemente age como um regulador sub-unitário para outros complexos enzimáticos, assim como o cálcio-calmadulina depende da proteína kinase (Ca-kinase). Estas proteínas kinases são inativas a menos que tenham ligações com o cálcio-calmadulina antes que elas sejam aptas a adicionar grupos fosfatos para serina e/ou grupos hidroxilícos de trionina em outras proteínas (Fosket, 1994).

Hertel (1983), tem sugerido que o movimento de auxinas através dos compartimentos intracelulares das membranas está associado com um mecanismo de controle permitindo a liberação de cálcio daqueles compartimentos para dentro do citoplasma. Ele propõem que a elevação do cálcio citoplasmático causa os efeitos atribuídos a hormônios, com cálcio por qualquer ação direta ou através do cálcio modulador proteína calmadulina.

2.2.4.2 Relação entre a auxina/AIA e o cálcio

Hasenstein & Evans (1986) encontraram resultados indicando que o cálcio pode ser necessário para regular a ação da auxina no crescimento. O significado deste achado é discutido com respeito ao potencial papel do cálcio como um segundo mensageiro na ação da auxina e a relevância deste modelo recentemente evidenciada pela gravindução da redistribuição do cálcio e seus papéis no estabelecimento da curvatura do gravitropismo. Havendo evidências para a aproximação da ligação entre o cálcio e os hormônios de crescimento das plantas. Isto tem apresentado uma grande importância no papel do transporte da auxina e secreção (Dela Fuente, 1984), síntese de etileno (Lau & Yang, 1976; Lau *et al.*, 1977), secreção de enzimas (Gaspar *et al.*, 1983; Penel *et al.*, 1984) senescência (Lesham *et al.*, 1984) e gravitropismo (Lee *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1984; Slocum & Roux, 1983).

O AIA, como também a auxina sintética ácido alfa-naftalenoacético, aumentaram significativamente a saída de cálcio. O transporte de auxina, não meramente sua presença no meio, foi definido como sendo um requisito para o aumento do fluxo de cálcio desde que a presença do inibidor do transporte de auxina, o ácido 2,3,5-triiodobenzoico, eliminasse a promoção do fluxo de cálcio. Um modelo para explicar como a promoção do fluxo de cálcio pode agir na promoção subsequente da secreção de auxina foi proposto. Onde, o cálcio serve como um segundo mensageiro, como o faz para a secreção de várias substâncias para as células animais (De Guzman & Dela Fuente, 1984).

2.2.4.3 Relação entre outros hormônios vegetais e o cálcio

Muitos hormônios vegetais estimulam um aumento do nível de cálcio no citoplasma, e isto pode voltar a desencadear uma variedade de respostas celulares. O nível elevado de cálcio é breve, porque o cálcio citoplasmático é rapidamente bombeado de volta para a célula ou para dentro dos locais de reserva do cálcio. Por exemplo, a giberelina estimula a

síntese e secreção da alfa-amilase pelas células do aleuroma da cevada na presença de milimolares de cálcio nos níveis externos. A giberelina ativa a transcrição da decodificação de genes da alfa-amilase como também a síntese e secreção de enzimas. Esta resposta é procedida por um tripece aumento da indução de giberelina-cálcio. Ácido abscísico bloqueia a indução da síntese de giberelina alfa-amilase, como também o aumento em cálcio pode fazer isto (Fosket, 1994).

A combinação do cálcio do meio MS (3,0mM) com 0,5 mg.l⁻¹ de GA₃ resultou ser altamente significativo. Nesta situação, entretanto, apresentou-se uma deformação foliar notável. Se recomenda utilizar uma concentração menor de GA₃ (0,1 mg.l⁻¹) em combinação com tratamentos de períodos curtos de escuridão (Calderon-Baltierra, 1994).

Já para Lew *et al.* (1986), os hormônios AIA, GA₃ e ABA não apresentaram efeitos sobre a absorção do cálcio tanto na presença quanta na ausência de calmadulina. A falta de um efeito pelo hormônio, myoinositol 1,4,5-trifosfato e luz vermelha/vermelha longa sugere que isto é diretamente envolvida em qualquer papel do Ca-calmadulina como um segundo mensageiro.

2.2.4.4 Relação das enzimas e o cálcio

O cálcio estimula a ligação de enzimas da membrana, particularmente ATPases da membrana plasmática das raízes de certas espécies de plantas. Porque as atividades de muitas ligações enzimáticas da membrana são moduladas pela estrutura da membrana, o cálcio presumivelmente alonga a atividade daquelas enzimas mesmo pensando que esta união é para sítios não catalíticos das membranas.

Porque a PEP carboxilase é uma enzima chave para a fixação de CO₂ nas espécies C₄, um nível muito baixo de cálcio livre nos cloroplastos é pré-requisito para uma alta taxa de fotossíntese. Como também nas plantas C₃, a fixação de CO₂ cessa abruptamente se a concentração de cálcio no estroma dos cloroplastos encontra-se ao mesmo nível do Mg.

Íons de cálcio são cofatores de várias enzimas mas raramente com muita especificidade. O cálcio pode inibir competitivamente o efeito ativador do magnésio, evidentemente por deslocá-lo de seus sítios funcionais.

2.2.5 Velocidade de absorção

Por outro lado, em baixas concentrações, a velocidade de absorção aumenta rapidamente com o aumento no fornecimento externo do potássio; nas concentrações progressivamente mais altas cada incremento determina aumentos cada vez menores na velocidade de absorção; nas concentrações mais altas a absorção do potássio é virtualmente independente daquela.

A ausência de cálcio causa rapidamente um desarranjo na estrutura e no funcionamento da membrana, pois a presença de cálcio determina a condição fisiológica normal. Assim, a velocidade de absorção é diminuída na ausência de cálcio, porém não aumenta na sua presença. Entretanto, quando concentrações muito altas de cálcio aceleram a absorção de um íon além das velocidades observadas em níveis baixos e médios desse cátion, pode-se falar num verdadeiro efeito estimulante ou efeito Viets (Epstein, 1962). O lítio, um elemento que tem muita afinidade química para com o cálcio também produz o efeito Viets (Epstein, 1962).

Em células vacuoladas de folhas em particular, uma larga proporção do cálcio está localizada nos vacúolos, onde eles contribuem para o balanço do cátio-ânion agindo como um inversor para ânions inorgânicos e orgânicos. Em plantas com, preferencialmente, síntese de oxalato em resposta para redução de nitratos, a formação de oxalato de cálcio nos vacúolos auxilia a manter baixos os níveis de cálcio no citoplasma e também nos cloroplastos (Marschner, 1986).

Epstein (1961), mostrou a essencialidade do cálcio para o transporte iônico normal em ensaios conduzidos em condições muito mais suaves. O transporte de íons para as células tem lugar através das membranas externas, o plasmalema. A descarga no principal

depósito salino, o vacúolo, implica no transporte através da membrana vacuolar ou tonoplasto. Há também trânsito iônico através do envelope membranoso dos núcleos, das mitocôndrias e de outras organelas. A membrana citoplasmática mais externa ou plasmalema está atrás da parede celular. Os íons da solução do solo antes de atingir tal membrana devem portanto, passar pelos interstícios da parede celular ou ao longo das superfícies de troca catiônica das fibrilas da citada parede. Durante essa passagem através da parede celular os íons são, num certo sentido, ainda parte da solução externa: a solução do espaço exterior é um prolongamento da solução do solo.

A velocidade do transporte por meio do carregador, como o da catálise enzimática, depende de dois fatores. Um é um fator de capacidade que denota a velocidade máxima de transporte que pode ser atingida quando todos os sítios carregadores estão carregados. O outro é um fator de intensidade que reflete a fração do carregador de fato ocupado numa concentração dada do íon. Essa velocidade é o produto da concentração total dos sítios carregadores presentes e a velocidade de renovação "turn over" dos mesmos carregadores dentro da membrana. A constante de Michaelis é igual a concentração do íon que dá metade da velocidade máxima de absorção. Quanto mais baixo esse valor, ou seja, quanto menor a concentração do íon que resulta na metade da velocidade máxima, tanto maior a afinidade dos sítios carregadores pelo íon.

O tecido atua como material trocador de cátions (Epstein, 1975). Os sítios negativos do tecido que compõem sua capacidade de troca catiônica são chamados sítios eletronegativos ou cargas negativas fixas (Dainty & Hope, 1961) e o volume no qual os cátions presos estão confinados é denominado "espaço livre de Donnan" do tecido (Briggs *et al.*, 1958). Desprezando-se a distinção entre íons que se difundem livremente no espaço "exterior" e aqueles presos pelas cargas negativas dos sítios de troca da parede celular, a totalidade dos mesmos (difusíveis, mas trocáveis) diz-se estar no espaço livre aparente do tecido. (Briggs, 1957; Briggs *et al.*, 1961; Briggs & Robertson, 1957; Hope & Stevens, 1952).

2.2.6 Mecanismos de ação

O mecanismo 1 de ação, opera em baixas concentrações e o mecanismo 2 de ação, começa a operar em concentrações de ordem de 1,0mM e acima, isto é, tem uma afinidade pelo íon muito menor que o mecanismo 1. A absorção do potássio pelo mecanismo 1 é seletiva para esse elemento e para o rubídio. Nem o sódio ou outros cátions (lítio, cálcio, magnésio) competem efetivamente com o potássio por esse mecanismo. Ao contrário disso, a absorção do potássio pelo mecanismo 2 sofre interferência por parte de outros cátions como o sódio e o cálcio (Epstein *et al.*, 1963; Rains & Epstein, 1967). Isto é, diferentemente do mecanismo 1, o mecanismo 2 não mostra um alto grau de especificidade; outros cátions podem ocupar os sítios desse mecanismo.

O mecanismo 1 está no plasmalema, a membrana citoplasmática externa. O mecanismo de absorção no plasmalema, a primeira membrana a ser vencida pelo íon, deve por conseguinte ter por ele afinidade suficiente para prende-lo e transportá-lo apreciavelmente mesmo quando sua concentração é muito baixa. Somente o mecanismo 1 possui esta afinidade. Tais mecanismos devem, portanto, estar no plasmalema em contato com a solução externa. Nas concentrações baixas que freqüentemente prevalecem nessa solução, o mecanismo 2 não faz contribuição apreciável à absorção (Epstein, 1975).

Um segundo tipo de prova apontando o plasmalema como o local do mecanismo 1 é o efeito do cálcio. A absorção do potássio, do cloreto e de outros íons dentro dos limites do mecanismo 1 é abaixo de ótima quando não há cálcio presente na solução externa. Além disso a velocidade de absorção freqüentemente não é constante sob tais condições, declinando rapidamente às vezes nos primeiros minutos do período de absorção. Mediante a adição de cálcio a velocidade logo volta ao valor alto e constante, característica do tecido mantido em solução que contém esse elemento. E, finalmente, a seletividade da absorção é prejudicada quando não há cálcio presente. Como o interior da célula não é deficiente em cálcio, o mecanismo 1 tão afetado pela concentração externa do elemento deve, por conseguinte, estar localizado na membrana banhada por tal solução, plasmalema (Epstein, 1965, 1966).

Com relação ao mecanismo 2, acredita-se que ambos os mecanismos trabalhem em paralelo, implicando que os mecanismos do tipo 2 também residam no plasmalema (Epstein *et al.*, 1963). Considerando então que as células vegetais possuem duas membranas, o plasmalema e o tonoplasto, e dois mecanismos de absorção de um mesmo íon, pensaram eles ser provável que um desses mecanismos devesse residir numa das membranas e o segundo na outra. Entretanto, com ensaios posteriores eles concluíram que os mecanismos do tipo 2 não estão localizados no tonoplasto (Epstein, 1975).

Kannan (1971), forneceu prova independente de que os dois tipos de mecanismos de absorção estão no plasmalema. Ele observou um padrão duplo de absorção pela alga unicelular verde não vacuolada *Chlorella pyrenoidosa*. Como essa alga não tem tonoplasto, o mecanismo duplo deve residir no plasmalema. É improvável que o mesmo padrão cinético de absorção reflita nas algas a operação do plasmalema somente e nas células das plantas superiores a dele a do tonoplasto; o plasmalema deve, pois, estar implicado como sede dos dois mecanismos nas células vegetais em geral.

A conclusão de que ambos os tipos de mecanismos operam em paralelo através da membrana não implica necessariamente que ambos entreguem íons nos mesmos compartimentos citoplasmáticos ou espaços "interiores" (Epstein *et al.*, 1963). Welch & Epstein (1968), especularam que um pode transportar íons para a fase aquosa do citoplasma e o outro, via rede membranosa do retículo endoplasmático, no vacúolo.

2.2.7 Equilíbrio iônico

O programa Geochem foi inicialmente desenvolvido para o cálculo do equilíbrio iônico nas soluções do solo e outros sistemas naturais de água (Mattigod & Sposito, 1979; Sposito & Mattigod, 1980). Os equilíbrios que podem ser calculados pelo programa Geochem são: complexação, precipitação, oxidação-redução, troca de cátions e adsorção de íons metálicos. O programa Geochem pode ser empregado para: simulação do efeito da mudança de pH, força

iônica, potencial redox, conteúdo de água, ou a concentração de alguns elementos na solubilidade de um elemento químico escolhido na solução do solo (Higashi, 1996).

2.2.8 Sintomas de deficiência do Cálcio

Quando a concentração de um nutriente no tecido desce abaixo do nível necessário para o crescimento ótimo, diz-se que a planta está deficiente. A deficiência pode ser verificada se, a concentração do elemento no solo ou em outro substrato for baixa ou se o elemento estiver em formas não disponíveis. Às vezes uma concentração excessiva de um elemento pode reduzir a velocidade de absorção de um nutriente tornando a planta deficiente no último. (Epstein, 1975).

Os desarranjos metabólicos causados pela deficiência de elementos essenciais eventualmente se manifestam em anormalidades visíveis. O crescimento global e o desenvolvimento da planta podem ser afetados, podem haver sintomas macroscópicos característicos e podem ocorrer mudanças na aparência de estruturas celulares apreciadas ao exame do microscópio ótico ou do eletrônico. Uma planta pode ter deficiências de dois ou mais elementos o que torna a identificação mais difícil do que quando ocorrem isolamento. Finalmente há condições que não são deficiências as quais podem engendrar sintomas que podem ser confundidos com os de falta de elementos. Esses “falsos” sintomas de deficiência podem ser causados por muitos fatores que variam desde toxicidez de elementos até infecções por bactérias e vírus (Epstein, 1975).

Plantas em 0,0003mM de cálcio mostraram-se severamente deficientes e em 1,0mM de cálcio cresciam bem, e havia alimentação de luxo. Em outras palavras as plantas continham quantidades “de luxo” de cálcio em alguns tecidos ou órgãos sendo deficientes em outros até o ponto de ser o crescimento inibido. Para elementos imóveis no floema como o cálcio, os desarranjos devidos à deficiência podem, portanto, ser muito localizados. Embora, todos os pontos de crescimento sejam sensíveis a deficiência de cálcio, os pontos da raiz são afetados

severamente. Eles cessam de crescer, tornando-se desorganizados e escuros e, quando a deficiência é severa, morrem (Epstein, 1975).

Em folhas de plantas que receberam altas doses de cálcio durante o crescimento ou sob condições de crescimento em alta intensidade de luz, há uma grande proporção do material pectico na forma de pectato de cálcio. Isto faz com que o tecido se torne fortemente resistente a degradação pela polygalacturonase (Marschner, 1986).

Em tecidos com deficiência de cálcio o aumento das taxas de respiração são relatados por elevarem a perda de substratos respiratórios pelos vacúolos para as enzimas respiratórias no citoplasma (Bangerth *et al.*, 1972). Portanto, as taxas de respiração decrescem em tecidos deficientes de cálcio; isto também eleva a taxa líquida de síntese de proteínas (Faust & Klein, 1974). Estas características de deficiência de cálcio são similares àquelas relatadas para a senescência de órgãos da planta, e que além do cálcio, também os hormônios vegetais, estão envolvidos na regulação da senescência vegetal. A desorganização geral das células e dos tecidos que sofrem de deficiência de cálcio sugere que o papel do cálcio em manter as membranas funcionando, pode ser uma das suas funções chaves. Isto é assim, por que a organização celular é em considerável extensão uma questão de compartimentalização e de reservatórios metabólicos sendo os compartimentos celulares como o protoplasto, o vacúolo, o núcleo e outras organelas delimitadas por membranas (Marschner, 1986).

Mengel & Kirkby (1987), descrevem os sintomas de deficiência de cálcio apresentando uma redução no crescimento do tecido meristemático, observada primeiramente na região do crescimento apical e nas folhas mais novas, que tornam-se deformadas e cleróticas e nos estádios mais avançados uma necrose das margens das folhas e os tecidos afetados tornam-se “moles”, devido a dissolução da parede celular.

Sintomas de deficiência de cálcio em plântulas de *Eucalyptus alba* foram caracterizados por plantas mal desenvolvidas, com aparecimento de manchas de coloração avermelhada no limbo das folhas mais velhas ou nas bases dos ramos (Haag *et al.*, 1961).

Altas taxas de crescimento de órgãos com baixa taxa de transpiração, apesar de aumentarem o risco que o conteúdo de cálcio dos tecidos caia abaixo do nível crítico requerido

para a manutenção da integridade da membrana, determinam a típica, também chamada, disfunção ocasionada pela deficiência de cálcio, tais como queima de ponteira em alface, entre outras (Marschner, 1986).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi efetuado no laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo em Piracicaba no Estado de São Paulo, no período de maio a setembro de 1998.

3.1 Material vegetativo

Foi utilizado um clone de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* obtido de material originário do trabalho Correia (1993), mantido *in vitro* no laboratório de Fisiologia das Árvores e com repicagens a cada 21 dias.

3.2 Padrão inicial do material cultivado

O material inicial utilizado para os diferentes tratamentos foram padronizados via peso da matéria fresca e peso da matéria seca em estufa até atingir peso constante e volume de matéria, altura, com base visual e mensural confirmada, sendo eles livres de diferenças morfológicas, raízes e outros estádios fisiológicos aparentes que pudessem promover ou comprometer a expressão dos tratamentos.

Os explantes, após sua padronização, possuíam peso médio da matéria fresca de 1,1 g, peso médio da matéria seca de 0,029 g e um número médio de 23 gemas por explante (classe I – 18, classe II – 4 e classe III – 1), sendo cultivados em grupo de quatro explantes por frasco de crescimento.

Para a padronização do número de gemas, foram definidas três classes de altura: classe I - < 0,6 cm, classe II – 0,6 a 1,5 cm e classe III - > 1,5 cm, desta forma, foram separados os diferentes tipos e tamanhos de gemas existentes nos explantes para maior precisão na avaliação desta variável.

Definiu-se a classe II como a de interesse para este trabalho por apresentar um tamanho de gemas mais adequado e mais homogêneas para a manipulação, tanto em relação a fitomassa e viabilidade vegetativa quanto as características morfofisiológicas.

3.3 Condições de crescimento

Os frascos de crescimento continham 40,0 ml de meio sólido de cultura, isolados com tampas plásticas e lacrados com fita de filme plástico sendo então, condicionados e mantidos à temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e iluminância de 1000 lux, fornecida via superior por luz branca fria localizadas 30,0 cm acima do topo do frasco, dispostas

paralelamente as prateleiras de armazenamento em conjunto de 2 lâmpadas de 110 W para cada compartimento das prateleiras.

3.4 Meio de cultura

Optou-se pelo meio de cultura JADS (Tabela 1) para o desenvolvimento deste trabalho por apresentar bons resultados para a altura de gemas de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* e seus híbridos obtidos a partir da combinação destas espécies (Correia, 1993).

A partir do meio de cultura JADS, estabeleceu-se diferentes tratamentos (suplemento nutricional) de cálcio, com base em estudos prévios, literatura e teste de Equilíbrio dinâmico de íons do Meio pelo GEOCHEM, sendo definidas variações do JADS para as seguintes concentrações de Cálcio: 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio. (Tabela 2) Portanto, estes tratamentos diferenciaram-se por suas concentrações de cálcio, nutrientes minerais complementares (Tabela 2) e fontes do cálcio.

Nos tratamentos 0,0 e 2,5mM de cálcio, foram suprimidas e reduzidas, respectivamente, as fontes de cálcio do meio JADS padrão. Ou seja, quando se retirou ou reduziu a fonte de cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dos tratamentos 0,0 e 2,5mM de Ca, foi também retirado a fonte de nitrogênio $(\text{NO}_3)_2$, havendo, por isso, a necessidade de repô-la, o que foi feito aumentando-se a dose do NH_4NO_3 , de 4,0 para 13,8 e 9,0mM, respectivamente (Tabela 2).

Para os tratamentos com 7,5; 10,0 e 15,0mM de cálcio, foram adicionados 2,5; 5,0 e 10,0mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para a complementação das concentrações desejadas. O uso desta nova fonte está relacionado com a manutenção do equilíbrio químico nutricional do meio a fim de evitar efeitos paralelos advindos da mudança nas quantidades disponibilizadas por outros elementos minerais, apesar da introdução do cloro.

Tabela 1 – Composição do meio de cultura JADS (Correia,1993).

Compostos Químicos	Molaridade (mM)
NH ₄ NO ₃	4,04
KNO ₃	8,0
KH ₂ PO ₄	3,0
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	5,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	3,0
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
Na ₂ . EDTA . 2H ₂ O	0,2
MnSO ₄ . H ₂ O	0,1
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,015
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0006
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,005
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,001
H ₃ BO ₃	0,05
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina	0,5
Tiamina	5,0
Meso Inositol	100,0
Cisteína	0,14
Pantotenato de Ca	1,0

Para cada tratamento, foram adicionados ácido nicotínico, piridoxina, tiamina, meso inositol, cisteína, pantotenato de cálcio, sacarose e ágar. Também, foram adicionados: 6 BAP (0,5 mg.l⁻¹) e AIA (0,1 mg.l⁻¹). Estes compostos foram invariavelmente acrescidos a todos os tipos de tratamentos.

Tabela 2 - Valores da dosagem dos compostos diferenciados para a composição de um litro de meio de cultura por tratamento

Comp. Químicos	0,0mM de Ca	2,5mM de Ca	5,0mM de Ca	7,5mM de Ca	10,0mM de Ca	15,0mM de Ca
NH ₄ NO ₃	13,8	9,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	0,0	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,0	0,0	0,0	2,5	5,0	10,0

* A concentração 5,0 mM de cálcio é a dosagem de cálcio Padrão do Meio de Cultura JADS, estabelecida aqui como tratamento Testemunha.

** Valores em milimoles (mM)

Após a formação de cada meio de cultura diferenciado (tratamentos), sem o solidificante ágar, foi feito o ajuste do pH do meio em $5,8 \pm 0,01$ com KOH a 1N e estabelecido como pH padrão inicial. Em seguida, foi acrescentado o ágar e levado o meio a fogo brando com agitador permanente para o seu cozimento permitindo a dissolução completa do ágar e a homogeneização do meio. Após a sua ebulição, foram distribuídos 40,0ml do meio em cada frasco de crescimento, imediatamente tampados.

Os frascos foram autoclavados por 20 minutos a temperatura de $121,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e pressão média de $1,05 \text{ Kg.cm}^2$. Depois, o material foi autoclavado e armazenados na sala das câmaras de cultivo por um máximo de 48 horas.

3.5 Determinação do equilíbrio dinâmico dos íons do meio de cultura

Para a confirmação do estado de equilíbrio químico do meio de cultura nos diferentes tratamentos utilizou-se o programa de simulação Geochem. (Mattigod & Sposito, 1979; Sposito & Mattigod, 1980)

Fez-se a simulação para várias doses diferenciadas de cálcio, onde para esta simulação foi necessário informar a concentração molar total de cada metal e ligante determinada com base na composição padrão (5,0mM de cálcio) do meio de cultura JADS (Correia, 1993).

Os resultados obtidos foram comparados com o padrão e as doses puderam ser definidas para cada tratamento.

3.6 Coleta de dados

Os dados e informações procedentes deste experimento foram obtidos regularmente em intervalos de 07 (sete) dias por um período de 35 dias, sendo registrados os seguintes dados quantitativos: Peso da Matéria Fresca (g) (PMF), Peso da Matéria Seca (g) (PMS), Número de Gemas por classe de altura das gemas e total por explante (NG) e diagnose visual.

3.6.1 Determinação do peso da matéria fresca (PMF)

Através da balança analítica, foram determinados em cada período de amostragem, os pesos dos explantes frescos e os pesos dos recipientes, para a acomodação dos explantes para a secagem na estufa, expressos em gramas (g).

Após a determinação do peso dos recipientes, foram tomados os pesos da matéria fresca de cada explante, sendo em seguida dispostos nos recipientes individuais e anteriormente pesados para então serem efetuadas as contagens do número de gemas por explante.

3.6.2 Determinação do número de gemas (NG)

A contagem do número de gemas por explante foi realizada através do método destrutivo, onde as gemas existentes foram separadas em três classes de tamanho (altura): Classe I - < 0,6 cm; Classe II – 0,6 a 1,5 cm e Classe III - > 1,5 cm.

Com o uso de microscópio estereoscópico, estilete, pinça e papel milimetrado os explantes foram classificados, separados e contados. Após a contagem por classe, o material foi novamente disposto no seu recipiente para então ser levado a estufa para a obtenção de peso seco constante.

3.6.3 Determinação do peso da matéria seca (PMS)

Após a contagem do número de gemas por explantes, o material foi submetido ao processo de secagem em estufa a temperatura de aproximadamente $60^{\circ}\text{C} \pm 5,0^{\circ}\text{C}$ por um período nunca inferior a 48 horas até atingir peso seco constante.

Atingido o peso seco constante os materiais foram novamente pesados, expressos em gramas (g), separados, identificados e armazenados em sacos de papel poroso para serem encaminhados à análise química.

3.6.4 Obtenção de informações qualitativas

No momento da determinação do peso da matéria fresca do material vegetativo, obteve-se por método visual as informações qualitativas, registrando-se todas as alterações que

divergissem da forma natural da planta e sendo anotadas na ficha de coleta de dados desenvolvida para este trabalho (Apêndice 1).

3.6.4.1 Análise morfológica e sintomas nutricionais

Para a análise das alterações morfológicas dos explantes foram coletadas as informações qualitativas, Presença de Dominância Apical, Raízes, Diferença nas estruturas foliares e outras alterações visíveis, em cada período de cultivo.

Para o diagnóstico nutricional (deficiência ou toxicidez) da planta, foram observadas, através de análise visual, as alterações na coloração da planta (folhas e caules), presença de pigmentações ou manchas e outras informações relevantes que surgiram durante esta análise.

3.6.4.2 Determinação química nutricional da matéria

A análise química dos nutrientes presentes na matéria seca dos explantes originados pelos tratamentos deste experimento foram realizadas no laboratório de Análise Foliar do departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ USP.

Foram determinados os teores dos seguintes Nutrientes Minerais Essenciais divididos em Macronutrientes (Nitrogênio – N, Fósforo – P, Potássio – K, Cálcio – Ca, Magnésio – Mg, Enxofre – S) e os Micronutrientes (Boro – B, Cobre – Cu, Ferro – Fe, Manganês – Mn e o Zinco – Zn).

As amostras foram moídas e submetidas às digestões nitro-perclórica e sulfúrica para obtenção de extratos, com o intuito da determinação dos seus macro e micronutrientes,

conforme metodologia descrita por Sarruge & Haag (1974). Para o P, foi utilizado o método de colorimetria de molibdatovanadato; para o K, a fotometria de chama; para os elementos Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn, utilizou-se a espectrometria de absorção atômica; para o S, a turbidimetria de suspensão de sulfato de bário; para o B, a colorimetria de azometina, e finalmente as determinações do N foram realizadas através do método micro Kjeldahl.

3.7 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram formatados em planilha eletrônica Excel 7.0 para a comparação entre os tratamentos e assim proceder interpretações. Após, a análise gráfica, foi definido o tipo de análise estatística a ser investigada. Para isto utilizou-se o programa estatístico SAS 6.09, onde com base nos seus resultados pode-se analisar e checar os resultados obtidos pela análise gráfica anterior.

3.7.1 Delineamento estatístico

Com o objetivo de evitar estimativas, tendências do efeito dos tratamentos e do erro experimental foi estabelecido o delineamento estatístico Inteiramente Casualizado, com seis tratamentos, quatro repetições de cada tratamento em um intervalo de observação de 7 dias durante o período de 35 dias.

O peso da matéria seca, o número de gemas e os teores dos nutrientes minerais constituintes da matéria seca foram definidos como as variáveis a serem analisadas neste trabalho.

3.7.2 Determinação das taxas de crescimento relativo (TCR)

A Taxa de Crescimento Relativo (TCR) foi estabelecida por Briggs (1920) sendo que Hunt (1982) apresentou a equação abaixo tornando possível a avaliação da taxa de crescimento relativo das plantas (modificada para este trabalho), que serviu para comparar o valor destas taxas entre os tratamentos, tomados período a período até o final do experimento, procedendo-se desta maneira a comparação da resposta do clone do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* para cada tratamento em função do seu peso da matéria seca.

$$\text{Taxa de Crescimento Relativo} = \frac{\ln \text{PMS}(X_n) - \text{PMS}(X_0)}{T(X_n) - T(X_0)} * 100$$

onde:

- ln = Logaritmo Neperiano;
- PMF(X_n) = Peso da Matéria Seca Médio tomados ao final de cada período amostral;
- PMS(X₀) = Peso da Matéria Seca Médio tomados ao início de cada período amostral;
- T(X_n) = Tempo final do período;
- T(X₀) = Tempo inicial do período.

3.7.3 Análise estatística

Neste trabalho, o delineamento estatístico utilizado foi o fatorial inteiramente casualizado. Assim, a análise estatística deste trabalho consistiu na realização de uma análise de variância (Teste F) e de um teste de comparação múltipla de médias, a fim de se detectar diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes concentrações de cálcio, períodos

de cultivo, teor de absorção dos nutrientes e a interação entre estas variáveis, para se detectar diferenças estatísticas significativas entre as concentrações de cálcio em cada período de cultivo.

Para correlacionar as variáveis usadas entre si, foi usado o coeficiente de correlação de Pearson. Para selecionar e ajustar os modelos de regressão que melhor explicam o comportamento do peso da matéria seca em função dos períodos de cultivo para cada tratamento e em função das doses em cada período de cultivo. Para o número de gemas e demais variáveis utilizando-se o procedimento passo a passo do SAS.

Todas as equações e procedimentos adotados foram programados e calculados no SAS versão 6.09.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Peso da matéria fresca (PMF)

Os resultados da variação nos PMFs, em oposição a Epstein (1975), não ocorreram linearmente conforme o aumento da concentração do cálcio no meio de cultivo (Tabela 3).

Para os períodos 07, 14 e 28 dias de cultivo, o tratamento 15,0mM de Ca^{2+} apresentou os maiores valores de PMF. Para os períodos 21 e 35 dias de cultivo, o tratamento 10,0mM de Ca^{2+} apresentou os maiores valores de PMF. A Tabela 3, mostra que o peso da matéria fresca é crescente em todos os tratamentos, variando apenas o período de cultivo onde se tem o maior valor do peso da matéria fresca para cada tratamento.

Os tratamentos 0,0; 2,5; 5,0 e 15,0mM de Ca^{2+} possuem o mesmo comportamento resposta, ou seja, os seus maiores PMFs ocorreram no período 28 dias de cultivo, decrescendo após este período. O tratamento 7,5mM de Ca^{2+} apresentou o maior valor no período 21 dias de cultivo, com decréscimo do seu PMF após este período. E o tratamento 10,0mM de Ca^{2+} apresentou o seu maior valor, também no período 21 dias de cultivo, porém aos

35 dias de cultivo o tratamento 10,0mM de Ca^{2+} voltou apresentar um aumento no valor do seu PMF.

A Tabela 3, apresenta os valores médios de PMF em cada período de cultivo e nos tratamentos. Calculando-se uma taxa de crescimento diário, a média no período pelo número de dias do período, de acordo com Hunt (1982), tem-se que a maior taxa de crescimento ocorre no sétimo dia. Correia (1993), apresenta em seu trabalho, que nos primeiros dias a taxa de crescimento relativo apresentou-se elevada, atingindo seu máximo ao sétimo dia de cultivo, caracterizando a fase de crescimento exponencial.

Tabela 3 - Pesos da matéria fresca (g) nos períodos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0mM de Ca	1,1	3,0299	3,5836	4,7432	6,0206	5,2974	3,9625
2,5mM de Ca	1,1	2,8779	3,1361	4,9761	8,4092	5,5151	4,3361
5,0mM de Ca	1,1	3,0299	3,5836	6,4716	6,8039	5,9913	4,4967
7,5mM de Ca	1,1	3,2789	4,4449	7,0863	6,5383	5,7124	4,6935
10,0mM de Ca	1,1	2,3078	3,0185	8,1968	4,5501	6,2943	4,2446
15,0mM de Ca	1,1	3,9404	4,4677	6,9512	8,4154	6,2692	5,1907
Média	1,1	3,0775	3,7057	6,4042	6,7896	5,8466	
TC dia		0,4396	0,2647	0,305	0,2424	0,1670	

No período de 21 dias, há um aumento desta taxa. Para explicar este aumento verifica-se que apesar dos maiores valores de PMF encontrarem-se no período 28 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0 e 15,0mM de cálcio, este resultado foi uma consequência dos altos valores de PMF no período de 21 dias para os tratamentos 7,5 e 10,0mM de cálcio. (Apêndices 1 a 12)

A antecipação das maiores médias dos tratamentos 7,5 e 10,0mM de cálcio, podem ter ocorrido, pelo fato de que estas concentrações podem ter gerado um melhor equilíbrio iônico e nutricional para a planta neste períodos, visto que os processos de troca iônica, associação, dissociação, adsorção e absorção são contínuos e podem sofrer variações de acordo com as variações do meio e das condições ambientais (Marschner, 1986; Poovaiah, 1985; Fosket, 1994).

Os ganhos percebidos nestes períodos de 21 a 28 dias conforme a concentração do meio de cultura, podem provavelmente estar relacionados com o esgotamento do meio de cultura de uma ou mais substâncias envolvidas na manutenção das taxas de crescimento. Para este trabalho, acreditou-se que o esgotamento do meio de cultura tenha ocorrido para os tratamentos de doses inferiores ao testemunha, 0,0 e 2,5mM de cálcio pelo próprio crescimento do explante.

A absorção de íons, mais especificamente a velocidade de transporte e absorção de íons estão ligados as condições do meio em que a planta se encontra, assim que no início de seu crescimento a absorção de íons (entrada de íons através da parede e membrana celular) possui condições favoráveis (Epstein, 1975), pois apresenta uma concentração iônica mais diluída e os efeitos ambientais, concentração ainda não se tornaram uma barreira ao crescimento da planta.

Em meios de cultura líquidos, Correia (1993) encontrou taxas de crescimento maiores nos períodos iniciais de cultivo, representando que o fluxo de entrada de nutrientes, durante estes períodos foi mais intenso. A diminuição do crescimento a partir do 21º e/ou 28º pode estar caracterizado pelo esgotamento do meio de cultura, agente solidificante, distúrbios fisiológicos, desequilíbrios nutricionais. Segundo Marschner (1986), estes fatores, além da presença do ágar e ou condições ambientais e microambientais para o crescimento da cultura podem estar determinando a redução das taxas de crescimento.

O ágar pode favorecer a existência de uma barreira aos processos de absorção e difusão, reduzindo o crescimento das plantas, como também pode conter substâncias que interferem no crescimento e desenvolvimento das gemas. Neste trabalho, foi percebido um endurecimento do meio com concentrações elevadas de cálcio (10,0 e 15,0mM), e conforme Mix

e Marschner (1976a), isto pode ter causado estresse hídrico ou bloqueio ao transporte de íons (dissociação, difusão e absorção), além de influenciar negativamente na velocidade de absorção, visto que a água é um dos meios onde ocorrem a grande maioria das reações químicas (associação e dissociação iônica). De acordo com Malavolta (1980) o conjunto ágar e cálcio (concentrações elevadas) podem ter indisponibilizado o fornecimento de nutrientes à planta.

Analisando-se as médias para cada tratamento ao final do período experimental, tem-se que os tratamentos 0,0 e 15,0mM de cálcio apresentaram médias inferiores e superiores ao grupo, acreditando-se que as concentrações de cálcio entre 2,5 e 10,0mM não diferem entre si para esta variável. Isto é, a taxa de absorção de água e nutrientes manteve-se constante para estes tratamentos, contudo a ausência e a concentração elevada de cálcio alteraram o equilíbrio da planta e composição da sua matéria fresca (De Guzman & Dela Fuente, 1984).

4.2 Peso da matéria seca (PMS)

A Tabela 4, mostra que nos períodos 7, 14 e 35 dias de cultivo, não houve diferença entre os resultados obtidos pelos diferentes tratamentos. No período 21 dias de cultivo o tratamento 10,0 diferenciou-se dos demais, e no período 28 dias de cultivo o resultado apresentado pelo tratamento 15,0 mM de cálcio foi significativamente diferente. (ver apêndice 14)

Analisando-se a Tabela 4, tem-se que o máximo valor do peso da matéria seca para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 15,0mM de cálcio ocorreu no período 28 dias de cultivo apresentando padrões semelhantes de respostas aos estímulos dados, já que após este período todos eles apresentaram diminuição do peso da matéria seca.

O tratamento 10,0mM de cálcio obteve um valor elevado de peso da matéria seca no período 21 dias de cultivo, apresentando em seguida uma diminuição de peso da matéria seca e aos 35 dias ele voltou a obter um peso elevado de matéria seca. (Figuras 1 a 3).

Figura 1 - Peso da matéria seca (PMS) (g) nos períodos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

A Tabela 4, mostra maior taxa de crescimento para o período de 7 dias de cultivo, e para os períodos de 14 a 28 dias de cultivo apresentou taxas de crescimento similares, indicando que após o sétimo dia a planta manteve-se em equilíbrio, ou seja, nestes períodos está havendo um equilíbrio entre a taxa de absorção de nutrientes e a conversão em matéria seca (Ingestad & Agred, 1995). Já no período de 35 dias, a taxa de crescimento foi reduzida, indicando um possível esgotamento do meio e das condições favoráveis ao crescimento, já que a necessidade nutricional específica para cada espécie e os fatores ambientais, como: a aeração no meio de cultura e controle do seu fluxo, o termoperíodo, a qualidade e a intensidade de luz e fotoperíodo podem estar influenciando as taxas de crescimento.

Figura 2 - Peso da matéria seca (PMS) (g) nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

Figura 3 - Pesos da matéria seca (PMS) (g) e número de gemas da classe II (0,6 a 1,5 cm de altura), nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

Tabela 4 - Pesos da matéria seca (g) nos períodos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0mM Ca	0,029	0,2371	0,2630	0,3745	0,5720	0,4807	0,2905
2,5mM Ca	0,029	0,2109	0,2507	0,4161	0,6509	0,4478	0,3342
5,0mM Ca	0,029	0,2371	0,2630	0,4739	0,6255	0,5557	0,3640
7,5mM Ca	0,029	0,2362	0,3593	0,5036	0,5448	0,5099	0,3638
10,0mM Ca	0,029	0,1784	0,2656	0,5793	0,4924	0,5870	0,3553
15,0mM Ca	0,029	0,2656	0,3186	0,5150	0,6761	0,5379	0,3904
Média	0,029	0,2275	0,2867	0,4771	0,5937	0,5198	
TC dia	-	0,0325	0,0205	0,0227	0,0212	0,0149	

Existindo desta forma a otimização do sistema de produção "*in vitro*" para estas condições de experimento. O que não pode ser verificado através do peso da matéria fresca , por isso, optou-se pelo uso desta variável PMS.

Essas especificidades para a PMF e PMS podem expressar a complexidade do trabalho de cultura *in vitro* quando se deseja o crescimento e desenvolvimento de gemas e vigor de brotações (Correia, 1993). Isto além de estar ligado ao potencial genético de cada clone, parece ser dependente de uma relação adequada entre nutriente e clone, e sua capacidade de absorção pelo explante. Adicionalmente fatores ambientais como temperatura, luz (intensidade e qualidade), fotoperíodo e níveis de aeração no meio de cultura (oxigênio) chegam a ser variáveis imponderáveis que freqüentemente, restringem a repetição dos resultados, dificultando a definição de uma metodologia.

Acredita-se que o PMS pode expressar de melhor forma a relação entre o equilíbrio nutricional da planta e as suas condições de crescimento. Contudo, as médias finais de cada tratamento não apresentaram resultados muito significativos, ou seja, a Tabela 4, mostra que os tratamentos 0,0 e 15,0mM obtiveram médias finais diferenciadas dos demais tratamentos, expressam talvez, sintomas de deficiência e excesso.

Comparando-se as Tabelas 3 e 4, percebe-se que a uma forte correlação entre o PMF e o PMS, possivelmente indicando que as condições favoráveis ou desfavoráveis influem tanto na taxa de produção da matéria fresca (absorção de água e nutrientes) quanto na produção de matéria seca (absorção, fixação e aproveitamento dos nutrientes) (Reiss & Herth, 1979; Ting, 1982).

Segundo Rotundo (1993), os resultados dos tratamentos 0,0 e 2,5mM de cálcio podem ser creditados ao aumento na concentração do Nitrogênio ($\text{NH}_4 \text{ NO}_3$). Também pelos resultados obtidos pelo programa Geochem (Apêndices 18 a 21) confirma-se a forte interação/associação entre os íons NO_3^- e o Ca^{2+} havida nas condições do meio do tratamento 2,5mM de cálcio.

4.3 Porcentagem da massa de água constituinte da matéria fresca

A Tabela 5, mostra a variação na porcentagem da massa de água constituinte da matéria fresca em relação ao aumento da concentração de cálcio do meio de cultivo nos respectivos períodos de cultivo.

Pela comparação entre as médias dos tratamentos para cada período, tem-se que: para o período de cultivo de 7 dias houve diferença significativa entre os tratamentos 15,0 e 10,0mM de cálcio. Para o período de cultivo de 14 dias, houve diferença significativa entre os tratamentos 15,0 e 10,0mM de Ca. Para o período de cultivo de 21 dias, houve diferença significativa entre os tratamentos 10,0 e 2,5mM Ca. Para o período de cultivo de 28 dias continuou havendo diferença entre os tratamentos 10,0 e 2,5mM de Ca, entretanto isto se deu em ordem inversa. Para o período de cultivo de 35 dias, não houve diferença significativa. Apesar destas diferenças significativas encontradas, os valores não ultrapassaram os limites de porcentagem de água para a matéria fresca (80,0 – 95,0 %), tidos como ótimos para o crescimento das plantas (Epstein, 1975). Portanto, para esta variável, verifica-se que não houve relação direta entre ela e as concentrações de cálcio fornecidas.

A Tabela 5, mostra que comparando-se a porcentagem de massa de água na matéria fresca nos tratamentos, não existiram resultados que ultrapassassem os limites apresentados por Epstein (1975) como ótimos ao desenvolvimento vegetal. Permitindo acreditar-se que mesmo em altas concentrações de cálcio, a planta mantém seus metabolismos em taxas normais, no que se refere a absorção de água. Pode-se, então correlacionar esta variável às variáveis PMF e PMS. Através desta correlação percebe-se que a superioridade de produção encontrada para o tratamento 15,0mM de cálcio deveu-se a maior disponibilidade de nutrientes à planta (Roux & Slocum, 1982).

Tabela 5 - Porcentagens da massa de água constituinte da matéria fresca nos períodos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0 mM Ca	-	92,22	92,62	92,11	90,47	90,81	91,65
2,5 mM Ca	-	92,73	91,96	91,65	92,20	91,88	92,08
5,0 mM Ca	-	92,22	92,62	92,56	90,76	90,70	91,77
7,5 mM Ca	-	92,78	91,88	92,89	91,63	90,89	92,01
10,0 mM Ca	-	92,21	91,04	92,94	89,14	90,59	91,18
15,0 mM Ca	-	93,28	92,85	92,52	91,91	90,81	92,27
Média	-	92,57	92,16	92,45	91,02	90,95	

A Tabela 5, ainda permite verificar que com o passar do período há uma ligeira diminuição da porcentagem da massa de água na planta, acreditando-se que este evento esteja ligado ao esgotamento do meio, estabelecimento de condições adversas como, solidificação, diminuição da água relativa do meio, formação de inibidores que impedem a continuidade da absorção e outros fatores ambientais (Marschner, 1986; Fosket, 1994).

Analisando-se esta mesma tabela, percebe-se que as médias entre os tratamentos não apresentam diferenças significativas, levando-se a crer que o processo de absorção da água não depende da concentração de nutrientes do meio. Ao contrário, a absorção de nutrientes depende da concentração de água do meio, e portanto as diferenças encontradas não podem ser atribuídas ao estresse hídrico (Epstein, 1961).

4.4 Porcentagem de sólidos totais constituintes da matéria seca (%S)

A Tabela 6, mostra que apesar do tratamento 10,0mM de cálcio no período de 28 dias de cultivo apresentar um valor acima dos demais e o tratamento 15,0mM de Cálcio no período de 7 dias de cultivo apresentar um valor abaixo dos demais, eles ainda se encontram dentro da faixa de normalidade e estado de equilíbrio nutricional.

Quando a planta fresca é seca a 70°C durante 24-48 horas, o peso depois da secagem é 10-20 por cento do inicial. Cerca de 90 por cento da matéria seca da planta consiste de três elementos: carbono, oxigênio e hidrogênio. Isto resulta do fato de que o grosso de matéria seca da planta consiste principalmente de celulose, ou seja, um polímero de glicose, um carboidrato. Com base no peso, entretanto, o citoplasma e suas inclusões inertes como as vacúolos, constituem apenas pequenas porcentagens de matéria seca da planta (Epstein, 1975).

A Tabela 6, apresenta os resultados de porcentagem dos nutrientes totais da matéria seca, ou seja, C,H, O, N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Zn e outros não analisados. Por esta tabela, verifica-se que o teor de sólidos está abaixo do levantado na literatura.

Comparando-se os valores do PMS e %S nos períodos de 21 e 28 dias de cultivo em relação ao tratamento 10,0mM encontra-se uma relação inversa entre eles, ou seja, enquanto o maior valor do PMS ocorre no período 21 dias de cultivo, para a %S ocorre o menor valor. Ao contrário se dá no período de 28 dias de cultivo, quando há uma queda significativa do PMS há a maior %S no experimento (Epstein, 1975).

Tabela 6 - Valores percentuais dos sólidos totais constituintes da matéria seca nos períodos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio.

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0mM Ca	-	7,78	7,38	7,89	9,53	9,19	8,35
2,0mM Ca	-	7,27	8,04	8,35	7,80	8,12	7,92
5,0mM Ca	-	7,78	7,38	7,44	9,24	9,30	8,23
7,5mM Ca	-	7,22	8,12	7,11	8,37	9,11	7,99
10,0mM Ca	-	7,79	8,96	7,06	10,86	9,41	8,82
15,0mM Ca	-	6,72	7,15	7,48	8,10	9,19	7,73
Média	-	7,43	7,83	7,55	8,98	9,05	

Segundo Grossi (1995), quando há produção maior de matéria seca, significa que o meio está mais ajustado ou mais adequado ao crescimento da planta. Assim, quando o valor de %S é maior, diz-se que houve maior concentração matéria seca para uma mesma quantidade de água incorporada aos tecidos (maior número de íons livres no meio, maior difusão e maior equilíbrio iônico), facilitando o transporte e a troca iônica, já que, o transporte gera a adsorção, troca e absorção dos íons. Então, pela relação entre o peso da massa de água absorvida e pelo peso de matéria seca, tem-se, no período de 28 dias de cultivo para o tratamento 10,0mM de Cálcio, a maior relação entre água absorvida e %S. Desta maneira, pode-se ter o seguinte: quanto maior a quantidade de água absorvida pela planta maior será a quantidade de nutrientes absorvidos, que segundo Grossi (1995) haverá a maior produção de matéria seca. Este evento também pode ser correlacionado com as condições hídricas do meio e eventual estresse hídrico.

4.5 Número de gemas (classes II)

A Tabela 7, indica que o número de gemas praticamente não apresentou variação entre os tratamentos nos períodos 7 e 14 dias de cultivo (Apêndice 14). O tratamento 10,0mM de cálcio apresentou um valor diferenciado dos demais para o período de 21 dias de cultivo (Figuras 4 a 6).

Figura 4 - Número de gemas emitidas nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

Analisando-se, cuidadosamente a Tabela 7, percebe-se que o tratamento 5,0mM de cálcio não atingiu um ponto de máximo para esta variável, indicando que o período experimental não foi suficiente para que este tratamento manifestasse seu potencial de produtividade. Já o tratamento 15,0mM de cálcio, além de apresentar um bom número de gemas no período de 35 dias, obteve os melhores resultados para os períodos 7, 14 e 28 dias de cultivo.

Figura 5 - Número de gemas (classe II – 0,6 a 1,5 cm de altura) nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

Figura 6 - Número de gemas (classe II – 0,6 a 1,5 cm de altura) e o teor de cálcio absorvido pelo explante nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

Tabela 7 - Número de gemas por explante nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio, na classe II de altura das plantas.

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0 mM Ca	4	21	43	89	130	85	62
2,5 mM Ca	4	28	36	89	109	76	57
5,0 mM Ca	4	21	43	102	123	172	77,5
7,5 mM Ca	4	29	45	125	117	140	76,7
10,0 mM Ca	4	19	45	186	74	132	76,7
15,0 mM Ca	4	31	59	142	207	111	92,3
Média	4	24,83	39,23	122,17	126,67	119,33	
Ganho	-	520,75	57,99	211,42	3,68	-5,79	

A Tabela 7, mostra que o tratamento 15,0mM de cálcio apresenta um valor médio de número de gemas superior aos demais tratamentos. O tratamento 10,0mM de cálcio, apesar de apresentar uma média igual a do tratamento 7,5mM de cálcio, possui no período 21 dias de cultivo um valor de número de gemas, significativamente diferente dos demais tratamentos. O maior ganho de produtividade em termos de número de gemas, entre os períodos de cultivo, foi encontrado para o período de 21 dias. Indicando ser o período onde a otimização das variáveis de produção é a maior (Ingestad & Agred, 1995).

Considerando-se que o período 21 dias de cultivo foi normalmente tido como o período ideal de crescimento em relação ao número, forma e homogeneidade de tamanho das gemas, o melhor resultado encontrado para este período foi o do tratamento 10,0mM de cálcio. Este período, apresentou um ganho em porcentagem expressivo, e quando comparado com o ganho relativo ao próximo período, verificou-se que o ganho apresentado no período de 28 dias de cultivo não foi expressivo em relação ao tempo de manutenção da cultura.

Em termos gerais, tanto para o número de gemas quanto para o PMF e PMS, constatou-se uma diminuição de crescimento após 28 dias de cultivo, devendo-se isso, provavelmente, ao estabelecimento de condições adversas no meio de cultura, como por

exemplo, estresse hídrico, solidificação do meio, formação de inibidores que impedem a continuidade da absorção de íons. Além destes fatores de inibição do crescimento, acredita-se que haja um desequilíbrio iônico devido aos teores diferenciados de absorção de cada nutriente, somados aos efeitos anteriores (De Guzman & Dela Fuente, 1984).

Acredita-se que no período de 21 dias de cultivo, tenha havido uma saturação dos sítios de armazenamento de cálcio, promovendo a partir daí a sua saída (Briggs, 1957; Dainty & Hope, 1961). Segundo Welch & Epstein (1968), esta saída acontece no tonoplasto e no plasmalema, havendo diminuição do teor de absorção de cálcio, nos tratamentos 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio. Este evento, tem efeito inverso de produção, isto é, a princípio a saída provoca perdas de cálcio e com isso perda de produção. Porém, a saída deste elemento para os espaços exteriores, permite a sua ligação a outros elementos e nutrientes, fazendo com que haja uma nova reabsorção desta associação, através do plasmalema e do tonoplasto.

Para Hertel (1983), através desta reabsorção, acontecem muitas das atividades em que o cálcio está envolvido, principalmente aquelas em que ele é definido como segundo mensageiro, ligações ca-calmodulina; ca-citocinina, e algumas outras atividades enzimáticas e hormonais. Assim, estas ligações e reabsorções promovem um novo estágio de crescimento e desenvolvimento da planta, aumentando o seu peso fresco e por difusão o aumento do teor de absorção de outros nutrientes, o que determina aumento da matéria seca. No momento da saída do cálcio, há um amolecimento da célula, permitindo a ação dos reguladores de crescimento. Pode-se citar a ação das auxinas, que neste momento estão em maior atividade e possuem menor barreira para a sua ação, assim há um maior alongamento celular e maior formação de gemas. Este evento, pode explicar o maior incremento do número de gemas ocorrido no período de 21 dias de cultivo para o tratamento 10,0 mM de cálcio e o pequeno incremento apresentado para os próximos períodos, quando os tecidos celulares voltaram a apresentar rigidez (De Guzman e Dela Fuente, 1984).

4.6 Porcentagem dos nutrientes totais analisados

Esperava-se que a planta no meio de cultura com maior disponibilidade nutricional, cresça mais. Porém é preciso avaliar se todo o meio de cultura disponível está realmente disponível para a planta, já que segundo (Correia, 1993) o ágar no meio de cultura pode prejudicar a difusão de nutrientes. As concentrações elevadas de cálcio, também, podem contribuir para com esta não disponibilidade de nutrientes à planta. Pelo Geochem, observou-se que o aumento da concentração de cálcio no meio de cultura, elevou o teor dos metais Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , e Mn^{2+} nas suas formas livres, porém diminuiu o teor de NO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- nas suas formas livres.

A Tabela 8 apresenta a homogeneidade obtida entre tratamentos para cada período. Onde pode-se observar que o teor de nutrientes constituintes da matéria seca reduz com o período. Este resultado está de acordo com a taxa de crescimento relativo e com a teoria da absorção iônica, onde os íons são absorvidos mais intensamente no período inicial de cultivo. Também a teoria da difusão pode ser empregada a estes resultados para justificá-los.

Analisando-se o comportamento dos resultados, tem-se que a partir do período 28 dias de cultivo a planta apresentou um teor crescente de absorção dos nutrientes, o que pode talvez ser explicado, utilizando-se a teoria dos mecanismos de absorção 1 e 2, absorção por outras organelas e segundo mensageiro (Marmé, 1982).

Observando a evolução da porcentagem dos nutrientes constituintes da matéria seca para cada tratamento, tem-se que existe uma linearidade regressiva de absorção ao longo do tempo para todos os tempos. O que segundo Migliaccio & Galston (1989), é compreensível, visto que o crescimento da planta implica no aumento de suas taxas de fotossíntese (aumento da área foliar) e assim um aumento na produção de carboidratos, e como estes resultados são referentes aos nutrientes constituintes da matéria seca, sem o C, H, O, o decrescimento era previsto.

A Tabela 8, mostra que não houve diferença significativa entre os tratamentos para esta variável. Entretanto, o teor de absorção foi maior no início do crescimento e diminuindo

com o passar do tempo de cultivo. Isto é explicado pela velocidade de absorção e demais fatores que influenciam na dinâmica e troca de íons, ou seja, equilíbrio iônico, estresse hídrico, efeitos ambientais, efeito de concentração, difusão e acumulação.

Tabela 8 - Porcentagem total para os nutrientes analisados quimicamente (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Fe e Zn) nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0mM Ca	-	10,46	10,00	9,91	8,03	8,33	9,35
2,5mM Ca	-	10,45	10,99	9,53	8,26	8,52	9,55
5,0mM Ca	-	10,46	10,00	9,43	8,36	7,87	9,22
7,5mM Ca	-	10,74	10,72	9,00	8,71	8,83	9,6
10,0mM Ca	-	10,40	10,84	9,68	8,34	8,62	9,58
15,0mM Ca	-	10,51	10,08	8,55	9,02	9,24	9,48
Média	-	10,50	10,44	9,35	8,45	8,57	

Mengel & Kirkby (1987), mencionaram a importância das concentrações relativas, pois a produção resultante do aumento de um fator depende da concentração de outros fatores. Também, a competição pelos sítios de ligação pode justificar esta maior taxa de absorção inicial.

O excesso de N pode levar a um excesso de aminoácidos solúveis, os quais não podem ser usados nos processos de crescimento devido a falta relativa de outros nutrientes (efeito de inibição, causado pelo desequilíbrio do meio ou pelas diferenças de forças de atração de Van der Vals). Cada elemento possui velocidades de absorção diferenciadas (talvez, esta velocidade esteja sendo definida por esta força de Van der Vals), que é influenciada por fatores químicos (equilíbrio químico de íons, transporte e troca), além de fatores relacionados a quantia disponível, afinidade, difusão, diluição do meio (concentração), luz, temperatura, oxigênio,

acumulação e área de contato. O conjunto destes fatores gera os desvios de crescimento (Malavolta, 1980).

A menor intensidade de desvios, significa que o meio e as condições de crescimento são mais homogêneas (área de contato, disposição e área para crescimento da planta). Isto, também demonstra que as concentrações relativas dos nutrientes estavam mais próximas dos valores adequados à espécie (Grossi, 1995), permitindo maior relação do meio com o PMS, e determinando maior produtividade. Isto poderia explicar a relação meio de cultura – crescimento da planta, ou seja, a necessidade de um meio de crescimento equilibrado em relação as condições de crescimento e sua disponibilidade nutricional.

4.7 Teor de cálcio constituinte da matéria seca

Para este elemento e pela Tabela 9, evidenciou-se uma forte separação entre os tratamentos de 0,0 a 5,0 e os tratamentos 7,5 a 15,0mM de cálcio ao longo de todo o período de cultivo das plantas. Contudo, fez-se necessária uma análise mais detalhada deste elemento nos diversos períodos e tratamentos. Assim, que as diferenças entre os tratamentos em cada período foi praticamente linear, ou seja, o teor de cálcio absorvido aumentou de acordo com o aumento da disponibilidade (concentração). Esta relação foi facilmente comprovada verificando-se o Apêndice 2.

O fato do tratamento 0,0mM de cálcio apresentar um maior valor no período de 7 dias de cultivo, deveu-se, provavelmente, ao teor de cálcio residual do explante Conforme Grossi (1995), como o meio era ausente deste elemento e portanto não havia fonte deste nutriente para ser absorvida, o seu teor inicial sofreu difusão com o crescimento da planta, já que baixas concentrações de cálcio podem manter as taxas de crescimento das plantas. Contudo, como visto anteriormente, as funções que o cálcio desempenha são várias e de grande importância, desta forma a ausência da fonte fornecedora do nutriente para manter as atividades ligadas ao cálcio determinou deficiência fisiológicas e bioquímica à planta (Marschner, 1986).

O tratamento 2,5mM de cálcio, apresentou um teor de cálcio absorvido constante, mostrando um estado de equilíbrio nutricional para este tratamento, porém, nesta concentração de cálcio a planta não apresentou resultados expressivos de produção, acreditando-se então, que esta dose de cálcio seja suficiente apenas para manter a planta em crescimento, sem promover maiores ganhos ou produções vegetativas significativas.

O tratamento 5,0mM de cálcio, utilizado como padrão para o meio JADS, apresentou uma queda do teor aos 14 dias de cultivo, retornando em seguida para um nível estável de absorção indiferente ao período de cultivo. Entendeu-se esta concentração como a anterior, existiam doses suficientes para manter as funções básicas da vida da célula, sem contudo, promover um aumento nas taxas vegetativas e limitando as demais atividades em que o Cálcio atua como indutor ou mensageiro secundário (Malavolta, 1980).

De acordo com Epstein (1975), os demais tratamentos apresentaram um aumento crescente do teor de cálcio absorvido até o período de cultivo de 21 dias. Após este período, voltaram a apresentar incrementos nos seus teores de absorção, mostrando que após o período 21 dias de cultivo, a planta respondeu ou recebeu um estímulo diferente e passou a reabsorver este nutriente induzindo-a a novos crescimentos. Conforme Marschner (1986), mostrou-se que a partir deste período, a planta passou a absorver e translocar os Ca^{2+} para dentro do citoplasma e novamente para fora do citoplasma. Atingindo um novo patamar de reação e troca iônica.

Nos tratamentos 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio, verificou-se claramente um ponto de queda de absorção de cálcio aos 21 dias de cultivo, seguido por um aumento no teor de absorção deste elemento. Acreditou-se, que este evento esteja relacionado ao ponto de saturação iônica da célula, dando início ao processo de saída de íons. Este processo está relacionado com a saturação dos locais de ligação e armazenamento do cálcio, paredes, membranas e organelas citoplasmáticas. A partir deste ponto, acredita-se que seja ativado o processo de saída de íons de cálcio para os espaços livres da parede celular, onde ocorre a associação com outros íons, e outros elementos do metabolismo da planta (Epstein, 1961).

Tabela 9 - Teor de cálcio constituinte da matéria seca (g.Kg⁻¹) nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio.

Tratamentos	00 dias	07 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	Média
0,0mM Ca	-	3,42	1,62	1,46	1,24	1,06	1,76
2,5mM Ca	-	6,00	4,23	5,11	5,88	4,49	5,14
5,0mM Ca	-	3,42	1,62	9,62	9,42	9,61	6,74
7,5mM Ca	-	12,14	15,23	8,91	13,61	13,77	12,73
10,0mM Ca	-	13,28	15,92	8,58	15,72	16,47	13,99
15,0mM Ca	-	16,73	17,28	7,97	23,94	22,06	17,60
Média	-	9,165	9,32	6,94	11,63	11,24	

Apesar da saída de íons de Cálcio ser um processo de perda, De Guzman & Dela Fuente (1984), e como mostra a Tabela 9, relataram que este fenômeno, acaba desencadeando um processo de crescimento posterior, quando estes íons Ca²⁺, ligam-se com outros elementos promotores do transporte de íons e que estão ligados ao metabolismo celular, como por exemplo a calmadulina, segundo mensageiro (Chandra *et al.* 1982; Daye *et al.*, 1984) .

A partir deste ponto, o cálcio passa a ter um papel decisivo na manutenção de certas atividades metabólicas, ligando-se a calmadulina e outras proteínas Fosket (1994), e formando um complexo indutor à ligação do AIA que promove o alongamento celular e a formação de novas gemas (ponto de máximo número de gemas e peso da matéria seca) (Cohen & Nadler, 1976). Além das ligações com o AIA, o cálcio está envolvido em alguns mecanismos de ação e ligações com outros elementos que vão contribuir com o aumento do PMS.

Como este evento não é um estado normal da parede/membrana celular, haveria uma tendência a eliminação desses íons excessivos e assim a perda matéria seca. Após este período, se a célula se mantiver íntegra, haverá uma retomada dos processos de absorção e metabolismos celulares, retomando a produção de carboidratos e matéria seca (Dainty & Hope, 1961).

4.8 Taxa de Crescimento Relativo (TCR)

As taxas de crescimento relativo foram determinadas em cada período de cultivo para cada tratamento. Pela tabela 10, verifica-se que as maiores taxas de crescimento relativo aconteceram no período de 7 dias de cultivo, sendo decrescentes após este período. Porém, isto não indica que a planta está decrescendo, apenas confirma as características naturais de crescimento vegetal.

Segundo Slocum & Roux (1983), a planta tem um incremento de crescimento maior nas idades iniciais de desenvolvimento (períodos de cultivo), até atingir um ponto de máximo incremento. Após este ponto, os incrementos de crescimento são decrescentes (Figura 7).

Figura 7 - Taxas de crescimento relativo em relação ao peso da matéria seca (PMS) (g) nos períodos 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

Analisando os teores de absorção do N, P, K, S e Zn, encontra-se uma relação direta com a TCR, visto que, estes nutrientes apresentam altos teores de absorção nos seus

períodos iniciais de crescimento, e apresentam teores decrescentes de absorção após estes períodos iniciais.

Tabela 10 - Taxa de crescimento relativo em relação ao peso da matéria seca nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para os tratamentos 0,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0mM de cálcio.

P. C.	0,0mM Ca	2,5mM Ca	5,0mM Ca	7,5mM Ca	10,0mM Ca	15,0mM Ca	Média
00 dias	0	0	0	0	0	0	0
07 dias	27,73	30,08	28,41	30,02	26,01	31,70	28,99
14 dias	14,31	15,78	15,44	18,01	15,85	17,15	16,09
21 dias	13,32	12,20	12,70	13,61	14,28	13,72	13,31
28 dias	10,98	10,66	11,13	10,49	10,13	11,26	10,77
35 dias	8,45	8,03	7,83	8,20	8,61	8,36	8,25
Média	12,47	12,79	12,59	13,39	12,48	13,70	

A Tabela 10, mostra que as taxas de crescimento relativo são maiores nos períodos iniciais, sendo a maior TCR encontrada para o período 7 dias de cultivo. Acredita-se que este fator ocorra devido a velocidade de absorção de nutrientes ser maior no início do crescimento da planta, quando o meio de cultura esta mais favorável ao transporte e troca de íons, gerando um maior equilíbrio iônico. Outro fator associado a maior taxa de crescimento relativo ocorrer no início do crescimento (fase exponencial de crescimento) é a presença de grande número de sítios de ligação livres na parede e estrutura da célula (Marschner, 1986).

As médias das TCRs para todos os tratamentos independe da concentração de cálcio no meio, este resultado esta de acordo com (Correia, 1993 e Grossi, 1995), e conforme pode-se observar na Tabela 10.

Se as TCRs e as demais variáveis forem inferiores em relação aos tratamentos, pode-se deduzir, segundo *Leifert et al.* (1991), que um dos fatores de influencia foi que a

absorção de nutrientes no meio de cultura é influenciada pelo número de explantes dentro de cada recipiente. A absorção por explante aumenta quando há maior disponibilidade de meio de cultura (área de crescimento). Ou seja, quanto menor o número de explantes por unidade de meio de cultura, maior a quantidade de nutrientes absorvidos pelos explantes individualmente. Também aqui, pode-se ter que, a maior disponibilidade de nutrientes é mais absorvida pela planta que possui mais espaço para crescer, já que, quanto maior este espaço de crescimento maior será a taxa de fotossíntese e maior o teor de absorção dos nutrientes, formando, então, mais carboidratos e portanto obtendo-se maior quantidade de matéria seca (Reiss & Herth, 1979).

Esta taxa de crescimento relativo sofre influência direta das condições do meio em que a planta cresce (dinâmica de íons, concentração de nutrientes, estresse hídrico), dos fatores ambientais, das características genéticas e das condições internas da célula (Lee *et al*, 1984; Hepler & Wayne, 1985; Gougler & Evans, 1981) .

4.9 Inter-relações entre os nutrientes

Interações entre nutrientes em plantas superiores ocorrem quando o suprimento de um nutriente afeta a absorção, distribuição ou função de outro nutriente. Dependendo do suprimento de nutrientes, interações entre nutrientes podem induzir deficiência ou toxicidade e podem modificar a resposta ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Robson & Pitman, 1983).

As interações entre os nutrientes dependem de muitos fatores incluindo a taxa de absorção de nutrientes, distribuição dos nutrientes nos sítios funcionais, e a mobilidade dos nutrientes dentro das plantas. As interações ocorrem tanto entre os micronutrientes, como entre os macronutrientes. Segundo ele, as interações podem ser definidas como: (i) uma influência, uma ação mútua ou recíproca, de um elemento sobre outro em relação ao crescimento da planta, e (ii) uma resposta diferenciada por um elemento em combinação, em níveis variados de um

segundo elemento aplicado simultaneamente, ou seja, os dois elementos combinados para produzir um efeito positivo (ou negativo) e não somente devido a um deles.

Mas por outro lado, existem fatores internos e externos que influenciam a absorção dos nutrientes como: pH, inibição ou sinergismo com outros íons, níveis de carboidratos, estado iônico interno e as características genéticas da planta.

As melhores taxas de crescimento são encontradas nas plantas que possuem as melhores condições, genotípicas e fenotípicas, para o seu crescimento. Deste modo o meio em que a planta se desenvolve, tem um papel fundamental no crescimento e estabelecimento da planta, já que ele é um dos fatores que determina o seu estado nutricional (Ingestad & Agred, 1995).

Segundo Epstein (1975), os vegetais respondem a todos os estímulos, sejam negativos ou positivos, de modo semelhante, ou seja, primeiro adaptam-se ao estímulo recebido para depois, então, dar continuidade aos processos metabólicos que determinam seu crescimento

Assim, a presença, a concentração dos nutrientes e as inter-relações entre eles determinam a expressão do máximo crescimento vegetativo. Estes fatores variam de espécie para espécie e de acordo com o meio em que se encontram (Insgestad & Agred, 1995).

O mecanismo das citocininas está diretamente ligado à concentração de N nos tecidos, e quanto maior for esta concentração, maior também, será a síntese de citocinina (Mengel & Kirkby, 1987). Por esta relação, tem-se que o N exerce grande influência no transporte de citocininas para as gemas, acreditando-se então, que a citocinina promove o aumento do número de gemas, que é influenciado pelo Nitrogênio. Os íons potássio e fósforo, também favorecem a síntese e o transporte das citocininas, podendo o acúmulo de fósforo levar a síntese endógena do etileno.

Segundo Grossi (1995), a indução de hiperhidria (diferenciações do limbo foliar) pode ser devido a um desequilíbrio entre o aumento do volume e a divisão celular, em função da presença de grandes concentrações de citocinina, perturbando o processo de diferenciação

celular. Isto significa que a citocinina pode gerar grande volume e grande número de divisões celulares (se acontecer no meristema poderá haver ligação com o número de gemas).

Níveis mais adequados de fósforo dependem da concentração de potássio. Porém, Leifert *et al.* (1991), mostrou que muitas espécies arbóreas necessitam menores concentrações de potássio no meio de cultura. Alguns relações entre nutrientes podem ser descritas como causa para o surgimento destas deficiências nutricionais encontradas. Mengel & Kirkby (1987), relatam que as maiores ocorrências de deficiência de S são observadas mais freqüentemente em condições de excesso de N ou P.

Neste trabalho, as concentrações de cálcio diferenciadas determinaram alterações nos teores de absorção dos nutrientes, conforme visto anteriormente. Porém seguindo a teoria da adaptação e dos processos bioquímicos e fisiológicos, sabe-se que as respostas à estas alterações (inter-relações) podem ser evidenciadas em um maior ou menor período de cultivo (Marschner, 1986).

Com base nos resultados anteriores verificou-se que os nutrientes expressam padrões de resposta diferenciados. Os elementos K, Cu e Zn apresentaram nos últimos períodos de cultivo, uma estabilidade nos seus teores de absorção, indicando, que talvez, estes elementos tenham atingido um teor ótimo de absorção para estas condições de cultivo.

Os demais elementos apresentaram respostas variadas tanto em relação as concentrações quanto aos períodos de cultivo. Assim, com base nos coeficientes de correlação (Apêndices 14 a 16) obteve-se os seguintes resultados:

Peso da Matéria Seca

Para o tratamento 7,5mM de cálcio, o peso da matéria seca, apresentou forte correlação diretamente proporcional com o número de gemas, (Apêndice 22) nitrogênio e magnésio, e inversamente proporcional com o enxofre, para o período 21 dias de cultivo.

Para o tratamento 10,0mM de cálcio, o peso da matéria seca, apresentou forte correlação diretamente proporcional com o número de gemas e o cálcio, e inversamente proporcional com o magnésio e o ferro, para o período 21 dias de cultivo. (Apêndice 23)

Número de Gemas

Para o tratamento 7,5mM de cálcio, o número de gemas apresentou forte correlação diretamente proporcional com o peso da matéria seca, nitrogênio e magnésio, e inversamente proporcional com o enxofre.

Para o tratamento 10,0mM de cálcio, o número de gemas apresentou forte correlação diretamente proporcional com o peso da matéria seca e o cálcio (Apêndice 14), e inversamente proporcional com o magnésio, ferro e manganês.

Teor de Cálcio

Para o tratamento 10,0 mM de cálcio, o teor de absorção do cálcio, apresentou forte correlação diretamente proporcional com o peso da matéria seca, número de gemas e o potássio, e inversamente proporcional com o enxofre, ferro, boro, magnésio, zinco e fósforo.

Para o tratamento 7,5 mM de cálcio, o teor de absorção do cálcio, apresentou forte correlação diretamente proporcional com o peso da matéria seca, número de gemas e o cobre, ferro, fósforo, manganês e potássio, e inversamente proporcional com o zinco.

Com base nos coeficientes de correlação verificou-se que os teores de absorção dos nutrientes, variam em função da concentração e do período de cultivo até o momento em que atingem uma estabilidade, ou seja um equilíbrio dinâmico de íons.

4.10 Estado de equilíbrio dinâmico dos íons – Geochem

Pelo programa Geochem, obteve-se a distribuição dos metais e ligantes para cada meio de cultura pelo cálculo do equilíbrio iônico. Os Apêndices 18 a 21 mostram os resultados do programa Geochem ou seja, a distribuição primária de cada componente (metal e ligante), juntamente com as suas possíveis formas químicas.

Verificou-se que a distribuição dos componentes, quando da alteração da concentração do cálcio, alterou o equilíbrio iônico e conseqüentemente a disponibilidade dos metais e ligantes para as plantas, podendo causar um desequilíbrio no seu crescimento e desenvolvimento.

Quando comparado o tratamento testemunha (5,0mM de cálcio), obteve-se que a eliminação do Ca^{2+} no meio de cultura do tratamento 0,0mM de cálcio, promoveu um aumento das ligações do MoO_4^{2-} com o cátion Mg^{2+} , mostrando que o magnésio é substituído pelo cálcio. Também, o tratamento 0,0mM de cálcio aumentou a quantidade deste íon (MoO_4^{2-}) na sua forma livre e no número de ligações com o próton H^+ .

Os tratamentos 0,0 e 2,5mM de cálcio aumentaram o número de ligações do PO_4^{3-} com o Mn^{2+} e o K^+ . Enquanto o tratamento 0,0mM de cálcio elevou o número de ligações do SO_4^{2-} com o Mn^{2+} . Os tratamentos 10,0 e 15,0mM de cálcio reduziram o número de ligações do B(OH)_4^- com o próton H^+ e elevaram o número de ligações do Mn^{2+} com o Cl^- .

Os tratamentos 7,5; 10,0 e 15,0mM de cálcio reduziram o número de ligações do SO_4^{2-} com Fe^{2+} , promoveram ligações do K^+ e do Na^{2+} com o Cl^- , reduziram as ligações do PO_4^{3-} com o Fe^{2+} e o K^+ . Estes tratamentos também reduziram o número de ligações do Mg^{2+} com o NO_3^- . O tratamento 15,0mM de cálcio elevou o número de ligações do Fe^{2+} com o Cl^- , reduziu as ligações do Cl^- com o Mg^{2+} e do SO_4^{2-} com o Mn^{2+} e o Na^+ . Este tratamento também reduziu o número de ligações do Na^{2+} e do K^+ com o PO_4^{3-} . Por fim, os tratamentos 10,0 e 15,0mM de Cálcio reduziram o número de ligações do K^+ com o NO_3^- .

4.11 Sintomas de deficiência

Os sintomas de deficiência encontrados neste trabalho foram identificados de acordo com os tratamentos, assim, são apresentados os resultados de acordo com os tratamentos em cada período de cultivo.

No período 7 dias de cultivo, foi encontrado diferenciações nas formas das folhas nos tratamentos 7,5 e 15,0mM de cálcio, porém sua ocorrência foi baixa (< 10,0% e 25,0%), respectivamente. No período 14 dias de cultivo foram encontrados casos de alteração da forma foliar em todos os tratamentos, apresentando baixas porcentagens de ocorrência, com exceção do tratamento 2,5mM de cálcio que apresentou uma taxa de ocorrência de 50,0%.

No período 21 dias de cultivo, os tratamentos 0,0 e 2,5mM apresentaram alteração da forma foliar elevada (> 75,0%), enquanto os demais tratamentos apresentaram taxas iguais ou inferiores a 50,0% para esta característica. No período 28 dias de cultivo o tratamento 0,0mM de cálcio, foi o único que apresentou taxa de alteração da forma foliar superior a 50,0%. E no período 35 dias de cultivo todos os tratamentos apresentaram diferenciações em suas folhas.

Apesar destas diferenças nas formas das folhas apresentarem-se pronunciadas e evidentes, não se pode afirmar que esta característica seja um sintoma de deficiência nutricional, ou se outros fatores, como: competição, crescimento, luz, temperatura, posição da planta e posição da folha na planta entre outros, não tenham determinado estas alterações na forma da folha (Epstein, 1975; Marschner, 1986).

Em relação a outros sintomas, no período 21 dias de cultivo, algumas plantas do tratamento 5,0mM de cálcio, apresentaram pontos de necrose foliar e manchas vermelhas e marrons em suas folhas; também foi observado a ocorrência de folhas avermelhadas no tratamento 7,5mM de cálcio, neste mesmo período.

No período 28 dias de cultivo, os tratamentos 0,0 e 7,5mM de cálcio apresentaram clorose em suas folhas, sendo que no primeiro a ocorrência foi muito mais intensa (> 95,0%) e no último, além da clorose também observou-se manchas vermelhas nas folhas e pecíolos.

No período 35 dias de cultivo, todos os tratamentos apresentaram clorose, porém os tratamentos de baixa concentração de cálcio (0,0; 2,5 e 5,0mM) apresentaram sintomas mais severos. Entretanto, os tratamentos de alta concentração de cálcio (7,5, 10,0 e 15,0mM) apresentaram pouca ocorrência, mas apresentaram casos de manchas vermelhas tanto em suas folhas, como também, nos seus pecíolos.

Neste período de 35 dias de cultivo, o tratamento 0,0mM de cálcio, apresentou plantas com pecíolos de aspecto farináceo, sugerindo uma possível desintegração da membrana/parede celular e desorganização celular.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho permitiu verificar interações e reações que as alterações nas concentrações de cálcio podem provocar. Porém, estas alterações não são exclusivas do cálcio. Muitos, senão todos, os nutrientes podem provocar diferenças nos padrões de crescimento e desenvolvimento vegetal, como também as interações destes nutrientes apresentam respostas diferenciadas.

O meio sólido pode ter alterado e dificultado os resultados, pois foi observado que nas concentrações 10,0 e 15,0mM de cálcio o meio apresentou-se ligeiramente endurecido;

O cálcio residual do explante, pode ter mascarado alguns resultados, principalmente nos tratamentos com 0,0 e 2,5mM de cálcio. Estes resultados, indicam a necessidade de eliminar-se por completo os traços residuais do cálcio, visto que a planta responde a concentrações baixas deste elemento. Assim, para que se tenha a real expressão do tratamento, considera-se interessante a repetição destes tratamentos com as seguintes variações: i) as mudas são originárias de meios deficientes de cálcio; ii) as mudas são originárias dos mesmos meios diferenciados de cálcio, ou seja, há uma repetição do trabalho e iii) as mudas são originárias de meios com concentrações de cálcio excessivas.

Mostrou-se importante o desenvolvimento de estudos das inter-relações do Cálcio com outros fatores, tais como: nutrientes, reguladores de crescimento, vitaminas,

proteínas, antibióticos, luz, temperatura, estresse hídrico, fontes de nutrientes e solubilidade dos meios.

Em relação as concentrações, o peso da matéria seca e o número de gemas sofreram variação em função da concentração de cálcio no meio de cultivo, tendo sido fortemente afetado pelo tempo de exposição (contato) da planta com o elemento.

O melhor período de crescimento é o período onde há otimização dos fatores e variáveis que interferem e determinam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Ou seja, aliar o período de cultivo às condições de crescimento, tais como: nutrientes, água, salinidade e saturação do meio, aeração, luz, temperatura e espaço disponível para crescimento, poderão determinar resultados mais expressivos e maiores rendimentos na produtividade de matéria vegetal. Estas inter-relações entre os fatores de crescimento, determinam também, um maior ganho por unidade consumida (tempo e produtos), isto é, após atingir um certo período de equilíbrio e por um certo período, cada unidade consumida de nutriente (g.kg^{-1}), gera um ganho relativo em relação ao volume de matéria produzida, maior do que em fases onde a planta ainda não recebeu os melhores estímulos ao seu crescimento.

Estes estímulos estão relacionados as concentrações de cálcio no meio de crescimento e ao período de contato com a planta. Quando estes estímulos estão em equilíbrio, a planta atinge seu patamar de crescimento para aquela fase. Este patamar é determinado pela saturação dos sítios de ligação do cálcio nas organelas, membranas e parede celular. Neste momento, tem-se a melhor expressão em termos de qualidade desejada ao tamanho e peso da planta, número e homogeneidade de gemas.

Quando em concentração ótima, determinada pelo período de cultivo e condições de crescimento, existe uma saturação dos sítios de reserva de cálcio, o metabolismo celular da planta sinaliza uma parada de absorção deste elemento e determina o início da saída de cálcio. Com a saída do cálcio que se dá no sentido das organelas para as paredes, isto é, quando há saturação dos últimos sítios receptores de cálcio, presentes nas organelas da célula, a planta inicia a liberação de cálcio a partir dos últimos sítios de ligação do cálcio. Após a liberação destes sítios a planta inicia a liberação do cálcio ligado nos sítios de recepção da membrana celular e depois os da parede celular. A saída do cálcio, determina o enfraquecimento

das estruturas celulares, visto que este elemento é o responsável pela tonicidade da parede e membranas celulares. Este enfraquecimento das estruturas celulares possibilita a ação dos demais nutrientes e permite, principalmente, a ação da auxina e outras ligações químicas existentes no citosol e espaços livres da célula, que promovem o alongamento celular.

A promoção do alongamento celular expressa o crescimento da planta, permitindo um aumento no número de gemas, visto que, com o crescimento da planta, em condições ótimas de nutrição e ambiente, haverá um aumento da formação de carboidratos, que são gerados a partir da fotossíntese e por isso há necessidade de se ter um aumento da área foliar para a realização deste fenômeno e também para garantir a energia necessária ao crescimento da planta e sustentar o seu crescimento. Neste momento, a planta inicia um novo estágio de crescimento, estabelecendo o que passamos a chamar de novo patamar de crescimento. Se as concentrações de cálcio, nutrientes e meio de crescimento são propícias, a planta dará início a esta nova fase de crescimento, apresentando necessidades internas nutricionais. O que define a parada de saída de cálcio da célula e reentrada deste elemento na planta. Esta reentrada, segue exatamente o mesmo processo de entrada do cálcio na planta, ou seja, o cálcio presente nos espaços livres da célula começa a ligar-se aos sítios receptores da parede celular, depois os da membrana celular e depois os das organelas. Com a re-ligação do cálcio aos sítios receptores e devido a capacidade do cálcio de atuar como segundo mensageiro, outros elementos químicos, como nutrientes, proteínas, enzimas, vitaminas e fitohormônios, são transportados para o interior da célula. Entretanto estes elementos não são transportados para o exterior da célula no momento da saída do cálcio. Desta forma, quando o estado nutricional é ótimo e encontrando-se em condições ideais de crescimento, a planta expressará maiores taxas de crescimento relativo, o que determinará um aumento da matéria fresca e seca e também do número de gemas. Estes mecanismos de entrada e saída do cálcio nas estruturas das células, podem ocorrer sempre que as plantas encontrarem-se em condições de meio ideais para o seu crescimento e que as necessidades de cálcio sejam garantidas.

6 CONCLUSÕES

As concentrações de cálcio causaram diferentes respostas à planta, determinando níveis de produtividade diferenciados em relação ao peso da matéria seca e ao número e homogeneidade de gemas, variando em função do período de cultivo;

As concentrações de cálcio diferenciadas alteraram os teores de absorção dos nutrientes minerais que variaram em função do período de cultivo e mantiveram o estado nutricional da planta;

Altas concentrações de cálcio não mostraram efeito tóxico sobre a planta. Porém, a ausência de Cálcio no meio provoca deficiências severas na planta;

O período 21 dias mostrou melhor resultados, tanto para o peso da matéria seca, número e homogeneidade de gemas e absorção de nutrientes;

Concentrações de cálcio entre 7,5 e 10,0mM de cálcio expressaram melhor o potencial de crescimento da planta, em relação ao peso da matéria seca, número e homogeneidade de gemas e teor de absorção de nutrientes.

As concentrações a partir de 7,5mM de cálcio, podem ter possibilitado à planta atingir novos patamares de crescimento e desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANGERTH, F.; DILLEY, D.R.; DEWEY, D.H. Effect of calcium infusion on internal break-down and respiration of apple fruits. **Journal of America Society of Horticultural Science**, v. 97, p. 679-682, 1972.
- BRIGGS, G.E. Some aspects of tree space in plant tissues. **New Phytol.**, v. 56, p. 305-324, 1957.
- BRIGGS, G.E.; ROBERTSON, R.N. Apparent free space. **Annual Revision of Plant Physiology**, v. 8, p.11-30, 1957.
- BRIGGS, G.E., HOPE, A.B.; PITMAN, M.G. Exchangeable ions in beet disks at low temperature. **J. Expt. Bot.**, v. 9, p. 128-141, 1958.
- BRIGGS, G.E.; KIDD, F.A.; WEST, C. A quantitative analysis of plant growth. Part II. **Ann. Appl. Biol.**, v. 7, p. 202-23, 1920.
- BRIGGS, G.E.; HOPE, A.B.; ROBERTSON, R.N. Electrolytes and Plant Cells. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, 1961.
- BUCKHOUT, T. J. ATP-dependent Ca^{2+} transport in endoplasmic reticulum isolated from roots of *Lepidium sativum* L. **Planta**, v. 159, p. 84-90, 1983.

- BUCKHOUT, T. J. Characterization of Ca^{2+} transport in purified endoplasmic reticulum membrane vesicles from *Lepidium sativum* L. roots. **Plant Physiology**, v. 76, p. 962-967, 1984.
- BURSTRÖM, H. Studies on growth and metabolism of roots. VIII. Calcium as a growth factor. **Plant Physiology**, v. 5, p. 391-402, 1952.
- BURSTROM, H.G. Calcium and plant growth. **Biol. Ver.**, v. 43, p. 287-316, 1968.
- CALDERON-BALTIERRA, X.V. Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globosus*. **Bosque**, v. 15, n. 1, p.33-38, 1991.
- CHANDRA, S.; CHABOT, J. F.; MORRISON, G. A.; LEOPOLD, A. C. Localisation of calcium in amyloplasts of root cap cells using ion microscope. **Science**, v. 216, p.1221-123, 1982.
- CLELAND, R. E.; RAYLE, D. L. Reevaluation of the effect of calcium ions auxin induced elongation. **Plant Physiology**, v. 61, p. 709-712, 1977.
- COHEN, J. D.; NADLER, K. D. Calcium requirement for indoleacetic acid-induced acidification by *Avena* coleoptiles. **Plant Physiology**, v. 57, p. 347-350, 1976.
- CORREIA, D. Crescimento e desenvolvimento de gemas na multiplicação de *Eucalyptus* spp. *in vitro* em meio de cultura líquido e sólido. Piracicaba, 1993. 113p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DAINTY, J.; HOPE, A. B. The electric double layer and the Donnan equilibrium in relation to plant cell walls. **Australian Journal Biology Science**, v. 14, p. 541-551, 1961
- DAY, D. A.; WISKICH, J. T. Transport processes of isolated plant mitochondria. **Physiology Vegetal**, v. 22, p. 241-261, 1984.
- DAYE, S.; BIRO, R.; ROUX, S. J. Inhibition of gravitropism in oat coleoptiles by calcium chelator ethylene-glycol-bis (beta aminoethyl-ether)-N-N-tetra-acetic acid. **Plant Physiology**, v.61, p. 449-454, 1984.
- DE GUZMAN, C. C.; DELA FUENTE, R. K. Polar calcium flux in sunflower hypocotyl segments. I. The effect of auxin. **Plant Physiology**, v. 76, p. 347-352, 1984.

- DELA FUENTE, R. K. Role of calcium in the polar secretion of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 76, p. 342-346, 1984.
- EPSTEIN, E. The essential role of calcium in selective cations transport by plants cells. **Plant Physiology**, v. 36, p. 437-444, 1961.
- EPSTEIN, E. Mutual effects of ions in their absorption by plants. **Agrochimica**, v. 6, p. 293-322, 1962.
- EPSTEIN, E. Mineral metabolism. In: BONNER, J. & VARNER, J.E. (Ed.). **Plant Biochemistry**. Nova Iorque e Londres: Academic Press, 1965. p. 438-466.
- EPSTEIN, E. Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. **Nature**, v. 212, p. 1324-1327, 1966.
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas**. Rio de Janeiro: Universidade de São Paulo, 1975. 344p.
- EPSTEIN, E., RAINS, D.W.; ELZAM, O.E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 49, p. 684-692, 1963.
- EVANS, M.; LEE, J. Relationship of calcium asymmetry to auxin movement in roots of maize. **Plant Physiology**, v. 75, p. S-177, 1984.
- EVANS, M. L.; LEE, J. S.; KUZMANOFF, K. M. Effect of calcium entry blockers on growth and gravitropism of maize roots. **Plant Physiology**, v. 72, p. S-63, 1983.
- FAUST, M.; KLEIN, J.D. Levels and sites of metabolically active calcium in apple fruits. **Journal of American Society of Horticultural Science**, v. 99, p. 93-94, 1974.
- FOSKETT, D.E. **Plant growth and development: a molecular approach**. London: Academic Press Inc., 1994. 580p.
- GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H. Auxin control of calcium-mediated peroxidase secretion by auxin-dependent and auxin-independent sugarbeet cells. **Phytochemistry**, v. 22, p. 2657-2660, 1983.

- GOUGLER, J.A.; EVANS, M.L. Adaptation of corn roots to exogenously applied auxin. **Physiology Plant**, v. 51, p. 394-398, 1981.
- GROSS, J.; MARMÉ, D. ATO-dependent Ca^{2+} uptake into plant membrane vesicles. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 75, p. 1232-1236, 1978.
- GROSSI, F. Adequação nutricional do meio de cultura para crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus saligna* SMITH *in vitro*, procedência Itatinga. Piracicaba, 1995. 125p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HAAG, H. P.; MELLO, F. A. F.; BRASIL SOBRINHO, M. O. C.; ACCORSI, W. R.; MALAVOLTA, E.; ARZOLLA, S. Estudos sobre a alimentação mineral do eucalipto: sintomas de deficiências dos macronutrientes e composição mineral. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2, 1961. v. 2, p. 926-932.
- HASENSTEIN, K. H.; EVANS, M. L. Calcium dependence of rapid auxin action in maize roots. **Plant Physiology**, v. 81, p. 439-443, 1986.
- HEPLER, P. K.; WAYNE, R. O. Calcium and plant development. **Annu Rev Plant Physiology**, v. 36, p. 397-439, 1985.
- HERTEL, R. The mechanism of auxin transport a model for auxin actin. **Z Pflanzenphysiol**, v. 112, p. 53-67, 1983.
- HIGASHI, E. N. Diagnose de deficiência de nutrientes minerais em três híbridos de *Eucalyptus* spp. cultivados *in vitro*. Piracicaba, 1996. 85 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- HOPE, A. B.; STEVENS, P. G. Electric potential differences in bean roots and their relation to salt uptake. **Australian Journal Science Research Biology**, v. 5, p. 335-343, 1952.
- HUNT, R. **Plant growth curves; the functional approach to plant growth analysis**. London:Edward Arnol., 1982. 248p.
- INGESTAD, T.; ÅGREN, G. I. Plant nutrition and growth: basic principles. **Plant and Soil**, v.168/169, p. 15-20, 1995.

- KANNAN, S. The plasmalemma: the seat of dual mechanisms of ion absorption in *Chlorella pyrenoidosa*. **Science**, 1971.
- KUBOWICZ, B. D.; VANDERHOEF, L. N.; HANSON, J. B. ATP-dependent calcium transport in plasmalemma preparations from soybean hypocotyl. Effect of hormone treatments. **Plant Physiology**, v. 69, p. 187-191, 1982.
- LARKUM, A. W. D. Ionic relations of chloroplasts *in vivo*. **Nature**, v. 218, p. 447-449, 1968.
- LAU, O. L.; YANG, S. F. Stimulation of ethylene production in the mung bean hypocotyls by cupric ion, calcium ion, and kinetin. **Plant Physiology**, v. 57, p. 88-92, 1976.
- LAU, O. L.; JOHN, W. W.; YANG, S. F. Effect of different cytokinins on ethylene production by mung bean hypocotyls in the presence of indole-3-acetic acid or calcium ion. **Plant Physiology**, v. 39, p. 1-3, 1977.
- LEE, J. S.; MULKEY, T. L.; EVANS, M. L. Gravity-induced polar transport of calcium across root tips of maize. **Plant Physiology**, v. 73, p. 874-876, 1983.
- LEE, J. S.; MULKEY, T. L.; EVANS, M. L. Inhibition of polar calcium movement and gravitropism in roots treated with auxin-transport inhibitors. **Planta**, v. 160, p. 536-543, 1984.
- LEIFERT, C.; PRYCE, S.; LUMSDEN, P. J.; MURPHY, K. P. Effects of mineral nutrition on growth of tissue cultured plants. In: GOULDING, K. H. (Ed.). **Horticultural Exploitation of Recent Biological Development**. Preston: Lancashire Polytechnic Publication Service, p.43-57, 1991.
- LESHAM, Y. Y.; SRIDARA, S.; THOMPSON, J. E. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of pea foliage. **Plant Physiology**, v. 75, p. 329-335, 1984.
- LEW, R. R.; BRISKIN, D. P.; WYSE, R. E. Ca^{2+} uptake by endoplasmatic reticulum from Zucchini hypocotyls. The use of chlorotetracycline as a probe for Ca^{2+} uptake. **Plant Physiology**, v. 82, p. 47-53, 1986.
- MALAVOLTA, E. Os elementos minerais. In: MALAVOLTA, E. (Ed.). **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. cap.6, p.104-218.

- MARMÉ, D. The role of Ca and calmodulin in plants. What's New. **Plant Physiology**, v. 13, p. 37-40, 1982.
- MARMÉ, D. Calcium transport and function. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.) **Encyclopedia of Plant Physiology, New Series**, v. 15b. New York: Springer-Verlag, 1983. p.599-625.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1986. 674p.
- MATTIGOD, S. V.; SPOSITO, G. Chemical modeling of trace metal equilibria in contaminated soil solutions using the computer program GEOCHEM. **American Chemical Society**, v. 93, p.837-56, 1979.
- MATTOO, A.K.; LIEBERMAN, M. Localization of the ethylene-synthesizing system in apple tissue. **Plant Physiology**, v. 60, p. 794-799, 1977.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Berne: International potash Institute, 1987. 593p.
- MIGLIACCIO, F.; GALSTON, A. W. On the nature and origin of the calcium asymmetry arising during gravitropic response in etiolated pea epicotyls. **Plant Physiology**, v. 85, p. 542-547, 1987.
- MIGLIACCIO, F.; GALSTON, A. W. On the role of calcium in indole-3-acetic acid movement and graviresponse in etiolated pea epicotyls. **Plant Growth Regulation**, v. 8, p. 335-347, 1989.
- MIX, G.; MARSCHNER, H. Einfluss von exogenen und endogenen Faktoren auf den Calciumgehalt von Paprika und Bohnenfrüchten. **Z. Pflanzenernähr. Bodenkd.**, v. 139, p. 551-563, 1976a.
- MIX, G.; MARSCHNER, H. Calcium-Umlagerung in Bohnenfrüchten während des Samenwachstums. **Z. Pflanzenphysiologie**, v. 80, p. 354-366, 1976b.
- MOORE, R.; EVANS, M. L. How roots perceive and respond to gravity. **Am. J. Bot.**, v. 73, p. 576-87, 1986.

- MULKEY, T.M.; KUZMANOFF, K.M.; EVANS, M.L. Promotion of growth and shift in the auxin dose/response relationship in maize roots treated with the ethylene biosynthesis inhibitors aminoethoxyvinylglycine and cobalt. **Plant Sci Lett**, v. 25, p. 43-48, 1982.
- OHNISHI, M.; URRY, D.T. Solution conformation of valinomycin-potassium ion complex. **Science**, v. 168, p. 1091-1092, 1970.
- PARDEE, A. B. Membrane transport proteins. **Science**, v. 162, p. 632-637, 1968.
- PENEL, C.; STICHER, L.; KEVERS, C.; GASPAR, T.; GREPPIN, H. Calcium controlled peroxidase secretion by sugarbeet cells: Effect of ionophores in relation to organogenesis. **Biochem Physiol Pflanz**, v. 179, p. 173-180, 1984.
- PICKARD, B. G. Early events in geotropism of seedlings shoots. Annual Revision. **Plant Physiology**, v. 36, p. 55-75, 1985.
- POOVAIAH, B. W. Role of calcium and calmodulin in plant growth and development. **Hort-Science**, v. 30, p. 347-352, 1985.
- PRESSMAN, B.; HAYNES, D.H. Ionophorous agents as mobile ion carriers. In: TOSTESON, D.C. (Ed.) **The molecular basis of membrane function**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall Inc., 1969. p. 221-246.
- RAINS, D.W.; EPSTEIN, E. Sodium absorption by barley roots: its mediation by mechanism 2 of alkali cation transport. **Plant Physiology**, v. 42, p. 319-323, 1967.
- RASI-CALDOGNO, F.; DEMICHELIS, M. I.; PUGLIARELLO, M. C. Active transport of Ca^{2+} in membrane vesicles from pea. Evidence for a $\text{H}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ antiport. **Biochim Biophys Acta**, v.693, p. 287-295, 1982.
- REISS, H. D.; HERTH, W. Calcium gradients in tip growing plant cells visualized by chlorotetracycline fluorescence. **Planta**, v. 146, p. 615-621, 1979.

- ROBSON, A.D.; PITMAN, M.G. Interactions between nutrients in higher plants. In: LÄUCHLI, A.; BIELESKI, R.L. (Ed.) **Encyclopedia of Plant Physiology, New Series**, v. 15a. New York: Springer-Verlag, 1983. p. 147-180.
- ROTUNDO, J. C. Efeitos de concentrações de nitrato de amônio na multiplicação e no enraizamento "in vitro" de clones *Eucalyptus cloeziana* F. MUELL e *Eucalyptus citriodora* HOOK. Piracicaba, 1993. 74p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ROUX, S. J.; SLOCUM, R. D. Role of calcium in mediating cellular functions important for growth and development in higher plants. In: CHEUNG, W.T. (Ed.) **Calcium and Cell Function**, v. 3. New York: Academic Press, 1982. p. 409-453.
- SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56p.
- SIEVERS, A.; BEHRENS, H. M.; BUCKHOUT, T.J.; GRADMANN, D. Can a Ca^{2+} pump in the endoplasmic reticulum of the *Lepidium* roots be the trigger for rapid changes in membrane potential after gravistimulation. **Z. Pflanzenphysiol**, v. 114, p. 195-200, 1984.
- SLOCUM, R. D.; ROUX, S. J. Cellular and subcellular localization of calcium in gravistimulated coleoptiles and its possible significance in establishment of tropic curvature. **Planta**, v.157, p.481-492, 1983.
- SLOCUM, R.D.; GAYNOR, J.J.; GALSTON, A.W. Cytological and ultrastructural studies on root tissues. **Ann Bot**, v. 54, suppl. 3, p. 65-76, 1984.
- SPOSITO, G.; MATTIGOD, S. V. Geochemp: a computer program for the calculation of chemical equilibria in soil solutions and other natural water systems. **Kearney Foundation of Soil Science**, Riverside: University of California, 1980. 107p.
- STOCKING, C. R.; ONGUN, A. The intracellular distribution of some metallic elements in leaves. **Am. Journal Botany**, v. 49, p. 284-289, 1962.
- TEASDALE, R. D.; RICHARDS, D. K. Boron deficiency in cultured pine cells. **Plant Physiology**, v. 93, n. 3, p. 1071-77, 1990.

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

WELCH, R. M.; EPSTEIN, E. The dual mechanisms of alkali cation absorption by plant cells: their parallel operation across the plasmalemma. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 61, p. 447-453, 1968.

Apêndice 1. Ficha padrão desenvolvida para a coleta dos dados deste experimento.

FICHA PARA COLETA DE DADOS														
DEFINIÇÃO DO TRATAMENTO:														
PERÍODO:														
DATA DE COLETA:														
CLONE H10														
EXPLANT	ALT. (cm)	P. RECIP.	P. FR (mg)	P. FR. (LIQ.)	P. SEC (mg)	P. SEC. (LIQ.)	Nº DE GEMAS / CLASSES			DIM. FOLIAR		DOM. APIC.	RAIZ	PLOTS/COL
							I	II	III	TOTAL				
EXPLANT	ALT. (cm)	P. RECIP.	P. FR (mg)	P. FR. (LIQ.)	P. SEC (mg)	P. SEC. (LIQ.)	Nº DE GEMAS / CLASSES			DIM. FOLIAR		DOM. APIC.	RAIZ	PLOTS/COL
							I	II	III	TOTAL				
EXPLANT	ALT. (cm)	P. RECIP.	P. FR (mg)	P. FR. (LIQ.)	P. SEC (mg)	P. SEC. (LIQ.)	Nº DE GEMAS / CLASSES			DIM. FOLIAR		DOM. APIC.	RAIZ	PLOTS/COL
							I	II	III	TOTAL				
EXPLANT	ALT. (cm)	P. RECIP.	P. FR (mg)	P. FR. (LIQ.)	P. SEC (mg)	P. SEC. (LIQ.)	Nº DE GEMAS / CLASSES			DIM. FOLIAR		DOM. APIC.	RAIZ	PLOTS/COL
							I	II	III	TOTAL				
TOTAL														

Apêndice 4. Peso das matérias frescas e secas (g), massa de água na matéria fresca (g), porcentagens de água e sólidos, número de gemas por classe de altura e total, porcentagens totais dos nutrientes minerais analisados e do conjunto CHO e outros nutrientes constituintes da planta, nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para o tratamento 2,5 mM de Cálcio.

PC	REP.	PMF	PMS g Kg ⁻¹	H ₂ O	H ₂ O	Sólidos %	Número de Gemas			Nutrientes % Total	CHO e outros
							C I	C II	C III		
7	a	4.4513	0.3276	4.1237	92.64	7.36	22	39	27	88	89.98
	b	3.3519	0.2555	3.0964	92.38	7.62	19	34	18	71	89.75
	c	1.6865	0.1238	1.5627	92.66	7.34	10	21	7	38	89.17
	d	2.0217	0.1368	1.8849	93.23	6.77	10	18	11	39	89.31
	média	2.8779	0.2109	2.6669	92.73	7.27	15	28	16	59	89.55
	CV										
14	a	3.4164	0.2762	3.1402	91.92	8.08	79	40	12	131	88.97
	b	2.5397	0.2087	2.331	91.78	8.22	60	30	10	100	88.93
	c	2.6826	0.2232	2.4594	91.68	8.32	65	32	11	108	88.93
	d	3.9058	0.2948	3.611	92.45	7.55	84	43	13	140	89.23
	média	3.1361	0.2507	2.8854	91.96	8.04	72	36	12	120	89.01
	CV										
21	a	5.3789	0.4675	4.9114	91.31	8.69	544	100	10	654	90.16
	b	4.8521	0.3869	4.4652	92.03	7.97	452	82	10	544	90.46
	c	4.872	0.4096	4.4624	91.59	8.41	475	88	8	572	90.67
	d	4.8014	0.4002	4.4012	91.66	8.34	461	85	8	555	90.57
	média	4.9761	0.4161	4.5601	91.65	8.35	483	89	9	581	90.47
	CV										
28	a	8.813	0.6352	8.1778	92.79	7.21	290	111	22	423	91.68
	b	7.0877	0.6045	6.4832	91.47	8.53	277	101	21	399	92.05
	c	9.8955	0.7308	9.1647	92.61	7.39	338	117	23	478	91.19
	d	7.8404	0.6331	7.2073	91.93	8.07	291	106	21	418	92.04
	média	8.4092	0.6509	7.7583	92.20	7.80	299	109	22	430	91.74
	CV										
35	a	5.6808	0.436	5.2448	92.33	7.67	386	74	8	468	91.29
	b	5.322	0.448	4.874	91.58	8.42	388	71	8	467	91.66
	c	5.1412	0.409	4.7322	92.04	7.96	370	73	10	453	91.39
	d	5.9163	0.4982	5.4181	91.58	8.42	440	84	11	535	91.59
	média	5.5151	0.4478	5.0673	91.88	8.12	396	76	9	481	91.48
	CV										

Apêndice 6. Peso das matérias frescas e seca (g), massa de água na matéria fresca (g), porcentagens de água e sólidos, número de gemas por classe de altura e total, porcentagens totais dos nutrientes minerais analisados e do conjunto CHO e outros nutrientes constituintes nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para o tratamento 5,0 mM de Cálcio.

[illegible]

Apêndice 7. Teor de absorção dos macronutrientes (g Kg⁻¹) e micronutrientes (mg Kg⁻¹) constituintes da matéria seca da planta sob o efeito do tratamento 5,0 mM de Cálcio determinados nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo.

PC	REP.	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Enxofre	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
		g Kg ⁻¹						mg Kg ⁻¹				
7	a	50.40	5.54	36.26	3.46	3.08	4.33	22.45	16	350	150	52
	b	54.32	5.35	36.02	4.04	3.06	4.56	22.45	15	336	152	53
	c	50.26	5.49	37.08	2.82	3.20	4.33	21.84	18	421	148	53
	d	49.84	5.30	36.42	3.36	2.86	4.56	23.06	16	344	142	51
	média	51.21	5.42	36.45	3.42	3.05	4.45	22.4463	16.25	362.75	148.00	52
	CV											
14	a	47.88	5.35	38.04	1.58	2.88	4.15	24.88	15	320	151	52
	b	50.12	5.44	39.70	1.62	2.78	4.29	24.27	17	290	147	51
	c	48.72	5.15	33.94	1.54	3.26	3.92	26.10	14	332	144	53
	d	49.14	5.30	34.06	1.72	2.84	4.29	24.27	15	297	148	53
	média	48.97	5.31	36.44	1.62	2.94	4.16	24.8835	15.25	309.75	147.50	52
	CV											
21	a	29.96	2.945	40.44	9.56	4.66	3.64	29.1486	14	230	106	39
	b	29.54	2.849	38.54	10.16	4.12	3.83	28.5393	14	233	102	39
	c	31.92	3.665	42.72	9.26	5.44	3.27	32.1951	14	250	102	39
	d	35.28	3.809	42.04	9.5	4.88	3.41	28.5393	14	248	106	39
	média	31.68	3.32	40.94	9.62	4.78	3.54	29.6056	14.00	240.25	104.00	39
	CV											
28	a	25.76	4.217	33.06	9.3	4.14	3.83	23.0556	15	365	183	44
	b	29.26	4.217	33.48	9.46	4.48	3.73	22.4463	14	377	170	39
	c	27.58	4.241	32.96	9.4	4.2	3.78	22.4463	15	368	168	40
	d	29.4	4.217	33.56	9.5	4.28	3.78	24.2742	15	370	173	42
	média	28.00	4.22	33.27	9.42	4.28	3.78	23.0556	14.75	370.00	173.50	41
	CV											
35	a	26.46	4.169	28.66	9.36	4.12	3.18	22.4463	15	352	168	41
	b	26.18	4.097	29.44	9.94	4.06	3.18	22.4463	15	340	171	40
	c	26.6	4.001	28.06	10.08	3.94	3.18	22.4463	14	460	168	40
	d	30.8	4.337	31.6	9.04	4.62	3.37	22.4463	17	338	170	43
	média	27.51	4.15	29.44	9.61	4.19	3.23	22.4463	15.25	372.50	169.25	41
	CV											

Apêndice 8. Peso das matérias frescas e seca (g), massa de água na matéria fresca (g), porcentagens de água e sólidos, número de gemas por classe de altura e total, porcentagens totais dos nutrientes minerais analisados e do conjunto CHO e outros nutrientes constituintes da planta, nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para o tratamento 7,5 mM de Cálcio.

PC	REP.	PMF	PMS g Kg ⁻¹	H ₂ O	H ₂ O %	Sólidos %	Número de Gemas				TOT	Nutrientes % Total	CHO e outros
							C I	C II	C III				
7	a	4.0459	0.2834	3.7625	93.00	7.00	35	39	27	101	10.94	89.06	
	b	3.1073	0.2286	2.8787	92.64	7.36	30	28	23	81	10.62	89.38	
	c	3.1205	0.2293	2.8912	92.65	7.35	34	24	24	82	10.64	89.36	
	d	2.8419	0.2033	2.6386	92.85	7.15	27	24	21	72	10.76	89.24	
	média	3.2789	0.2362	3.0428	92.78	7.22	32	29	24	84	10.74	89.26	
	CV												
14	a	4.8475	0.3777	4.4698	92.21	7.79	125	47	12	184	11.28	88.72	
	b	4.6708	0.3755	4.2953	91.96	8.04	125	47	11	183	10.49	89.51	
	c	4.9791	0.4024	4.5767	91.92	8.08	134	51	12	197	10.61	89.39	
	d	3.282	0.2817	3.0003	91.42	8.58	93	35	9	137	10.48	89.52	
	média	4.4449	0.3593	4.0855	91.88	8.12	119	45	11	175	10.72	89.28	
	CV												
21	a	7.115	0.5496	6.5654	92.28	7.72	616	138	9	763	9.05	90.95	
	b	7.4592	0.517	6.9422	93.07	6.93	599	127	11	737	9.39	90.61	
	c	6.7436	0.4932	6.2504	92.69	7.31	561	123	9	694	8.56	91.44	
	d	7.0274	0.4545	6.5729	93.53	6.47	517	113	8	639	8.99	91.01	
	média	7.0863	0.5036	6.5827	92.89	7.11	573	125	9	708	9.00	91.00	
	CV												
28	a	7.5334	0.6419	6.8915	91.48	8.52	390	138	8	536	8.90	91.10	
	b	8.2587	0.6492	7.6095	92.14	7.86	377	143	8	528	8.86	91.14	
	c	4.9358	0.3979	4.5379	91.94	8.06	261	82	4	347	8.55	91.45	
	d	5.4253	0.4902	4.9351	90.96	9.04	299	105	6	410	8.53	91.47	
	média	6.5383	0.5448	5.9935	91.63	8.37	332	117	7	455	8.71	91.29	
	CV												
35	a	4.0569	0.3903	3.6666	90.38	9.62	164	107	13	284	8.92	91.08	
	b	4.5609	0.4639	4.097	89.83	10.17	182	124	12	318	8.94	91.06	
	c	6.9475	0.5885	6.359	91.53	8.47	248	162	17	427	8.92	91.08	
	d	7.2844	0.5969	6.6875	91.81	8.19	263	168	20	451	8.54	91.46	
	média	5.7124	0.5099	5.2025	90.89	9.11	214	140	16	370	8.83	91.17	
	CV												

Apêndice 9. Teor de absorção dos macronutrientes (g Kg⁻¹) e micronutrientes (mg Kg⁻¹) constituintes da matéria seca da planta sob o efeito do tratamento 7,5 mM de Cálcio determinados nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo.

PC	REP.	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Enxofre	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
					g Kg ⁻¹					mg Kg ⁻¹		
7	a	39.76	5.297	41.28	13.06	6.02	3.457	20.6184	15	301	134	74
	b	40.32	5.489	39.5	11.68	5.28	3.411	20.6184	18	325	126	73
	c	40.18	5.345	39.62	11.86	5.5	3.365	22.4463	16	312	131	74
	d	40.46	5.393	40.02	11.94	5.76	3.434	20.6184	17	317	128	72
	média	40.1800	5.3810	40.1050	12.14	5.64	3.417	21.0754	17	314	129.75	73.25
	CV											
14	a	36.12	5.057	46.68	14.86	5.78	3.917	20.0091	18	173	136	75
	b	31.08	5.057	44.06	15.04	5.56	3.687	21.2277	18	208	141	74
	c	35.14	4.817	41.22	15.76	5.64	3.043	20.6184	17	258	137	68
	d	32.76	4.937	42.14	15.26	5.68	3.572	21.2277	17	213	139	74
	média	33.7750	4.9670	43.5250	15.23	5.67	3.555	20.7707	18	213	138.25	72.75
	CV											
21	a	32.62	3.449	37.62	8.42	4.86	3.089	28.5393	16	242	128	67
	b	30.66	3.569	40.86	9.94	4.84	3.457	28.5393	18	284	134	66
	c	31.08	3.401	34.12	8.52	4.52	3.503	28.5393	16	230	132	68
	d	30.59	3.545	38.52	8.74	4.6	3.457	28.5393	17	212	132	68
	média	31.2375	3.4910	37.7800	8.91	4.71	3.377	28.5393	17	242	131.50	67.25
	CV											
28	a	27.44	4.145	36.38	12.78	4.64	3.135	27.3207	15	219	148	72
	b	27.02	4.169	33.92	14.84	4.96	3.135	21.837	15	348	176	39
	c	28.35	4.001	30.94	13.66	4.5	3.457	21.837	15	333	168	45
	d	28.42	3.881	31.3	13.14	4.86	3.135	21.837	17	292	149	37
	média	27.8075	4.0490	33.1350	13.61	4.74	3.216	23.2079	16	298	160.25	48.25
	CV											
35	a	30.1	4.409	35.24	11.66	4.62	2.675	26.1021	16	259	140	45
	b	28.84	4.097	32.76	15.46	4.8	2.859	24.2742	14	333	157	36
	c	29.82	4.145	34.46	12.8	4.76	2.675	22.4463	17	294	147	44
	d	28.42	4.025	29.32	15.14	4.8	3.181	26.1021	13	317	164	39
	média	29.2950	4.1690	32.9450	13.77	4.75	2.848	24.7312	15	301	152.00	41.00
	CV											

Apêndice 10. Peso das matérias frescas e seca (g), massa de água na matéria fresca (g), porcentagens de água e sólidos, número de gemas por classe de altura e total, porcentagens totais dos nutrientes minerais analisados e do conjunto CHO e outros nutrientes constituintes da planta, nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo para o tratamento 10,0 mM de Cálcio.

PC	REP.	PMF	PMS g Kg	H ₂ O	H ₂ O %	Sólidos %	Número de Gemas				TOT	Nutrientes % Total	CHO e outros
							C I	C II	C III				
7	a	2.2866	0.181	2.1056	92.08	7.92	16	19	19	54	10.17	89.83	
	b	2.6545	0.1937	2.4608	92.70	7.30	18	21	19	58	10.20	89.80	
	c	2.9707	0.231	2.7397	92.22	7.78	22	25	23	70	11.04	88.96	
	d	1.3193	0.1078	1.2115	91.83	8.17	9	11	12	32	10.20	89.80	
	média	2.3078	0.1784	2.1294	92.21	7.79	16	19	18	54	10.40	89.60	
	CV												
14	a	3.084	0.254	2.83	91.76	8.24	50	43	20	113	10.65	89.35	
	b	2.2706	0.2252	2.0454	90.08	9.92	45	38	17	100	10.74	89.26	
	c	2.6506	0.2552	2.3954	90.37	9.63	51	44	19	114	11.08	88.92	
	d	4.0688	0.3281	3.7407	91.94	8.06	66	55	26	147	10.88	89.12	
	média	3.0185	0.2656	2.7529	91.04	8.96	53	45	21	119	10.84	89.16	
	CV												
21	a	7.6713	0.5406	7.1307	92.95	7.05	769	169	8	946	9.69	90.31	
	b	7.8278	0.516	7.3118	93.41	6.59	734	165	6	907	9.63	90.37	
	c	8.57	0.6385	7.9315	92.55	7.45	909	209	8	1126	9.63	90.37	
	d	8.7182	0.6221	8.0961	92.86	7.14	884	199	8	1093	9.79	90.21	
	média	8.1968	0.5793	7.6175	92.94	7.06	824	186	8	1018	9.68	90.32	
	CV												
28	a	3.3538	0.358	2.9958	89.33	10.67	115	54	8	177	8.19	91.81	
	b	4.166	0.4719	3.6941	88.67	11.33	152	71	10	233	8.25	91.75	
	c	4.9092	0.5543	4.3549	88.71	11.29	177	82	12	271	8.16	91.84	
	d	5.7715	0.5854	5.1861	89.86	10.14	188	88	13	289	8.74	91.26	
	média	4.5501	0.4924	4.0577	89.14	10.86	158	74	11	243	8.34	91.66	
	CV												
35	a	6.3416	0.6046	5.737	90.47	9.53	404	142	25	571	8.67	91.33	
	b	7.3857	0.5984	6.7873	91.90	8.10	382	135	24	541	8.69	91.31	
	c	4.9436	0.4917	4.4519	90.05	9.95	295	103	21	419	8.44	91.56	
	d	6.5062	0.6533	5.8529	89.96	10.04	417	146	28	591	8.69	91.31	
	média	6.2943	0.5870	5.7073	90.59	9.41	375	132	25	531	8.62	91.38	
	CV												

Apêndice 11. Teor de absorção dos macronutrientes (g Kg⁻¹) e micronutrientes (mg Kg⁻¹) constituintes da matéria seca da planta sob o efeito do tratamento 10,0 mM de Cálcio determinados nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo.

PC	REP.	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Enxofre	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
g Kg ⁻¹												
7	a	37.66	5.68	38.60	12.64	2.66	3.96	23.06	15	307	120	74
	b	38.08	5.49	38.22	12.60	2.96	4.15	21.84	16	301	125	75
	c	38.36	5.54	41.42	15.02	4.98	4.56	23.06	15	294	131	78
	d	37.80	5.44	38.34	12.84	2.76	4.29	21.84	15	297	127	76
	média	37.98	5.54	39.15	13.28	3.34	4.24	22.45	15.25	299.75	125.75	75.75
	CV											
14	a	35.84	5.06	39.96	15.92	5.16	4.08	20.62	16	259	126	74
	b	36.40	5.15	40.12	16.06	4.98	4.15	20.62	16	263	128	74
	c	37.24	5.11	41.80	16.58	5.30	4.29	22.45	15	275	125	73
	d	38.22	5.20	40.52	15.10	5.20	4.10	20.62	17	248	122	75
	média	36.93	5.13	40.60	15.92	5.16	4.15	21.08	16.00	261.25	125.25	74.00
	CV											
21	a	30.24	3.31	45.44	8.40	4.82	4.19	26.10	16	236	121	64
	b	29.96	3.26	45.20	8.20	5.12	4.15	26.10	15	230	118	67
	c	29.82	3.26	45.56	8.64	4.56	4.01	26.10	15	218	114	65
	d	30.38	3.19	46.64	9.08	4.60	3.55	25.49	15	202	118	63
	média	30.10	3.25	45.71	8.58	4.78	3.97	25.95	15.25	221.50	117.75	64.75
	CV											
28	a	23.87	4.17	31.40	14.00	4.72	3.14	21.84	16	380	136	41
	b	23.52	4.17	29.62	16.50	4.80	3.41	22.45	15	294	149	37
	c	23.66	4.19	30.16	14.92	4.78	3.37	21.84	16	333	152	38
	d	23.80	4.24	32.94	17.44	4.66	3.69	22.45	15	356	164	36
	média	23.71	4.19	31.03	15.72	4.74	3.40	22.14	15.50	340.75	150.25	38.00
	CV											
35	a	25.62	4.22	29.34	18.72	4.34	3.96	20.01	16	273	171	44
	b	26.04	4.15	33.00	15.34	4.72	3.23	20.01	18	225	143	48
	c	24.36	4.10	31.36	16.04	4.40	3.64	20.01	17	250	161	44
	d	24.92	3.93	33.38	15.76	4.30	4.10	21.23	16	269	176	41
	média	25.24	4.10	31.77	16.47	4.44	3.73	20.31	16.75	254.25	162.75	44.25
	CV											

Apêndice 13. Teor de absorção dos macronutrientes (g Kg⁻¹) e micronutrientes (mg Kg⁻¹) constituintes da matéria seca da planta sob o efeito do tratamento 15,0 mM de Cálcio determinados nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo.

PC	REP.	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Enxofre	Boro	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
					g Kg ⁻¹					mg Kg ⁻¹		
7	a	32.90	5.30	40.60	19.06	4.18	4.285	19.40	15	330	102	70
	b	32.76	5.83	39.54	15.40	5.14	4.10	20.01	14	260	67	75
	c	36.26	5.44	40.16	16.46	4.64	4.06	19.40	15	318	68	73
	d	32.06	5.78	39.96	15.98	4.36	4.15	19.40	14	288	72	70
	média	33.50	5.59	40.07	16.73	4.58	4.15	19.55	14.50	299.00	77.25	72
	CV											
14	a	30.80	5.06	39.82	16.14	4.66	3.41	20.01	14	321	67	73
	b	31.50	4.82	40.02	16.62	4.80	3.64	20.01	14	300	70	72
	c	28.14	5.06	38.44	17.06	4.42	3.69	18.79	15	295	73	71
	d	30.24	5.06	40.22	19.28	4.56	3.78	18.79	16	275	89	70
	média	30.17	5.00	39.63	17.28	4.61	3.63	19.40	14.75	297.75	74.75	72
	CV											
21	a	27.86	3.31	34.84	8.32	4.22	3.64	24.27	14	260	96	35
	b	30.66	3.23	35.98	7.18	4.64	4.24	24.88	14	234	116	43
	c	27.16	2.97	34.60	7.48	4.82	4.01	24.88	14	222	100	36
	d	29.40	3.71	41.12	8.88	4.36	3.64	25.49	17	236	133	43
	média	28.77	3.31	36.64	7.97	4.51	3.88	24.88	14.75	238.00	111.25	39
	CV											
28	a	24.64	3.76	29.48	24.26	4.38	4.19	16.96	14	350	140	38
	b	24.50	3.86	28.22	22.42	4.30	4.06	18.79	16	360	131	37
	c	24.36	3.76	29.80	25.84	4.40	4.10	18.18	14	299	147	42
	d	24.29	3.76	29.36	23.22	4.06	3.83	17.57	14	268	122	35
	média	24.45	3.79	29.22	23.94	4.29	4.04	17.88	14.50	319.25	135.00	38
	CV											
35	a	24.36	4.48	34.28	23.56	4.32	3.69	20.01	16	328	157	47
	b	25.06	4.46	37.52	18.90	4.24	3.14	23.06	17	299	106	50
	c	24.78	3.86	26.98	24.16	4.46	4.33	20.62	15	372	166	47
	d	25.20	4.22	32.52	21.60	3.98	3.60	20.62	16	209	134	46
	média	24.85	4.25	32.83	22.06	4.25	3.69	21.08	16.00	302.00	140.75	48
	CV											

Apêndice 14. Teste de comparação de médias, REGWF do programa estatístico SAS, para os resultados do peso da matéria seca, número de gemas (classe II), teor de absorção do cálcio, nitrogênio, fósforo e potássio, nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo (P.C.) entre os tratamentos 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mM de cálcio.

P. C.	Trat.	PMS	Trat.	Nº Gemas	Trat.	Ca	Trat.	N	Trat.	P	Trat.	K
7 dias	15,0 mM	0,2656 a	5,0 mM *	36 a	15,0 mM	16,73 a	Ta (0,0)	51,21 a	Tb (2,5)	5,73 a	Tc (5,0) *	42,48 a
	0,0 mM	0,2371 a	15,0 mM	31 ab	10,0 mM	13,28 b	Tb (2,5)	47,51 b	15,0 mM	5,59 a	7,5 mM	40,11 b
	7,5 mM	0,2362 a	7,5 mM	29 ab	7,5 mM	12,14 b	7,5 mM	40,18 c	10,0 mM	5,54 a	15,0 mM	40,07 b
	2,5 mM	0,2109 a	2,5 mM	28 ab	5,0 mM *	9,00 c	Tc (5,0) *	39,73 c	Ta (0,0)	5,42 a	10,0 mM	39,15 b
	5,0 mM *	0,2012 a	0,0 mM	21 ab	2,5 mM	6,00 d	10,0 mM	37,98 c	7,5 mM	5,38 a	Ta (0,0)	36,45 c
	10,0 mM	0,1784 a	10,0 mM	19 b	0,0 mM	3,42 e	15,0 mM	33,50 d	Tc (5,0) *	5,35 a	Tb (2,5)	36,32 c
14 dias	7,5 mM	0,3593 a	15,0 mM	59 a	15,0 mM	17,28 a	Ta (0,0)	48,97 a	Tb (2,5)	5,49 a	Tb (2,5)	43,90 a
	15,0 mM	0,3186 a	5,0 mM *	56 a	10,0 mM	15,92 b	Tb (2,5)	47,65 a	Tc (5,0) *	5,37 ab	7,5 mM	43,53 ab
	10,0 mM	0,2656 a	10,0 mM	45 a	7,5 mM	15,23 b	Tc (5,0) *	40,90 b	Ta (0,0)	5,31 abc	Tc (5,0) *	40,70 abc
	0,0 mM	0,2630 a	7,5 mM	45 a	5,0 mM *	9,55 c	10,0 mM	36,93 c	10,0 mM	5,13 bcd	10,0 mM	40,60 bc
	2,5 mM	0,2507 a	2,5 mM	36 a	2,5 mM	4,23 d	7,5 mM	33,78 d	15,0 mM	5,00 cd	15,0 mM	39,63 c
	5,0 mM *	0,2140 a	0,0 mM	43 a	0,0 mM	1,62 e	15,0 mM	30,17 e	7,5 mM	4,97 d	Ta (0,0)	36,44 d
21 dias	10,0 mM	0,5793 a	10,0 mM	186 a	5,0 mM *	9,62 a	Ta (0,0)	46,22 a	Ta (0,0)	4,84 a	10,0 mM	45,71 a
	15,0 mM	0,5150 ab	15,0 mM	142 b	7,5 mM	8,91 ab	Tb (2,5)	36,40 b	Tb (2,5)	4,52 a	Tc (5,0) *	40,94 b
	7,5 mM	0,5036 abc	7,5 mM	125 bc	10,0 mM	8,58 ab	Tc (5,0) *	31,68 c	7,5 mM	3,49 b	Tb (2,5)	40,68 bc
	5,0 mM *	0,4739 abc	5,0 mM *	102 c	15,0 mM	7,97 b	7,5 mM	31,24 c	Tc (5,0) *	3,32 b	Ta (0,0)	38,32 bc
	2,5 mM	0,4161 bc	2,5 mM	89 c	2,5 mM	5,11 c	10,0 mM	30,10 c	15,0 mM	3,31 b	7,5 mM	37,78 bc
	0,0 mM	0,3745 c	0,0 mM	89 c	0,0 mM	1,46 d	15,0 mM	28,77 c	10,0 mM	3,25 b	15,0 mM	36,64 c
28 dias	15,0 mM	0,6761 a	15,0 mM	207 a	15,0 mM	23,94 a	Ta (0,0)	35,19 a	Tb (2,5)	4,45 a	Tc (5,0) *	33,27 a
	2,5 mM	0,6509 ab	0,0 mM	130 b	10,0 mM	15,72 b	Tb (2,5)	30,73 b	Tc (5,0) *	4,22 b	7,5 mM	33,14 a
	5,0 mM *	0,6255 ab	5,0 mM *	123 b	7,5 mM	13,61 c	Tc (5,0) *	28,00 c	Ta (0,0)	4,20 b	Tb (2,5)	33,04 ab
	0,0 mM	0,5720 ab	7,5 mM	117 b	5,0 mM *	9,42 d	7,5 mM	27,81 c	10,0 mM	4,19 b	Ta (0,0)	32,35 ab
	7,5 mM	0,5448 ab	2,5 mM	109 c	2,5 mM	5,88 e	15,0 mM	24,45 d	7,5 mM	4,05 b	10,0 mM	31,03 ab
	10,0 mM	0,4924 b	10,0 mM	74 d	0,0 mM	1,24 f	10,0 mM	23,71 d	15,0 mM	3,79 c	15,0 mM	29,22 b
35 dias	10,0 mM	0,5870 a	5,0 mM *	172 a	15,0 mM	22,06 a	Ta (0,0)	38,78 a	Tb (2,5)	4,57 a	Tb (2,5)	34,52 a
	5,0 mM *	0,5557 a	7,5 mM	140 ab	10,0 mM	16,47 b	Tb (2,5)	33,85 b	15,0 mM	4,25 ab	7,5 mM	32,95 a
	15,0 mM	0,5379 a	10,0 mM	132 abc	7,5 mM	13,77 c	7,5 mM	29,30 c	Ta (0,0)	4,24 b	15,0 mM	32,83 a
	7,5 mM	0,5099 a	15,0 mM	111 bcd	5,0 mM *	9,61 d	Tc (5,0) *	27,51 cd	7,5 mM	4,17 b	10,0 mM	31,77 a
	0,0 mM	0,4807 a	0,0 mM	85 cd	2,5 mM	4,49 e	10,0 mM	25,24 d	Tc (5,0) *	4,15 b	Ta (0,0)	31,76 a
	2,5 mM	0,4478 a	2,5 mM	76 d	0,0 mM	1,06 f	15,0 mM	24,85 d	10,0 mM	4,10 b	Tc (5,0) *	29,44 a

* Concentração padrão de cálcio do meio de cultura JADS (Correia, 1993), definido como tratamento testemunha.

** Variáveis que no período de cultivo apresentam para os seus tratamentos uma letra única, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Apêndice 15. Teste de comparação de médias, REGWF do programa estatístico SAS, para os resultados do teor de absorção do magnésio, enxofre, boro, ferro e manganês nos períodos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de cultivo (P.C.) entre os tratamentos, 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mM de Cálcio.

P.C.	Trat.	Mg	Trat.	S	Trat.	B	Trat.	Cu	Trat.	Fe	Trat.	Mn
7 dias	7,5 mM	5,64 a	0,0 mM	4,45 a	5,0 mM*	22,45 a	7,5 mM	16,50 a	2,5 mM	465,50 a	0,0 mM	148,00 a
	5,0 mM*	5,23 ab	5,0 mM*	4,27 ab	0,0 mM	22,45 a	0,0 mM	16,25 ab	0,0 mM	362,75 ab	7,5 mM	129,75 b
	15,0 mM	4,58 ab	10,0 mM	4,24 ab	10,0 mM	22,45 a	5,0 mM	15,75 ab	7,5 mM	313,75 b	10,0 mM	125,75 b
	2,5 mM	4,31 b	15,0 mM	4,15 ab	7,5 mM	21,08 b	10,0 mM	15,25 ab	10,0 mM	299,75 b	5,0 mM	121,25 b
	10,0 mM	3,34 c	2,5 mM	3,93 b	2,5 mM	19,86 c	2,5 mM	14,50 ab	15,0 mM	299,00 b	2,5 mM	119,75 b
	0,0 mM	3,05 c	7,5 mM	3,42 c	15,0 mM	19,55 c	15,0 mM	14,50 b	5,0 mM	255,00 b	15,0 mM	77,25 c
14 dias	5,0 mM*	5,83 a	0,0 mM	4,16 a	0,0 mM	24,88 a	7,5 mM	17,50 a	0,0 mM	309,75 a	0,0 mM	147,50 a
	7,5 mM	5,67 a	10,0 mM	4,15 ab	5,0 mM*	23,06 ab	2,5 mM	16,25 ab	15,0 mM	297,75 a	7,5 mM	138,25 ab
	10,0 mM	5,16 b	2,5 mM	3,84 abc	2,5 mM	21,23 bc	10,0 mM	16,00 ab	5,0 mM	288,50 a	5,0 mM	137,75 b
	15,0 mM	4,61 c	5,0 mM*	3,81 bc	10,0 mM	21,08 bc	5,0 mM	16,00 ab	2,5 mM	286,25 a	2,5 mM	128,25 c
	2,5 mM	4,25 d	15,0 mM	3,63 c	7,5 mM	20,77 bc	0,0 mM	15,25 b	10,0 mM	261,25 a	10,0 mM	125,25 c
	0,0 mM	2,94 e	7,5 mM	3,55 c	15,0 mM	19,40 c	15,0 mM	14,75 b	7,5 mM	213,00 b	15,0 mM	74,75 d
21 dias	5,0 mM*	4,78 a	0,0 mM	4,19 a	2,5 mM	30,06 a	0,0 mM	17,25 a	0,0 mM	351,00 a	0,0 mM	182,00 a
	10,0 mM	4,78 a	10,0 mM	3,97 ab	5,0 mM*	29,61 a	7,5 mM	16,75 a	7,5 mM	242,00 b	2,5 mM	175,75 a
	7,5 mM	4,71 a	15,0 mM	3,88 abc	0,0 mM	28,69 a	2,5 mM	16,50 ab	5,0 mM	240,25 b	7,5 mM	131,50 b
	15,0 mM	4,51 a	2,5 mM	3,61 bc	7,5 mM	28,54 a	10,0 mM	15,25 abc	15,0 mM	238,00 b	10,0 mM	117,75 bc
	2,5 mM	4,52 a	5,0 mM*	3,54 bc	10,0 mM	25,95 b	15,0 mM	14,75 bc	2,5 mM	235,50 b	15,0 mM	111,25 c
	0,0 mM	3,45 b	7,5 mM	3,38 c	15,0 mM	24,88 b	5,0 mM	14,00 c	10,0 mM	221,50 b	5,0 mM	104,00 c
28 dias	10,0 mM	4,74 a	0,0 mM	4,08 a	2,5 mM	25,19 a	0,0 mM	15,75 a	2,5 mM	387,75 a	2,5 mM	194,50 a
	7,5 mM	4,74 a	15,0 mM	4,04 ab	7,5 mM	23,21 ab	10,0 mM	15,50 a	0,0 mM	373,25 a	5,0 mM	173,50 b
	15,0 mM	4,29 b	5,0 mM*	3,78 ab	5,0 mM*	23,06 ab	7,5 mM	15,50 a	5,0 mM	370,00 a	0,0 mM	164,75 bc
	5,0 mM*	4,28 b	2,5 mM	3,72 bc	10,0 mM	22,14 ab	5,0 mM	14,75 a	10,0 mM	340,75 a	7,5 mM	160,25 bc
	2,5 mM	4,10 b	10,0 mM	3,40 cd	0,0 mM	20,62 b	2,5 mM	14,50 a	15,0 mM	319,25 a	10,0 mM	150,25 cd
	0,0 mM	2,58 c	7,5 mM	3,22 d	15,0 mM	17,88 c	15,0 mM	14,50 a	7,5 mM	298,00 a	15,0 mM	135,00 d
35 dias	7,5 mM	4,75 a	10,0 mM	3,73 a	7,5 mM	24,73 a	10,0 mM	16,75 a	2,5 mM	378,50 a	0,0 mM	183,75 a
	10,0 mM	4,44 a	0,0 mM	3,69 a	5,0 mM*	22,45 ab	15,0 mM	16,00 a	5,0 mM	372,50 a	2,5 mM	172,00 ab
	15,0 mM	4,25 a	15,0 mM	3,69 a	2,5 mM	22,14 ab	2,5 mM	15,75 a	0,0 mM	338,00 ab	5,0 mM	169,25 ab
	2,5 mM	4,20 a	5,0 mM*	3,23 ab	15,0 mM	21,08 b	0,0 mM	15,75 a	15,0 mM	302,00 ab	10,0 mM	162,75 ab
	5,0 mM*	4,19 a	2,5 mM	2,93 b	0,0 mM	20,47 b	5,0 mM	15,25 a	7,5 mM	300,75 ab	7,5 mM	152,00 ab
	0,0 mM	3,20 b	7,5 mM	2,85 b	10,0 mM	20,31 b	7,5 mM	15,00 a	10,0 mM	254,25 b	15,0 mM	140,75 b

* Concentração padrão de cálcio do meio de cultura JADS (Correia, 1993), definido como tratamento testemunha.

** Variáveis que no período de cultivo apresentam para os seus tratamentos uma letra única, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Apêndice 18. Distribuição dos ligantes e suas formas de associação nos meios de cultura JADS (Correia, 1993) com 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mM de Ca pelo uso do programa Geochem.

Metais	Formas	0,0 mM	2,5 mM	5,0 mM	7,5 mM	10,0 mM	15,0 mM
		%					
Ca²⁺	Livre	*	79.4	81.1	82.1	82.6	83.5
	SO ₄ ²⁻	*	10.8	9.5	8.3	7.5	6.2
	Cl ⁻	*	*	0.1	0.7	1.4	2.7
	PO ₄ ³⁻	*	5.3	5.1	4.7	4.3	3.8
	NO ₃ ⁻	*	4.5	4.2	4.1	4	3.7
Mg²⁺	Livre	81.4	83.1	84.6	85.5	86.1	86.9
	SO ₄ ²⁻	10.2	9	7.8	6.9	6.2	5.1
	Cl ⁻	*	*	0.1	0.6	1.2	2.2
	PO ₄ ³⁻	7.4	6.9	6.6	6.1	5.6	4.9
	NO ₃ ⁻	1	1	1	0.9	0.9	0.8
K⁺	Livre	97.4	97.6	97.7	97.7	97.6	97.5
	SO ₄ ²⁻	1.2	1.1	1	0.9	0.8	0.7
	Cl ⁻	*	*	*	0.2	0.3	0.7
	PO ₄ ³⁻	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
	NO ₃ ⁻	1	1	1	1	0.9	0.9
Na²⁺	Livre	97.4	97.6	97.8	97.7	97.6	97.3
	SO ₄ ²⁻	1.8	1.7	1.5	1.3	1.3	1.1
	Cl ⁻	*	*	*	0.3	0.5	1
	PO ₄ ³⁻	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2
	NO ₃ ⁻	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Fe²⁺	Livre	17.6	18.6	19.6	20.5	21.4	23
	SO ₄ ²⁻	2.2	2	1.8	1.7	1.6	1.4
	EDTA ⁴⁻	64.6	64.2	63.8	63.5	63.1	62.6
	PO ₄ ³⁻	15.2	14.8	14.5	14	13.4	12.5
	NO ₃ ⁻	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	Cl ⁻	*	*	*	*	*	0.2
Mn²⁺	Livre	34.8	36.5	38	39.5	40.9	43.1
	SO ₄ ²⁻	5.5	5	4.4	4	3.7	3.2
	EDTA ⁴⁻	51	50.2	49.4	48.6	48	46.6
	PO ₄ ³⁻	7.9	7.6	7.4	7.1	6.5	6.1
	NO ₃ ⁻	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
	Cl ⁻	*	*	*	*	0.2	0.3
Cu²⁺	EDTA ⁴⁻	100	100	100	100	100	100
Zn²⁺	EDTA ⁴⁻	100	100	100	100	100	100
Co²⁺	Livre	0.3	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4
	EDTA ⁴⁻	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6

Apêndice 19. Comparação entre o tratamento testemunha (5,0mM de Ca) com os tratamentos 0,0; 2,5; 7,5 e 10,0 e 15,0 mM de Ca em relação a seus ligantes e suas formas de associação.

Metais	Forma	0,0 mM	2,5 mM	7,5 mM	10,0 mM	15 mM
Ca²⁺	Livre	*	-1.7	1	1.5	2.4
	SO ₄ ²⁻	*	1.3	-1.2	-2	-3.3
	Cl ⁻	*	-0.1	0.6	1.3	2.6
	PO ₄ ³⁻	*	0.2	-0.4	-0.8	-1.3
	NO ₃ ⁻	*	0.3	-0.1	-0.2	-0.5
Mg²⁺	Livre	-3.2	-1.5	0.9	1.5	2.3
	SO ₄ ²⁻	2.4	1.2	-0.9	-1.6	-2.7
	Cl ⁻	-0.1	-0.1	0.5	1.1	2.1
	PO ₄ ³⁻	0.8	0.3	-0.5	-1	-1.7
	NO ₃ ⁻	*	*	-0.1	-0.1	-0.2
K⁺	Livre	-0.3	-0.1	0	-0.1	-0.2
	SO ₄ ²⁻	0.2	0.1	-0.1	-0.2	-0.3
	Cl ⁻	*	*	0.2	0.3	0.7
	PO ₄ ³⁻	*	*	*	*	-0.1
	NO ₃ ⁻	*	*	*	-0.1	-0.1
Na²⁺	Livre	-0.4	-0.2	-0.1	-0.2	-0.5
	SO ₄ ²⁻	0.3	0.2	-0.2	-0.2	-0.4
	Cl ⁻	*	*	0.3	0.5	1
	PO ₄ ³⁻	*	*	*	*	-0.1
	NO ₃ ⁻	*	*	*	*	*
Fe²⁺	Livre	-2	-1	0.9	1.8	3.4
	SO ₄ ²⁻	0.4	0.2	-0.1	-0.2	-0.4
	EDTA ⁴⁻	0.8	0.4	-0.3	-0.7	-1.2
	PO ₄ ³⁻	0.7	0.3	-0.5	-1.1	-2
	NO ₃ ⁻	*	*	*	*	*
	Cl ⁻	*	*	*	*	0.2
Mn²⁺	Livre	-3.2	-1.5	1.5	2.9	5.1
	SO ₄ ²⁻	1.1	0.6	-0.4	-0.7	-1.2
	EDTA ⁴⁻	1.6	0.8	-0.8	-1.4	-2.8
	PO ₄ ³⁻	0.5	0.2	-0.3	-0.9	-1.3
	NO ₃ ⁻	*	*	*	*	*
	Cl ⁻	*	*	*	0.2	0.3
Cu²⁺	EDTA ⁴⁻	*	*	*	*	*
Zn²⁺	EDTA ⁴⁻	*	*	*	*	*
Co²⁺	Livre	-0.1	-0.1	-0.1	-0.1	*
	EDTA ⁴⁻	*	*	*	*	*

Apêndice 20. Distribuição dos ligantes e suas formas de associação nos meios de cultura JADS (Correia, 1993) com 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 15,0 mM de Ca pelo uso do programa Geochem.

Ligantes	Formas	0,0 mM	2,5 mM	5,0 mM	7,5 mM	10,0 mM	15,0 mM
		%					
SO ₄ ²⁻	Livre	86.4	80	75.4	71.9	69.1	64.9
	Ca ²⁺	0	8	14	18.7	22.2	27.8
	Mg ²⁺	9.1	8	7	6.1	5.6	4.6
	K ⁺	4	3.6	3.2	2.9	2.7	2.4
	Na ⁺	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
	Fe ²⁺	0.1	0.1	0.1	0	0	0
	Mn ²⁺	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0
Cl ⁻	Livre	99.2	98.8	98.5	98.1	97.8	97.3
	Ca ²⁺	0	0.4	0.7	1.1	1.4	2
	Mg ²⁺	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3
	K ⁺	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
NH ₃ ⁻	H ⁺	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
PO ₄ ³⁻	Ca ²⁺	0	4.4	8.4	11.8	14.3	19.1
	Mg ²⁺	7.4	6.9	6.6	6.1	5.6	4.9
	K ⁺	1.2	1.1	1.1	1	1	0.9
	Fe ²⁺	1	1	1	0.9	0.9	0.8
	Mn ²⁺	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2
	H ⁺	90	86.2	82.7	79.8	78	74.1
EDTA ⁴⁻	Ca ²⁺	0	0.8	1.6	2.4	3	4.2
	Fe ²⁺	64.6	64.2	63.8	63.5	63.1	62.6
	Mn ²⁺	25	24.6	24.2	23.8	23.5	22.8
	Cu	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	Zn	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	Co	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
B(OH) ₄ ⁻	H ⁺	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8
MoO ₄ ²⁻	Livre	23.1	2.8	1.6	1.2	1	0.7
	Ca ²⁺	0	88.3	93.7	95.7	96.6	97.7
	Mg ²⁺	76.5	8.8	4.7	3.2	2.4	1.6
	H ⁺	0.4	0	0	0	0	0
NO ₃ ⁻	Livre	99.3	98.8	98.4	98	97.6	96.9
	Ca ²⁺	0	0.5	1	1.4	1.8	2.6
	Mg ²⁺	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	K ⁺	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Apêndice 21. Comparação entre o tratamento testemunha (5,0mM de Ca) com os tratamentos 0,0; 2,5; 7,5 e 10,0 e 15,0 mM de Ca em relação a seus ligantes e suas formas de associação.

Ligantes	Formas	0,0 mM	2,5 mM	7,5 mM	10,0 mM	15 mM
SO ₄ ²⁻	Livre	11	4,6	-3,5	-6,3	-10,5
	Ca ²⁺	-14	-6	4,7	8,2	13,8
	Mg ²⁺	2,1	1	-0,9	-1,4	-2,4
	K ⁺	0,8	0,4	-0,3	-0,5	-0,8
	Na ⁺	*	*	*	*	-0,1
	Fe ²⁺	*	*	-0,1	-0,1	-0,1
	Mn ²⁺	0,1	*	*	*	-0,1
Cl ⁻	Livre	0,7	0,3	-0,4	-0,7	-1,2
	Ca ²⁺	-0,7	-0,3	0,4	0,7	1,3
	Mg ²⁺	*	*	*	*	-0,1
	K ⁺	*	*	*	*	*
NH ₃ ⁻	H ⁺	*	*	*	*	*
PO ₄ ³⁻	Ca ²⁺	-8,4	-4	3,4	5,9	10,7
	Mg ²⁺	0,8	0,3	-0,5	-1	-1,7
	K ⁺	0,1	*	-0,1	-0,1	-0,2
	Fe ²⁺	*	*	-0,1	-0,1	-0,2
	Mn ²⁺	0,1	0,1	*	*	*
	H ⁺	7,3	3,5	2,0	4,7	3,0
EDTA ⁴⁻	Ca ²⁺	1,6	0,8	0,8	1,4	2,8
	Fe ²⁺	0,8	0,4	0,3	0,7	1,2
	Mn ²⁺	0,8	0,4	-0,4	-0,7	-1,4
	Cu	*	*	*	*	*
	Zn	*	*	*	*	*
	Co	*	*	*	*	*
B(OH) ₃	H ⁺	*	*	*	-0,1	-0,1
MnO ₄ ²⁻	Livre	21,5	12	-0,4	-0,6	-0,9
	Ca ²⁺	-43,7	-5,4	2	2,9	4
	Mg ²⁺	71,6	4,1	-1,6	-2,3	-3,1
	H ⁺	0,3	*	*	*	*
NO ₃ ⁻	Livre	0,0	0,4	-0,4	-0,0	-0,0
	Ca ²⁺	-1	-0,0	0,4	0,0	1,0
	Mg ²⁺	*	*	*	*	*
	K ⁺	*	*	*	*	*

Apêndice 22. Coeficientes de correlação para o peso da matéria seca, número de gemas e nutrientes minerais analisados no período de 21 dias para o tratamento de 7,5 mM de Cálcio.

PERÍODO 21 DIAS													
7,5 mM de Ca	PMS	Nº Gemas	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
PMS		0.99368	0.78474	-0.27305	0.10606	0.04338	0.78044	-0.75121	*	-0.19315	0.58762	-0.51992	-0.63334
Nº Gemas	0.99368		0.84796	-0.34881	0.02905	-0.06811	0.73900	-0.80146	*	-0.29462	0.49313	-0.60846	-0.54715
N	0.78474	0.84796		-0.55013	-0.23958	-0.55143	0.48129	-0.94189	*	-0.66286	-0.03383	-0.93527	-0.08366
P	-0.27305	-0.34881	-0.55013		0.92655	0.75863	0.36921	0.24661	*	0.92201	0.37592	0.54119	-0.50052
K	0.10606	0.02905	-0.23958	0.92655		0.77217	0.69133	-0.06766	*	0.85914	0.58869	0.32212	-0.74708
Ca	0.04338	-0.06811	-0.55143	0.75863	0.77217		0.42517	0.39530	*	0.94367	0.82223	0.75572	-0.78515
Mg	0.78044	0.73900	0.48129	0.36921	0.69133	0.42517		-0.66328	*	0.33637	0.70431	-0.27145	-0.86640
S	-0.75121	-0.80146	-0.94189	0.24661	-0.06766	0.39530	-0.66328		*	0.43589	-0.03118	0.90024	0.22833
B	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cu	-0.19315	-0.29462	-0.66286	0.92201	0.85914	0.94367	0.33637	0.43589	*		0.61451	0.76089	-0.63636
Fe	0.58762	0.49313	-0.03383	0.37592	0.58869	0.82223	0.70431	-0.03118	*	0.61451		0.36367	-0.95590
Mn	-0.51992	-0.60846	-0.93527	0.54119	0.32212	0.75572	-0.27145	0.90024	*	0.76089	0.36367		-0.20751
Zn	-0.63334	-0.54715	-0.08366	-0.50052	-0.74708	-0.78515	-0.86640	0.22833	*	-0.63636	-0.95590	-0.20751	

Coeficiente de Correlação*	
0,0 - 0,1	Não Significativo
0,1 - 0,5	Significativo (fraco)
0,5 - 0,7	Significativo (médio)
0,7 - 1,0	Significativo (forte)

* Coeficientes acrescidos de sinal negativo (-) representam relações inversamente proporcionais.

Apêndice 23. Coeficientes de correlação para o peso da matéria seca, número de gemas e nutrientes minerais analisados no período de 21 dias para o tratamento de 10,0 mM de Cálcio.

PERÍODO 21 DIAS													
10,0 mM de Ca	PMS	Nº Gemas	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
PMS		0.99288	-0.02490	-0.55355	0.64036	0.81941	-0.94557	-0.66983	-0.47465	-0.42918	-0.79146	-0.68128	-0.56333
Nº Gemas	0.99288		-0.13394	-0.54490	0.57367	0.76344	-0.90629	-0.62720	-0.41266	-0.50436	-0.77335	-0.76358	-0.46088
N	-0.02490	-0.13394		-0.35425	0.68701	0.52058	-0.15639	-0.54230	-0.73030	0.36515	-0.31646	0.69921	-0.74833
P	-0.55355	-0.54490	-0.35425		-0.84419	-0.79400	0.38717	0.94159	0.89930	0.72761	0.94319	0.32369	0.35504
K	0.64036	0.57367	0.68701	-0.84419		0.96364	-0.64829	-0.97308	-0.97208	-0.28222	-0.90100	-0.03821	-0.79870
Ca	0.81941	0.76344	0.52058	-0.79400	0.96364		-0.82097	-0.94379	-0.88004	-0.31682	-0.92698	-0.23899	-0.81417
Mg	-0.94557	-0.90629	-0.15639	0.38717	-0.64829	-0.82097		0.60158	0.45424	0.11680	0.67054	0.44959	0.75613
S	-0.66983	-0.62720	-0.54230	0.94159	-0.97308	-0.94379	0.60158		0.96405	0.49505	0.96753	0.20411	0.64840
B	-0.47465	-0.41266	-0.73030	0.88930	-0.97208	-0.88004	0.45424	0.96405		0.33333	0.86667	-0.05803	0.68313
Cu	-0.42918	-0.50436	0.36515	0.72761	-0.28222	-0.31682	0.11680	0.49505	0.33333		0.64444	0.75434	-0.29277
Fe	-0.79146	-0.77335	-0.31646	0.94319	-0.90100	-0.92698	0.67054	0.96753	0.86667	0.64444		0.44487	0.54000
Mn	-0.68128	-0.76358	0.69921	0.32369	-0.03821	-0.23899	0.44959	0.20411	-0.05803	0.75434	0.44487		-0.22085
Zn	-0.56333	-0.46088	-0.74833	0.35504	-0.79870	-0.81417	0.75613	0.64840	0.68313	-0.29277	0.54000	-0.22085	

Coeficiente de Correlação*	
0,0 - 0,1	Não Significativo
0,1 - 0,5	Significativo (fraco)
0,5 - 0,7	Significativo (médio)
0,7 - 1,0	Significativo (forte)

* Coeficientes acrescidos de sinal negativo (-) representam relações inversamente proporcionais.