DIAGNOSE DE DEFICIÊNCIA DE NUTRIENTES MINERAIS EM TRÊS
HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp. CULTIVADOS *in vitro*

EDSON NAMITA HIGASHI
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 1996

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

Higashi, Edson Namita

Diagnose de deficiência de nutrientes minerais em três híbridos
de *Eucalyptus* spp. cultivados *in vitro* / Edson Namita Higashi. - - Piracicaba, 1996.
85p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, 1996.
Bibliografia.

1. Eucalipto híbrido - Cultivo "*in vitro*" 2. Eucalipto híbrido - Deficiência
mineral - Análise I. Título

CDD 634.9734

DIAGNOSE DE DEFICIÊNCIA DE NUTRIENTES MINERAIS EM TRÊS
HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp. CULTIVADOS *in vitro*

EDSON NAMITA HIGASHI

Aprovada em: 24/04/1996

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves
Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodriguez
Prof. Dr. Marcílio de Almeida

ESALQ/USP
CENA/USP
ESALQ/USP

Prof. Dr. ANTONIO NATAL GONÇALVES
Orientador

**Aos meus pais Haruo e Aiko pelo apoio, respeito e dedicação de suas vidas na
minha formação pessoal**

Aos meus irmãos Jun e Hugo

DEDICO

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Antonio Natal Gonçalves pela orientação, estímulo e amizade, importantes na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli Rodrigues e ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida, pelas sugestões e críticas ao trabalho.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais da E.S.A. “Luiz de Queiroz”, por esta oportunidade de aprimoramento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de bolsa de estudo.

À Smithers-Oasis Company do Brasil, pela doação do OASIS Epuma Floral.

Ao técnico de laboratório, José Roberto Romanini, por todo auxílio prestado durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Paulo Pompermayer Neto, pela valiosa ajuda durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais e do IPEF, Alba V. Masseto, Creiza A. Rodrigues, Jefferson L. Polizel, José Amarildo da Fonseca, José Martins de Oliveira, Magali R. S. Martin, Margarete A. Z. Pinese, Maria A. R. C. Bermudez, Maria de Fátima D. Juliane, Marialice M. Poggiani, Milton C. Ribeiro, Paulo S. Beraldo, Rogério O. Naressi e Sueli Dressano, pela ajuda no decorrer do curso de Pós-Graduação.

Aos fotógrafos Beto Brussantin e Wesley Alisson, pela ajuda na produção do material fotográfico.

Aos pesquisadores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Denize A. Machado, Deoclides R. de Souza, Diva Correia, Domingos S. Macedo, Mirta N. Baez, Nadja Lepsch-Cunha, Fernando Scárdua, Francisco S. Arcova, Leila do Vale Monteiro, Marli J. Passos e Samir G. Rolim, pelo convívio, estímulo, entusiasmo, colaboração, amizade e aprendizado.

À amiga Yurika Helena Komatsu, pelo incentivo e colaboração.

À amiga Erika Laura Schloemp, pela sociedade, convívio e colaboração.

Às amigas Silvia Monteil Gomes e Teresinha Augusta Giustolin, pelo carinho, afeto, compreensão e companheirismo.

o autor reconhecidamente

agradece

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	xi
RESUMO	xii
SUMMARY.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Importância da nutrição mineral nas plantas	2
2.2. Função e sintomas de deficiências dos nutrientes minerais	4
2.2.1. Nitrogênio.....	5
2.2.2. Fósforo.....	8
2.2.3. Potássio.....	10
2.2.4. Cálcio.....	12
2.2.5. Magnésio.....	14
2.2.6. Enxofre.....	16
2.2.7. Ferro	17
2.2.8. Boro	18
2.2.9. Cobre	20
2.2.10. Zinco	21
2.2.11. Manganês	22
2.2.12. Cobalto.....	23
2.2.13. Molibdênio	23
2.3. Nutrição mineral <i>in vitro</i>	24

2.4.	Programa Geochem para o cálculo do equilíbrio químico do meio de cultura	27
3.	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1.	Material utilizado	29
3.2.	Explante-padrão e condições de crescimento das culturas	29
3.3.	Meio de cultura	29
3.4.	Descrições dos sintomas de deficiência	31
3.5.	Análise da concentração de nutrientes do material vegetal	31
3.6.	Análise do equilíbrio químico do meio de cultura	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.	Sintomas de deficiência	33
4.2.	Concentração de nutrientes nos híbridos de eucaliptos	54
4.3.	Equilíbrio químico dos meios de cultura.....	63
5.	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

Lista de Figuras

Figura 1. Sintomas de deficiência de nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), cálcio (-Ca), magnésio (-Mg) e enxofre (-S) apresentados pelo híbrido <i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> comparados com a testemunha (completo), após 21 dias de cultura.....	48
Figura 2. Sintomas de deficiência de ferro (-Fe), boro (-B), cobre (-Cu), zinco (-Zn), manganês (-Mn), cobalto (-Co) e molibdênio (-Mo) apresentados pelo híbrido <i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> comparados com a testemunha (completo), após 21 dias de cultura.....	49
Figura 3. Sintomas de deficiência de nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), cálcio (-Ca), magnésio (-Mg) e enxofre (-S) apresentados pelo híbrido <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> comparados com a testemunha (completo), após 21 dias de cultura.....	50
Figura 4. Sintomas de deficiência de ferro (-Fe), boro (-B), cobre (-Cu), zinco (-Zn), manganês (-Mn), cobalto (-Co) e molibdênio (-Mo) apresentados pelo híbrido <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> comparados com a testemunha (completo), após 21 dias de cultura.....	51
Figura 5. Sintomas de deficiência de nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), cálcio (-Ca), magnésio (-Mg) e enxofre (-S) apresentados pelo híbrido <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> comparados com a testemunha (completo), após 21 dias de cultura.....	52
Figura 6. Sintomas de deficiência de ferro (-Fe), boro (-B), cobre (-Cu), zinco (-Zn), manganês (-Mn), cobalto (-Co) e molibdênio (-Mo) apresentados pelo híbrido <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> comparados com a testemunha (completo), após 21 dias de cultura.....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Diferentes características entre a distribuição dos sintomas visíveis de deficiência e o grau de remobilização.....	5
Tabela 2. Composição dos nutrientes dos meios de cultura JADS (CORREIA, 1993) completo e com ausência dos macro e micronutrientes.....	32
Tabela 3. Sintomas de deficiência de nitrogênio para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de nitrogênio, durante 21 dias de cultura.....	34
Tabela 4. Sintomas de deficiência de fósforo para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de fósforo, durante 21 dias de cultura.....	35
Tabela 5. Sintomas de deficiência de potássio para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de potássio, durante 21 dias de cultura.....	36
Tabela 6. Sintomas de deficiência de cálcio para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de cálcio, durante 21 dias de cultura.....	37
Tabela 7. Sintomas de deficiência de magnésio para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de magnésio, durante 21 dias de cultura.....	38
Tabela 8. Sintomas de deficiência de enxofre para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de enxofre, durante 21 dias de cultura.....	39

Tabela 9. Sintomas de deficiência de ferro para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de ferro, durante 21 dias de cultura.....	40
Tabela 10. Sintomas de deficiência de boro para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de boro, durante 21 dias de cultura.....	41
Tabela 11. Sintomas de deficiência de cobre para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de cobre, durante 21 dias de cultura.....	42
Tabela 12. Sintomas de deficiência de zinco para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de zinco, durante 21 dias de cultura.....	43
Tabela 13. Sintomas de deficiência de manganês para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de manganês, durante 21 dias de cultura.....	44
Tabela 14. Sintomas de deficiência de cobalto para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de cobalto, durante 21 dias de cultura.....	45
Tabela 15. Sintomas de deficiência de molibdênio para os híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de molibdênio, durante 21 dias de cultura.....	46

Tabela 16. Comportamento dos elementos minerais no material vegetal do híbrido <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. tereticornis</i> , cultivados em meios de cultura deficientes em relação ao meio JADS completo, após 21 dias de cultura	54
Tabela 17. Comportamento dos elementos minerais no material vegetal do híbrido <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>E. urophylla</i> , cultivados em meios de cultura deficientes em relação ao meio JADS completo, após 21 dias de cultura	55
Tabela 18. Comportamento dos elementos minerais no material vegetal do híbrido <i>Eucalyptus urophylla</i> x <i>E. grandis</i> , cultivados em meios de cultura deficientes em relação ao meio JADS completo, após 21 dias de cultura	56
Tabela 19. Interação entre os elementos no processo de absorção (+ aumento, - diminuição)	59
Tabela 20. Concentração dos elementos minerais do material vegetal dos híbridos <i>Eucalyptus grandis</i> x <i>e. tereticornis</i> , <i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i> e <i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i> , após 21 dias de cultivo	61
Tabela 21. Distribuição primária dos metais e ligantes dos meios de cultura JADS (CORREIA, 1993) completo e na ausência de macro e micronutrientes, através do programa Geochem	65
Tabela 22. Distribuição primária de metais e ligantes dos meios de cultura JADS (CORREIA, 1993) completo e na ausência de macro e micronutrientes, através do programa Geochem, em mM	70
Tabela 23. Comparação da distribuição dos metais e ligantes dos tratamentos com deficiência em relação ao meio JADS (CORREIA, 1993) completo	76
Tabela 24. Acúmulo (+) ou redução (-) induzido da interação dos nutrientes do material vegetal e do meio de cultura sob condições de deficiência	80

Lista de Abreviaturas

BA	:	6 - Benzilaminopurina
ANA	:	Ácido naftalenoacético
MS	:	Meio de cultura de Murashigue & Skoog (1962)
2,4-D	:	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	:	Ácido indol acético

DIAGNOSE DE DEFICIÊNCIA DE NUTRIENTES MINERAIS EM TRÊS HÍBRIDOS DE *Eucalyptus* spp. CULTIVADOS *in vitro*

Autor: Edson Namita Higashi

Orientador: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: 1) propor uma metodologia de avaliação do meio de cultura para multiplicação de gemas de *Eucalyptus* spp.; 2) descrever sintomas de deficiência de nutrientes minerais *in vitro*; e 3) diagnosticar o equilíbrio químico do meio de cultura, através do programa Geochem (MATTIGOD & SPOSITO, 1979).

Os híbridos utilizados no trabalho foram obtidos de material originário do trabalho de CORREIA (1993): *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*.

O meio de cultura líquido utilizado foi o JADS, citado por CORREIA (1993). O experimento foi instalado com delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 15 repetições para cada híbrido/tratamento. A duração do experimento foi de 21 dias, com avaliações a cada 7 dias. Os tratamentos do experimento foram: a) meio completo; b) sem N, sem P, c) sem K, e) sem Ca, f) sem Mg, g) sem S, h) sem Fe, i) sem B, j) sem Cu, k) sem Zn, l) sem Mn, m) sem Co e n) sem Mo. Foi suplementado em todos os tratamentos 0,2 mg/l de BA, 0,1 mg/l de ANA e 30 g/l de sacarose. O pH do meio foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$, antes da autoclavagem. As culturas foram mantidas sob temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e iluminância de 1000 lux.

Pela análise dos resultados obtidos pode-se concluir que:

A análise do balanço químico do meio de cultura e das concentrações dos nutrientes no material vegetal mostraram as diferentes exigências nutricionais para cada híbrido.

Os híbridos se comportaram de maneira diferenciada à deficiência de nutrientes comprovando que a absorção depende não somente da relação e/ou interação dos nutrientes, mas também dos fatores genéticos.

Esta metodologia apresentou respostas mais rápidas e típicas na diagnose e avaliação das deficiências quando comparados com experimentos *ex vitro*.

Muitos sintomas de deficiência *in vitro* foram novos em relação aos sintomas descritos nas condições *ex vitro*.

A ausência de alguns elementos no meio de cultura não provocou sintomas de deficiência marcantes. Isto ocorreu em relação à maioria dos micronutrientes. Por outro lado, deficiências de N, Ca, S, Fe e Zn apresentaram sintomas semelhantes nos 3 híbridos.

Através da comparação dos resultados das interações das concentrações dos nutrientes do material vegetal com as análises do programa Geochem, modelo teórico, foi possível constatar o acúmulo ou diminuição dos nutrientes na planta, diagnosticando-se a sua demanda e eficiência nutricional.

DIAGNOSIS OF MINERAL NUTRIENT DEFICIENCY IN THREE

Eucalyptus spp. HYBRIDS CULTIVATED *in vitro*

Author: Edson Namita Higashi

Advisor: Prof. Dr. Antonio Natal Gonçalves

SUMMARY

The aims of this work were: 1) to propose a methodology to evaluate the culture medium for *Eucalyptus* spp. shoot multiplication; 2) to describe the symptoms of *in vitro* mineral nutrient deficiency; and 3) to diagnose the chemical equilibrium of the culture medium making use of the Geochem program (MATTIGOD & SPOSITO, 1979).

The eucalyptus hybrids used in this work were originally obtained from experiments installed by CORREIA (1993): *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*.

The liquid culture medium utilized was based on JADS, described by CORREIA (1993). The statistical design used was completely randomized with 15 replicates for each hybrid/treatment. The evaluations were made every 7 days for a period of 21 days. The treatments were: a) complete; b) without N, c) without P, d) without K, e) without Ca, f) without Mg, g) without S, h) without Fe, i) without B, j) without Cu, k) without Zn, l) without Mn, m) without Co and n) without Mo. All treatments were supplemented with: 0.2 mg/l BA; 0.1 mg/l NAA and 30 g/l sucrose. The pH was adjusted at 5.8 ± 0.1 before autoclaving. The cultures were maintained at $26 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 hours photoperiod at illuminance of 1000 lux.

The analysis of the results lead to the following conclusions:

The analysis of the chemical equilibrium of the culture medium and of the mineral nutrient content of the vegetative material showed the different mineral nutrient demand for each hybrid.

The hybrids behaved differently in relation to the mineral nutrient deficiencies showing that the absorption depends on both, the nutrients ratio and/or interactions, and the genetic background.

In the diagnosis and evaluation of mineral deficiencies, this methodology showed faster and more typical results when compared to experiments *ex vitro*.

Several deficiency symptoma observed *in vitro* were new in relation to those described under *ex vitro* conditions.

The absence of some mineral nutrients did not induce marked visual symptoms. This occurred for most micronutrients. However, the three hybrids showed similar symptoms for N, Ca, S, Fe and Zn deficiencies.

The comparison of the results from the interactions among the mineral nutrient contents of the vegetative material and of the Geochem program analysis, theoretical model, allowed to observe the increase or the reduction of the nutrient content in the plant, indicating its demand and nutritional efficiency.

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de cultura *in vitro* têm sido utilizadas na propagação de muitas espécies de interesse agrícola, ornamental e florestal, permitindo a produção de grande número de plantas geneticamente idênticas. Estas técnicas permitem também o rejuvenescimento, a eliminação de patógenos, a propagação massal e a seleção de matrizes (clones, espécies ou procedências) de valor econômico através da micropropagação.

A adequação do meio de cultura na tentativa de otimizar e maximizar a taxa de crescimento e desenvolvimento das plântulas através da avaliação do balanço químico do meio de cultura, da análise da concentração dos nutrientes minerais do material vegetal e da matéria seca produzida seria uma forma rápida para corrigir o desequilíbrio no meio de cultura.

A principal causa do desequilíbrio nutricional do meio de cultura seria observada pela diagnose no material vegetal apresentada pela deficiência e/ou excesso de nutrientes minerais, por estresse ambiental, pelos fatores genéticos e pela presença de patógenos, que induziriam uma redução da produção de matéria seca.

Estes estudos *in vitro* poderiam ser comparados e até simulados para as condições *ex vitro* (campo, casa-de-vegetação e estufas), como uma opção para a seleção de material genético, já que a técnica permite obter um número maior de plantas em período de tempo e espaço reduzidos, com ausência de contaminantes e maior controle ambiental sem a perda da fidelidade dos genótipos selecionados.

Visando desenvolver metodologias mais adequadas e específicas para o cultivo *in vitro* de espécies de eucalipto este trabalho tem por objetivos:

1. propor uma metodologia de avaliação do meio de cultura para multiplicação de gemas de *Eucalyptus* spp.;
2. descrever sintomas de deficiência de nutrientes minerais *in vitro* e;
3. diagnosticar o equilíbrio químico do meio de cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da nutrição mineral nas plantas

Os efeitos benéficos da adição de elementos minerais para melhorar o crescimento da planta têm sido conhecidos na agricultura a mais de 2000 anos. Experimentos no solo e na água foram feitos com plantas superiores para estabelecer essencialidades dos elementos minerais para o crescimento e desenvolvimento, e seu papel no metabolismo (LÄUCHLI & BIELESKI, 1983; MARSCHNER, 1986).

Entre os elementos essenciais para as plantas superiores estão os macronutrientes, carbono, hidrogênio e oxigênio, que são obtidos do dióxido de carbono e água; e nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio, cálcio e ferro que são obtidos do solo. Além desses, os micronutrientes, necessários para o crescimento da planta em quantidades muito pequenas são cobre, zinco, molibdênio, manganês, cobalto e boro. Contudo, existem elementos minerais que não satisfazem os critérios de essencialidade mas que estimulam o crescimento como sódio, sílica e vanádio (EPSTEIN, 1975; HEWITT & SMITH, 1974; LÄUCHLI & BIELESKI, 1983; MARSCHNER, 1986; MENGEL & KIRKBY, 1987).

Muitos fatores que afetam o crescimento de plantas *in vitro* são similares àqueles limitantes ao crescimento de plantas *in vivo* (LEIFERT *et al.*, 1991). Fatores que têm sido extensivamente estudados incluem reguladores de crescimento, luz, temperatura, pH, umidade e presença de microorganismos nocivos.

O efeito da concentração e composição dos nutrientes minerais e carboidratos nas culturas de tecidos de plantas são raramente investigados em detalhe (LEIFERT *et al.*, 1991).

A nutrição de plantas tem sido investigada com detalhes em relação às necessidades e às funções dos vários elementos minerais (EPSTEIN, 1975; MARSCHNER, 1986; MENGEL & KIRKBY, 1987). Segundo INGESTAD (1987), esses conhecimentos adquiridos não formulam respostas da planta para nutrição na generalização de termos e formas que possam ser usadas quantitativamente. Por outro lado, pesquisas de nutrição de plantas têm incluído vários experimentos de fertilização com a intenção de correlacionar a produção com a quantidade de fertilizantes adicionados. Embora os experimentos de fertilização sejam geralmente baseados nas experiências e nos métodos de diagnose para detectar desordens nutricionais (análises do solo e da planta e sintomas de deficiência), curvas de doses e produção têm sido

muito formuladas e modificadas (ÅGREN, 1985; INGESTAD & LUND, 1986; INGESTAD, 1979a, 1982, 1987, INGESTAD & McDONALD, 1989; INGESTAD & ÅGREN, 1995).

INGESTAD (1982) propôs que o fornecimento de nutrientes seja tratado como uma dinâmica variável que é relatada como taxa de crescimento relativo. O fator nutricional pode ser expresso como fluxo de densidade, ou seja, quantidade de nutrientes utilizados por unidade de tempo e unidade de área. Nutrientes podem ser fornecidos em quantidades exponencialmente elevadas (ou a uma constante taxa relativa de adição) equivalente à taxa relativa de crescimento, para manter constantes as taxas relativas de crescimento. Uma série de experimentos com *Betula pendula* Roth, *Alnus incana* Moench, e outras coníferas demonstraram que plântulas mantêm taxas constantes de crescimento exponencial para concentrações constantes internas de nutrientes, desde que a relativa taxa de adição de nutrientes seja constante (INGESTAD, 1979 a,b; 1981).

LEIFERT *et al.* (1991) observaram que pequeno aumento na taxa de crescimento pode muitas vezes determinar se uma certa espécie vegetal pode ser produzida a um preço competitivo. Essas pequenas diferenças podem ser obtidas otimizando-se a composição do meio, o que seria de grande importância comercial para a indústria da micropropagação. Os mesmos autores evidenciaram a necessidade de estudos sistemáticos envolvendo todos os macro e micronutrientes minerais e carboidratos, afirmando que somente através de análises conjuntas de nutrientes do meio de cultura e das plantas, associadas a ensaios empíricos, podem-se determinar os efeitos dos nutrientes individuais no crescimento da planta, o que possibilitaria um maior entendimento da nutrição da planta *in vitro*.

INGESTAD & ÅGREN (1992) propuseram método e modelo que usa fluxo de nutrientes como uma alternativa para concentração do meio para controle da nutrição mineral.

INGESTAD & ÅGREN (1995) definem como estado de equilíbrio dinâmico da planta quando as concentrações de nutrientes da planta permanecem constante sobre o tempo. O estado de equilíbrio dinâmico ("steady-state") é obtido quando a taxa de absorção relativa de nutrientes é controlada por uma taxa de adição relativa numericamente igual e constante. As plantas alcançam uma taxa de crescimento relativo estável, pela definição, igual à taxa relativa de absorção quando as concentrações de nutrientes internas são constantes, e os modelos/padrões de alocação também permaneceriam estáveis sobre o tempo. Segundo os mesmos autores, dois fatores determinam o crescimento e a nutrição de plantas: a) o transporte de massa, isto é, variável que expressa taxa de fluxo de carbono e nutrientes minerais, em relação ao tamanho da planta e suas exigências (taxa de adição relativa e absorção). Estes fatores influenciam a taxa de crescimento relativo ao mesmo tempo (lei do mínimo de Liebig); b) e os fatores que influenciariam o transporte de massa, isto é, recursos não elementares (como por

exemplo, luz, água, genoma, padrão de nutriente e temperatura). Estes dois fatores interagem em relações ortogonais mutuamente e podem ser normalizados quando os valores ótimos fossem conhecidos.

WILLIAMS (1991) afirma que a absorção de nutrientes minerais *in vitro* é afetada pela composição do meio, composição do tecido da planta e o ambiente da cultura. A definição adequada desses fatores seria o primeiro passo em direção ao desenvolvimento de um modelo para prognosticar adequada composição do meio, baseando-se nas análises de tecidos de plantas cultivados *in vivo*.

2.2. Funções e sintomas de deficiências dos nutrientes minerais

As principais funções dos nutrientes minerais, tais como nitrogênio, enxofre, e fósforo que servem como constituintes de proteínas e ácidos nucleicos são evidentes e amplamente descritas. Outros nutrientes minerais, tais como magnésio e os micronutrientes (exceto cloro), são constituintes de estruturas orgânicas, principalmente de enzimas moleculares, onde existe envolvimento direto ou indireto na função catalítica das enzimas. Potássio, e presumivelmente cloro, são os únicos nutrientes minerais que não são constituintes de estruturas orgânicas. Estes funcionam principalmente na osmorregulação, ou seja na manutenção do equilíbrio eletroquímico nas células e seus compartimentos e na regulação das atividade enzimática (MARSCHNER, 1986).

Os elementos minerais exercem funções muito importantes na planta, e muitas vezes específicas nos processos fisiológicos. As deficiências minerais nas plantas provocam distúrbios no seu metabolismo, os quais frequentemente alteram os aspectos organográficos, porém, em virtude das interações que ocorrem nos processos, torna-se difícil precisar a maneira pela qual as deficiências provocam os efeitos observados (KRAMER & KOSLOWSKI, 1960). O amarelecimento ou clorose das folhas, que são sintomas comumente verificados, podem ser causados por outros fatores como toxidade nutricional, estresse ambiental (temperatura, água, vento, etc.), fatores genéticos, substâncias químicas (herbicidas, pesticidas, etc.), poluentes, animais herbívoros (insetos, etc.) e patógenos (fungos, bactérias, vírus). Esses sintomas podem ser confundidos com sintomas de carência mineral (DELL *et al.*, 1995).

Remobilização dos nutrientes minerais das folhas maduras para às áreas de novo crescimento é, desta forma, essencial para a conclusão do ciclo de vida das plantas sob estas condições ambientais. A quantidade remobilizada, entretanto, difere entre nutrientes minerais e é refletida na distribuição dos sintomas visíveis de deficiência nas plantas. Sintomas de deficiência nas folhas mais velhas refletem alta taxa de remobilização, considerando que aqueles nas folhas mais novas e meristemas apicais refletem insuficiente remobilização (MARSCHNER, 1986). A

Tabela 1 mostra as diferentes características na remobilização de acordo com a distribuição dos sintomas de deficiência.

Tabela 1. Diferentes características entre a distribuição dos sintomas visíveis de deficiência e o grau de remobilização.

Nutriente mineral	Partes da planta no qual os sintomas de deficiência ocorrem predominantemente.	Retranslocação
Nitrogênio, potássio, magnésio e fósforo	Folhas mais velhas	Muito boa
Enxofre	Folhas mais novas	Insuficiente
Ferro, zinco, cobre e molibdênio	Folhas mais novas	Muito baixa
Boro e cálcio	Folhas mais novas e meristemas apicais	Extremamente baixa ou nenhuma

Fonte: MARSCHNER (1986)

Segundo DELL *et al.* (1995), as principais características de deficiências nutricionais são:

1. Sintomas podem tipicamente adquirir uma das seguintes formas: clorose da folha (uniforme ou amarelecimento internerval), necrose da folha (morte do tecido da folha), avermelhamento da folha (acumulação de pigmentos de antocianina), deformação da folha (folhas pequenas, margens irregulares, lâmina irregular) ou morte dos ápices dos brotos.
2. Padrões de clorose estão relacionados com a nervura das folhas. Os sintomas desenvolvem-se primeiramente em uma das três áreas: margens das folhas, extremidades das folhas e áreas internervais.
3. Sintomas podem aparecer inicialmente nos ápices dos brotos, ou em folhas recentemente expandidas ou em folhas mais velhas.
4. Sintomas podem propagar-se lentamente das folhas mais jovens para as folhas mais velhas, ou vice versa.

2.2.1. Nitrogênio

O nitrogênio representa cerca de 2 a 5% do peso seco das plantas, sendo constituinte de aminoácidos, amidas, aminas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, alcalóides, clorofila e muitas coenzimas. As plantas superiores são maiores contribuintes da grande quantidade de nitrogênio que está continuamente sendo convertido da forma inorgânica para forma orgânica. As mais importantes fontes inorgânicas envolvidos na conversão são NO_3^- e NH_4^+ . Ambas as formas podem ser absorvidos e metabolizados pelas plantas (MARSCHNER, 1986; MENGEL & KIRKBY, 1987; DELL *et al.*, 1995).

A importância da redução e assimilação do nitrato pelas plantas é similar à da redução e assimilação de CO_2 na fotossíntese. Algumas bactérias usam nitrato como um aceptor de elétrons sob condições anaeróbicas e produzem gases, um processo que causa uma considerável perda de nitrogênio combinado do solo pela denitrificação. A redução do nitrato a amônia é mediado por duas enzimas: nitrato redutase, que reduzem nitrato à nitrito; e nitrito redutase, que reduzem nitrito à amônia. Nitrato redutase é uma enzima complexa com peso molecular de ~ 200000 em plantas superiores. Contém muitos grupos prostéticos, incluindo FAD, citocromo e molibdênio, e está localizada no citoplasma das plantas superiores e necessita ou de NADH ou NADPH como doador de elétrons. A atividade da nitrato redutase pode ser inibida ou completamente suprimida pelo amônio e certos aminoácidos ou amidas. A nitrito redutase é uma enzima de baixo peso molecular associado nas folhas com cloroplastos e nas raízes com proplastídeos. Nas folhas verdes, o elétron doador é a ferredoxina reduzida, geralmente na luz pelo fotossistema I e no escuro via respiração (MARSCHNER, 1986).

O movimento do nitrogênio nas plantas é caracterizado por 3 etapas: 1) consiste da conversão de nitrogênio inorgânico em compostos nitrogenados orgânicos de baixo peso molecular (ex. pelas bactérias nitrificantes); 2) síntese de compostos nitrogenados de alto peso molecular, incluindo proteínas e aminoácidos, onde compostos orgânicos nitrogenados de baixo peso molecular e particularmente aminoácidos servem como blocos de ligação destas reações sintéticas; e 3) quebra das macromoléculas contendo nitrogênio pelas enzimas hidrolíticas (MENGEL & KIRKBY, 1987).

A carência deste elemento, entre outros fatores provocam uma clorose nas folhas reduzindo assim sua capacidade fotossintética, bem como uma diminuição no ritmo de crescimento das plantas, e em casos extremos pode até causar a paralização do crescimento (EPSTEIN, 1975).

Segundo MENGEL & KIRKBY (1987), os sintomas visuais são somente as consequências do distúrbio metabólico, e diferentes causas podem proporcionar síndromes similares. A deficiência de nitrogênio foi caracterizada pela baixa taxa de crescimento, plantas pequenas, folhas de tamanho reduzido, morte prematura das folhas mais velhas, raízes sem ramificações, colapso e desenvolvimento dos cloroplastos, folhas cloróticas com necrose no estágio mais avançado da deficiência. A deficiência de nitrogênio difere fundamentalmente das deficiências de K e Mg, onde os sintomas também se iniciam nas folhas mais velhas, porém com o aparecimento de manchas cloróticas e necróticas no estágio inicial da deficiência. Por outro lado, os sintomas de deficiência de nitrogênio se assemelham com as deficiências de Fe, Ca e S, as quais se caracterizam por folhas amareladas e pálidas, entretanto, os sintomas ocorrem inicialmente nas folhas mais jovens.

INGESTAD (1957) observou que a deficiência de nitrogênio apresentaram folhas relativamente pequenas, com a coloração verde clara a amarelada, manchas de antocianinas sob a lâmina, morte das folhas mais velhas e com raízes longas e muito finas.

KAUL *et al.* (1966) avaliaram plântulas de *Eucalyptus* sp. mantidas em soluções nutritivas deficientes em N, P, K, Ca, Mg e S usando a composição de Hoagland & Arnon (1950) durante 196 dias, em casa-de-vegetação. Os sintomas de deficiência de nitrogênio apresentaram folhas verde claras, pequenas, extremidade das folhas mais velhas secas com necrose e com manchas vermelhas ao longo da margem, próximo a extremidade. As folhas inferiores apresentaram manchas internervais amareladas e encarquilhamento da lâmina foliar. Caule verde claro próximo ao ápice, e na porção basal de coloração marrom com manchas verde claras. O crescimento em relação ao tratamento controle se apresentou reduzido, com ausência de ramificação lateral e com comprimento da raiz maior que o controle.

Em plântulas de *Eucalyptus grandis*, KAUL *et al.* (1968) observaram a deficiência de nitrogênio no período de 240 dias, em casa-de-vegetação. As plântulas apresentaram clorose nas folhas e caules em alguns casos. As margens das folhas mais velhas encurvaram-se com a posterior morte seguida da desfoliação. Manchas necróticas apareceram na maioria das folhas no estágio final do experimento. O crescimento dos brotos foram restritos com baixo número de folhas. As plântulas apresentaram-se fracos, finos, sem ramificação e com internódio curto. As folhas se mostraram pequenas em tamanho quando comparado com o controle. Houve pouco desenvolvimento de raiz e as plântulas tiveram ataques de insetos.

KAUL *et al.* (1970), em plântulas de *Eucalyptus globulus*, verificaram a deficiência de nitrogênio no período de 210 dias, em casa-de vegetação. Os sintomas foram inicialmente aparecendo na forma de manchas amareladas e com clorose internerval nas folhas mais velhas. Por último, todas as folhas inferiores tornaram-se cloróticas e começaram a morrer prematuramente. No estágio final do experimento, as folhas mais novas e a porção mais tenra do caule tornaram-se cloróticas. A planta como um todo mostrou-se fraca, com restrito crescimento, caule fino, sem ramificação, internódio curto, folhas pequenas e em número reduzido. O sistema radicular foi pouco desenvolvido com pequenas e finas raízes laterais.

Os sintomas iniciais de carência de nitrogênio em *Eucalyptus urophylla* caracterizou-se, segundo ROCHA FILHO *et al.* (1978), pelo aparecimento das folhas inferiores de uma clorose generalizada na área do limbo. Associada a essa clorose ou amarelecimento, observou-se uma diminuição do crescimento da planta quando comparada com a testemunha. Posteriormente, a clorose estendia-se no sentido das folhas mais novas e com a progressão da sintomatologia todas as folhas apresentavam sintomas de deficiência. As folhas mostravam no limbo uma coloração verde-claro, enquanto que as nervuras tinham uma cor levemente

avermelhada. Outros sintomas descritos foram o crescimento reduzido, internódios curtos, poucas folhas, sem ramificações ou brotações laterais.

2.2.2. Fósforo

O fósforo representa cerca de 0,3 a 0,5 % do peso seco das plantas durante o estágio vegetativo de crescimento. Diferente do nitrato e do sulfato, fosfato não é reduzido na planta mas permanece na sua forma altamente oxidada. Após a absorção, no pH fisiológico, principalmente como H_2PO_4^- ou como fosfato inorgânico (P_i), é esterificado através do grupo hidroxil pela cadeia de carbono (C-O-P) como um simples fosfato éster ou atacado por outro fosfato formando pirofosfato rico em energia P~P. A presença do fósforo como um constituinte de estrutura macromolecular é mais predominante nos ácidos nucleicos, que como unidades de moléculas do DNA ou como unidades de RNA. Embora presentes nas células somente em baixas concentrações, fosfato éster e fosfatos ricos em energia representam o mecanismo metabólico das células. Muitos fosfatos ésters são intermediários no caminho metabólico da biossíntese e degradação. Sua função e formação são diretamente relacionadas ao metabolismo energético das células e aos fosfatos ricos em energia. O ATP (adenosina trifosfato) é o principal fosfato rico em energia necessário para a síntese de amido. As ligações pirofosfato, do ATP, ricas em energia, podem ser transmitidas a outras coenzimas que diferem do ATP somente em relação à base nitrogenada, por exemplo, uridina trifosfato (UTP) e guanosina trifosfato (GTP), que são necessários para a síntese de sacarose e celulose, respectivamente. Em células vacuoladas de plantas superiores existem dois maiores *pools* de fosfatos. No *pool* metabólico, representado pelo citoplasma e induzindo os cloroplastos, fosfato ésters dominam, enquanto que no *pool* não metabólico, ou o vacúolo, P_i é a fração dominante. Nas plantas com um adequado suprimento de fósforo, cerca de 85 a 95% do P_i total é locado nos vacúolos. Com a interrupção do suprimento de fósforo a concentração de P_i nos vacúolos decresce rapidamente, enquanto que a concentração de P_i no citosol (compartimento metabólico) decresce somente cerca de 6mM a algumas vezes menos que 3mM. A liberação do P_i pelos vacúolos é normalmente lenta e pode limitar o crescimento quando o suprimento externo é interrompido. Compartimentalização do P_i é, entretanto, essencial para a regulação do caminho metabólico no citoplasma e cloroplastos (MARSCHNER, 1986).

MENGEL & KIRKBY (1987) caracterizaram a deficiência de fósforo como tendo crescimento retardado, a taxa de matéria seca da parte aérea/raiz reduzida, afetando a formação de frutos e sementes e com as folhas mais velhas apresentando coloração verde escura.

MARSCHNER (1986) descreve vários sintomas de deficiências causados pelo fósforo, entre eles: crescimento retardado, frequentemente com uma coloração avermelhada devido ao aumento da formação de antocianinas; plantas podem apresentar coloração verde mais escura comparada com plantas normais; células e expansão foliar são mais retardados que a

formação de clorofila; o conteúdo de clorofila por unidade de área elevado, mas a eficiência fotossintética por unidade de clorofila muito baixa; inibição da expansão das células foliares durante o dia causado pelo decréscimo da condutância hidráulica da raiz; redução generalizada de muitos processos metabólicos, incluindo divisão e expansão celular, respiração e fotossíntese; e a função regulatória do P_i na fotossíntese e metabolismo dos carboidratos nas folhas podem ser considerados ser um dos maiores fatores limitantes do crescimento, particularmente durante a fase reprodutiva.

A deficiência de fósforo foi observada por KAUL *et al.* (1966), em plântulas de *Eucalyptus* por um período de 196 dias, em casa-de-vegetação. As plântulas apresentaram folhas verdes, finas e pequenas em tamanho. As extremidades e as margens das folhas mais velhas tornaram-se necróticas. Apareceram pequenas manchas marrons nas extremidades das folhas mais novas. O caule sem ramificação lateral apresentou pigmentos de coloração marrom. O crescimento das plântulas foi menor que da testemunha.

KAUL *et al.* (1968) observaram sintomas de deficiência de fósforo em plântulas de *Eucalyptus grandis*, no período de 240 dias, em casa-de-vegetação. Os primeiros sintomas foram o aparecimento de clorose internerval nas folhas mais novas com enrolamento das margens. As extremidades das folhas mais velhas morreram e o efeito procedeu-se em direção a base. A altura das plântulas e o desenvolvimento da raiz se apresentou melhor que na deficiência de nitrogênio. Houve um aparecimento de muitas ramificações laterais finas e secundárias com folhas pequenas.

Em plântulas de *Eucalyptus globulus*, KAUL *et al.* (1970) observaram por um período de 210 dias a deficiência de fósforo, em casa-de-vegetação. Os autores verificaram que não houve um sintoma marcado nas folhas devido a deficiência deste nutriente exceto o secamento da extremidade e margem das folhas inferiores. O tamanho das folhas foi normal. Entretanto, exibiu crescimento atrofiado que foi levemente superior que na deficiência de nitrogênio. Neste caso, as plantas se mostraram fracas com caule fino, internódio curto e algumas manchas de coloração marrom na porção basal do caule. Houve pouca ramificação no estágio final do experimento nas áreas próximas da região de crescimento. O sistema radicular foi semelhante ao da deficiência de nitrogênio, com pouco desenvolvimento.

Em *Eucalyptus urophylla*, ROCHA FILHO *et al.* (1978) observaram que os sintomas de deficiência de fósforo iniciaram-se pelo surgimento de pontos cloróticos no limbo das folhas inferiores que com a progressão dos sintomas tornaram-se avermelhadas, crescendo em tamanho, formando manchas maiores até alcançar a folha inteira. Posteriormente, essas manchas necrosavam-se, secavam e em seguida ocorria a queda da folha. Quando comparada com a testemunha, as plantas deficientes apresentavam um menor porte vegetativo.

2.2.3. Potássio

O teor de K^+ necessário para ótimo crescimento da planta está em torno de 2-5% do peso seco da parte vegetativa. A absorção do potássio é altamente seletiva e inteiramente acoplada à atividade metabólica. O K^+ caracteriza-se pela alta mobilidade nas plantas em todos os níveis e é o mais abundante cátion no citoplasma. Sais de potássio contribuem na regulação do potencial osmótico das células e tecidos de espécies de plantas glicofíticas. As várias funções do K^+ na extensão celular e outros processos que regulam o turgor são relacionadas à concentração de K^+ nos vacúolos. Existem mais de 50 enzimas que são completamente dependentes ou são estimuladas pelo K^+ . Potássio e outros cátions univalentes ativam enzimas induzindo mudanças conformacionais nas proteínas. Em plantas deficientes em potássio algumas mudanças químicas ocorrem, incluindo um acúmulo de carboidratos solúveis, um decréscimo no nível de amido, e um acúmulo de componentes solúveis de nitrogênio. Uma outra função chave do K^+ é a ativação da membrana ligado a ATPase, que requer Mg^{2+} , estimulado pelo K^+ e, em alguns casos, pelo Na^+ . A ativação da ATPase pelo K^+ não somente facilita seu próprio transporte através da membrana plasmática nas células da raiz, mas também, faz do K^+ o mais importante elemento mineral na extensão celular e osmorregulação. Tecidos de plantas deficientes em potássio exibem elevada atividade de certas hidrolases como, β -glucosidase ou de oxidades, como polifenol oxidase quando comparados a tecidos de plantas normais. É provável que K^+ esteja envolvido em muitos passos do processo de translocação, incluindo a união de tRNA a ribossomos. A extensão celular envolve a formação de um vacúolo central grande ocupando 80-90% do volume da célula. É estabelecido que a extensão celular seja a consequência da acumulação nas células de K^+ , que é necessário para estabilização do pH no citoplasma e aumento do potencial osmótico nos vacúolos. Em muitas espécies, K^+ tem a maior responsabilidade pelas mudanças de turgor nas células-guarda durante o movimento dos estômatos. Um aumento da concentração de K^+ nas células-guarda resulta na absorção de água pelas células adjacentes e um correspondente aumento no turgor nas células guardas e, assim, na abertura dos estômatos. Potássio tem um papel chave nos movimentos que regulam o turgor, não somente das células individuais, mas também, de órgãos de plantas. Em algumas espécies, movimentos nictinásticos (circadianos) das folhas são observados, onde as folhas abrem durante o dia e fecham durante a noite. Este movimento é controlado pelo K^+ , mediado pela mudanças de turgor em tecidos especializados, os órgãos motores ou pulvini. Transporte ativo de K^+ nas células motoras ventrais (inferiores) levam à abertura: o fluxo de K^+ na direção oposta causa o fechamento. Um mecanismo similar é responsável pelas reações seismonásticos das folhas de *Mimosa pudica* (MARSCHNER, 1986).

Do ponto de vista da troca de compensação, K^+ é o cátion predominante para contrabalancear anions imóveis no citoplasma, e quase sempre anions móveis nos vacúolos, bem como, no xilema e floema. O acúmulo de ácidos orgânicos é frequentemente a consequência

do transporte de K^+ sem um ânion acompanhante no citoplasma. O papel do K^+ no balanço cátion-ânion é também refletido no metabolismo de nitrato, no transporte de longa distância pelo xilema, bem como, para estocagem em vacúolos (LÄUCHLI & BIELESKI, 1983; MARSCHNER, 1986).

Desta forma, o potássio (K^+) é o mais abundante cátion citoplasmático nas células das plantas, e pode ter inúmeras inter relações e estar integrado: 1) na ativação de enzimas, especificamente na síntese de proteínas; 2) na estabilização das conformações nativas de enzimas e possivelmente membranas; 3) no turgor, volume e regulação osmótica. Com os solutos compatíveis, sais de K^+ geram os componentes citoplasmáticos da pressão osmótica celular e são contudo importantes na regulação do volume citoplasmático. Em certos casos, sais de K^+ são contribuidores dominantes do potencial osmótico vacuolar; 4) na conservação de energia da membrana pela bomba de próton e; 5) na regulação do pH citoplasmático (LÄUCHLI & BIELESKI, 1983).

A elevada permeabilidade das membranas das plantas para K^+ é uma característica importante para vários processos fisiológicos influenciados pelo K^+ : crescimento meristemático, regime hídrico, fotossíntese, e transporte à longa distância (MENGEL & KIRKBY, 1987).

O primeiro efeito metabólico em plantas superiores deficientes de K^+ é a acumulação de carboidratos solúveis e redução de açúcares, resultando no bloqueio da síntese de piruvato, fosforilação oxidativa, fotofosforilação e respiração ou síntese de adenina. A deficiência deste elemento poderia afetar a síntese de amido, e a de ácidos graxos pelo acetato derivado da glicólise (EVANS & SORGER, 1966).

MARSCHNER (1986) descreveu que quando o K^+ foi deficiente, o crescimento foi retardado, e K^+ foi retranslocado para amadurecimento de folhas e caules, e sob condições de severa deficiência estes órgãos tornaram-se cloróticas e necróticas.

Para MENGEL & KIRKBY (1987), a deficiência de potássio não tem resultados imediatos nos sintomas visuais. O primeiro sintoma é a redução da taxa de crescimento, e mais tarde ocorrem clorose e necrose das folhas. Estes sintomas geralmente ocorrem nas folhas mais velhas iniciando-se nas margens e nas extremidades das folhas; com o decréscimo no turgor da folha, sob estresse hídrico e flacidez; desenvolvimento anormal dos tecidos e células das organelas; lignificação dos feixes vasculares impariado; deformação de xilema e floema; além do colapso nos cloroplastos e mitocôndrias.

KAUL *et al.* (1966), em plântulas de *Eucalyptus* sp. suplementado com solução nutritiva deficiente em K, observaram os sintomas durante um período de 196 dias, em casa-de-vegetação. As plântulas apresentaram folhas mais velhas com as extremidades e margens ressecadas ("scorching") e manchas de coloração marrons nas internervuras. O caule apresentou

uma coloração marrom na sua base. Houve aparecimento de gemas laterais mas o crescimento foi restrito, mostrando tendência ao clássico sintoma de “roseta”. As gemas foliares foram visíveis. O crescimento das plântulas foi levemente menor que a planta controle.

A deficiência de potássio foi verificada por KAUL *et al.* (1968), em plântulas de *Eucalyptus grandis* no período de 240 dias, em casa-de-vegetação. Foi observado sintomas não específicos na deficiência do mineral. No estágio final, entretanto, as folhas mais novas desenvolveram leve clorose internerval e nas folhas mais velhas margens e extremidades com aparência queimada. O crescimento das gemas e raízes foram melhores que na deficiência de nitrogênio e fósforo. A ramificação e o tamanho das folhas foram sempre normais. Plantas tiveram ataques de insetos.

Em plântulas de *Eucalyptus globulus*, KAUL *et al.* (1970) observaram por um período de 210 dias a deficiência de potássio, em casa-de-vegetação. Esta deficiência não apresentou nenhum sintoma visual durante o estágio inicial de crescimento, exceto algumas manchas de coloração marrom nas folhas. No estágio final, entretanto, as extremidades e as margens de todas as folhas curvaram-se para cima. Isto foi observado primeiramente nas folhas mais velhas, mas todas as outras folhas foram afetadas posteriormente. A deficiência influenciou o crescimento das gemas, com ramificação regular e com tamanho normal das folhas em relação as deficiências de nitrogênio e fósforo. Entretanto, as plântulas foram muito menores que a planta controle. O sistema radicular foi mais desenvolvido com raízes laterais longas e finas quando comparados com a deficiência de nitrogênio e fósforo.

ROCHA FILHO *et al.* (1978) relataram que os sintomas iniciais de carência de potássio em *E. urophylla* apareceram nas folhas medianas com pontuações cloróticas na área do limbo, nos espaços entre as nervuras. Com a continuação dos sintomas, os pontos se uniam formando faixas cloróticas, que se localizavam nas margens e extremidades das folhas. Posteriormente, as manchas se tornavam necróticas espalhando-se e tomando toda a área foliar. As folhas inferiores, nessa fase mostravam também algumas pontuações cloróticas.

2.2.4. Cálcio

O conteúdo de cálcio das plantas varia entre 0,1 e > 5,0 % do peso seco dependendo das condições de crescimento, espécies de plantas, e órgão da planta. Ao contrário dos outros macronutrientes, uma alta proporção do total de Ca^{2+} nos tecidos das plantas é localizada na parede celular (apoplasto). Esta única distribuição é o resultado do grande número de sítios de ligações para Ca^{2+} nas paredes das células, bem como o transporte restrito de Ca^{2+} através da membrana plasmática ao citoplasma. Na lamela média, está ligado com grupos R.COO^- dos ácidos poligalacturônicos (pectinas) na forma trocável. Existem duas distintas áreas na parede celular com elevadas concentrações de Ca^{2+} : na lamela média, e na superfície exterior

da membrana plasmática. Em ambas as áreas, o Ca^{2+} tem funções estruturais essenciais, principalmente, a regulação da permeabilidade da membrana e processos relacionados e o fortalecimento das paredes celulares, respectivamente. Ainda que o Ca^{2+} esteja também envolvido na divisão celular, a diminuição do crescimento radicular na ausência de Ca^{2+} exógeno é primariamente o resultado da inibição da extensão celular. O papel do Ca^{2+} na extensão celular não está bem claro, mas existem indicações que seja necessário para a incorporação do material na parede celular. O crescimento do tubo polínico é também dependente da presença de Ca^{2+} , e a direção do crescimento do tubo polínico é controlado quimiotropicamente pelo gradiente de Ca^{2+} extracelular. O nível de Ca^{2+} é elevado no crescimento do ápice do tubo polínico, onde a membrana plasmática funde com as vesículas secretoras, que transportam o material estrutural para a formação da parede celular. Cálcio estabiliza as membranas das células pela ligação de grupos de fosfatos e carboxilatos de fosfolipídios e proteínas, preferencialmente nas superfícies das 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 cloróticas e nos estágios mais avançados uma necrose das margens das folhas e os tecidos afetados tornam-se "moles", devido a dissolução da parede celular.

INGESTAD (1957) observou que primeiramente ocorreu necrose do ápice foliar até circundar as folhas com embranquecimento das margens das folhas. Ocorreram deformações das lâminas foliares com murchamento em direção ao ápice das folhas. E por fim, morte do topo da planta e formação de ramos. As raízes e suas ramificações apresentaram-se curtos com impressão de multilateralidade.

KAUL *et al.* (1966), em plântulas de *Eucalyptus* sp. tratado com solução nutritiva deficiente em cálcio, avaliaram os sintomas de deficiência por um período de 196 dias, em casa-de-vegetação. As plântulas apresentaram clorose nas folhas mais velhas (condição "mosqueado") ao longo da margem e nas extremidades. Não houve ramificação lateral mas as gemas foram observados crescendo na base do caule. As gemas foliares não foram visíveis. O crescimento das plântulas foi levemente menor que testemunha.

Os sintomas de deficiência de cálcio foram observados por KAUL *et al.* (1968), em plântulas de *Eucalyptus grandis* no período de 240 dias, em casa-de-vegetação. As folhas mais novas apresentaram clorose internerval enquanto as folhas mais velhas tiveram a sua extremidade e margens encurvadas. A altura não foi afetada sendo menor que o controle, mas foi melhor que na deficiência de nitrogênio e fósforo. O comprimento da raiz foi menor que na deficiência de potássio mas maior que na deficiência de nitrogênio. A ramificação e o tamanho da folha foi normal.

Em plântulas de *E. globulus*, KAUL *et al.* (1970) observaram que após um período de 7 meses, em casa-de-vegetação, não apresentaram sintomas visuais na deficiência de cálcio, exceto que as plântulas foram restritas no crescimento, mas superiores que nas deficiências de nitrogênio, fósforo e potássio. O tamanho das folhas foi normal. Não houve ramificação. O sistema radicular foi melhor que nas deficiências de nitrogênio, fósforo e potássio.

HAAG *et al.* (1961) observaram que sintomas de deficiência de cálcio em plântulas de *E. alba* foram caracterizados por plantas mal desenvolvidas, com aparecimento de manchas de coloração avermelhada no limbo das folhas mais velhas ou nas base dos ramos.

2.2.5. Magnésio

A maior função certamente é o papel como átomo central da molécula de clorofila. Nas folhas verdes, entretanto, somente uma pequena proporção do Mg^{2+} total é ligado à clorofila, e sempre sob severa deficiência de magnésio este valor não excede 25%. Quando o suprimento de Mg^{2+} é ótimo para crescimento, entre 10 e 20% do total de Mg^{2+} das folhas é localizado nos cloroplastos, e menos da metade deste está ligado à clorofila; uma similar proporção de K^+ (10-20%) é localizado nos cloroplastos. A proporção de Ca^{+} , entretanto, é usualmente menor. O citoplasma, como outro compartimento do *pool* metabólico, pode conter outros 10-20% do total de Mg^{2+} e K^+ . Nas células do tecido foliar maduro, cerca de 15% do volume total da célula é ocupado pelos cloroplastos, o citoplasma ocupa cerca de 5%, e os 85% restantes são ocupados pelo vacúolo central. Assim uma proporção de 20% de Mg^{2+} das folhas localizados nos cloroplastos, que ocupam somente 5% do volume total, indicam uma alta concentração de Mg^{2+} neste compartimento. Elevadas concentrações de Mg^{2+} e K^+ são necessários nos cloroplastos e citoplasma para manter o elevado pH, entre 6,5 e 7,5, comparado ao pH 5,0 a 6,0 do vacúolo. A influência do pH na estrutura das proteínas e portanto atividade enzimática é dependente da estrita regulação do pH do *pool* metabólico, e cátions (Mg^{2+} , K^+) e, para um tamanho limitado, desempenho do Ca^{2+} na sua função regulatória. No *pool* metabólico, Mg^{2+} é também necessário para a neutralização dos ácidos orgânicos, o grupo fosforil dos fosfolipídios, e particularmente ácidos nucleicos. Magnésio também tem uma função essencial como elemento de ligação ("bridging") para a agregação de subunidades de ribossomos, um processo necessário para síntese de proteínas. Quando o nível de Mg^{2+} é deficiente, ou na presença de excessivos níveis de K^+ , as subunidades se dissociam e a síntese de proteínas cessa. Nas células das folhas, cerca de 25% da proteína total é localizada nos cloroplastos. Isto explica como a deficiência do magnésio particularmente afeta o tamanho, estrutura, e a função dos cloroplastos incluindo a transferência de elétrons no fotossistema II. Existe uma longa lista de reações enzimáticas que requer ou é promovida por Mg^{2+} . Magnésio é preferencialmente ligado as bases nitrogenadas e grupos fosforil. No caso do ATP, um complexo Mg-ATP é formado. A síntese de ATP

(fosforilação: $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$) tem uma absoluta necessidade de Mg^{2+} como uma ponte de ligação entre ADP e a enzima. O acúmulo de amido em folhas de plantas deficientes de magnésio é principalmente responsável pelo elevado conteúdo de matéria seca destas folhas, indicando que fotossíntese é menos prejudicado que a degradação de amido nos cloroplastos, transporte de açúcar dentro das células, e/ou transporte de sacarose pelo floema. Todos estes processos metabólicos têm uma elevada necessidade por fosfatos ricos em energia e, portanto, também de Mg^{2+} para transferência de energia (MARSCHNER, 1986).

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que os sintomas de deficiência de magnésio ocorrem inicialmente nas folhas mais velhas com amarelecimento internerval ou clorose e, em casos extremos, tornam-se necróticas. As folhas tornam-se rígidas e quebradiças e as nervuras intercostais torcidos. Na região basal das folhas observa-se pequenas manchas verde escuras, devido ao acúmulo de clorofila em contraste com folhas de cor amarelo pálido. Ocorre a necrose no ápice das folhas e deformação de estrutura lamelar afetando a estabilidade dos tilacóides.

INGESTAD (1957) observou primeiramente folhas amareladas com manchas marginais de coloração verde a marrom estendendo sobre a lâmina foliar, com posterior morte das folhas.

Em plântulas de *Eucalyptus* sp., KAUL *et al.* (1966) verificaram os sintomas da deficiência de magnésio durante 196 dias, em casa-de-vegetação e observaram deformações e manchas internervais de coloração verde pálidas nas folhas mais velhas. A necrose foi observada na extremidade e nas margens de algumas folhas. O caule apresentou numerosa ramificação com folhas pequenas. O crescimento das plântulas foi semelhante com a testemunha.

KAUL *et al.* (1968) observaram sintomas de deficiência de magnésio em plântulas de *E. grandis* no período de 240 dias, em casa-de-vegetação. A clorose foi observada primeiramente nas folhas mais velhas e depois nas folhas mais novas. A altura das gemas foi menor que nas deficiências de potássio e cálcio, mas maior que nas deficiências de nitrogênio e fósforo. O comprimento da raiz foi maior comparados com as deficiências de nitrogênio, fósforo e cálcio. As plântulas se mostraram fracas com reduzida ramificação, folhas menores e mais finas em relação ao controle. As plântulas foram atacadas por insetos.

Em plântulas de *E. globulus*, KAUL *et al.* (1970) observaram durante 210 dias, em casa-de-vegetação, os sintomas de deficiência de magnésio. No estágio final houve aparecimento de clorose internerval nas folhas mais velhas. O crescimento das gemas foi menor em relação ao controle, mas muito melhor em relação as deficiências de nitrogênio, fósforo e potássio, com muitas ramificações. O sistema radicular foi bem desenvolvido.

Os sintomas de deficiência de magnésio em *Eucalyptus urophylla* foram amplamente descritos por ROCHA FILHO *et al.* (1978). Constataram que nas folhas inferiores e

medianas os sintomas iniciaram-se através de uma pequena clorose internerval do limbo, que rapidamente evoluiu no sentido da nervura principal. Com a evolução dos sintomas a parte clorótica secava, porém o restante da folha ficava verde. Quando os sintomas chegaram as folhas superiores, as inferiores apresentaram manchas avermelhadas nas regiões internervais do limbo, formando, na maioria das folhas duas faixas paralelas uma de cada lado da nervura principal. Visualmente, o caule não mostrou nenhum sintoma de carência, embora, quando comparado com a planta sadia, apresentou um menor crescimento.

2.2.6. Enxofre

O conteúdo total de S nos tecidos da planta é da ordem de 0,2 a 0,5 % do peso da matéria seca. As plantas absorvem S principalmente na forma de SO_4^{2-} . O enxofre é constituinte de aminoácidos cisteína e metionina e, portanto, de proteínas. Estes aminoácidos são precursores de compostos contendo S como coenzimas e produtos secundários das plantas. Enxofre é um constituinte estrutural destes compostos ou atua como um grupo funcional (ferredoxina, biotina e tiamina pirofosfato) diretamente envolvidos nas reações metabólicas. Sob condições de deficiência de enxofre, síntese de proteínas é inibido. Enxofre na sua forma não reduzida é um componente dos sulfolipídios e é, portanto, um constituinte estrutural de todas as membranas biológicas. Sulfolipídios são particularmente abundantes nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Existem evidências que sulfolipídios estão também envolvidos na regulação do transporte de íons através de outras biomembranas. (MARSCHNER, 1986).

Uma das principais funções do S nas proteínas ou polipeptídeos é na formação de ligações disulfito entre cadeias de polipeptídeos, e estas pontes de S-S contribuem para a conformação das enzimas (MENGEL & KIRKBY, 1987).

Como enxofre é um constituinte essencial das proteínas, a deficiência de enxofre resulta na inibição da síntese de proteínas. As deficiências de enxofre e nitrogênio são observadas certas semelhanças, sendo que características comuns são o teor reduzido de clorofila e de proteína além de um aumento de compostos solúveis de nitrogênio presentes na folha decorrentes de uma redução na síntese da proteína. Como o enxofre é pouco móvel na planta, os sintomas de deficiência ocorrem inicialmente nas folhas superiores, ao contrário do nitrogênio, cuja deficiência se caracteriza por uma clorose gradual da folha inteira, cujo tamanho é reduzido (MARSCHNER, 1986).

KAUL *et al.* (1966, 1968, 1970) avaliando o comportamento de plântulas de *Eucalyptus* sp., *E. grandis* e *E. globulus*, respectivamente, em solução nutritiva deficiente em enxofre, em casa-de-vegetação não observaram sintomas visuais marcantes.

ROCHA FILHO *et al.* (1978) observaram que a deficiência de enxofre em *E. urophylla* se caracterizou por clorose generalizada das folhas superiores, os quais iam

progressivamente ficando com uma coloração verde-limão, distinguindo-se das demais que mantinham uma cor verde escura. As plantas mostraram um bom desenvolvimento.

HAAG *et al.* (1961), trabalhando com *E. alba*, relataram que com a deficiência de enxofre as folhas novas mostraram uma clorose uniforme por toda a superfície do limbo e depois tornaram-se bronzeados. Entretanto, observaram que os ramos novos apresentaram uma coloração purpúrea.

Para MENGEL & KIRKBY (1987), a relação N orgânico/S orgânico é considerado elevado em tecidos de plantas deficientes de enxofre (70/1 a 80/1) quando comparado com plantas normais. Esta razão pode servir como guia para indicar se a planta tem suprimento adequado de S. Em plantas deficientes em S os níveis de $\text{SO}_4\text{-S}$ são muito baixos ao passo que N amida e $\text{NO}_3\text{-N}$ são elevados. Em contraste, com a deficiência de N os níveis solúveis de N são baixos e os níveis de SO_4^{2-} são normais. Os mesmos autores caracterizam que a deficiência de enxofre apresentam taxa de crescimento reduzida, e geralmente, o crescimento da parte aérea é mais afetado que o crescimento da raiz, as plantas são rígidas e quebradiças com caule fino, clorose nas folhas mais novas, diminuição do internódio e folhas de coloração verde a amarelo brilhante, seguido pelo pronunciado amarelecimento. A coloração das folhas é semelhante a deficiência de N, mas sem a formação de antocianinas que é restrito as folhas mais novas.

2.2.7. Ferro

A formação de complexos (quelatos) e sua ação como um sistema de reação reversível oxidação-redução [$\text{Fe (II)} = \text{Fe (III)} + e^-$] constituem as maiores funções metabólicas do ferro. Existem dois grupos de proteínas bem definidas contendo ferro: hemoproteínas e proteínas ferro-enxofre. As mais conhecidos hemoproteínas são os citocromos, que contém um complexo heme ferro-porfirina como um grupo prostético. Citocromos são constituintes dos sistemas redox nas mitocôndrias e, na forma de citocromo oxidase, participando no passo final da cadeia respiratória. Outras enzimas heme são as catalases e peroxidases. Catalases facilitam a dismutação de H_2O_2 em água e O_2 . Esta enzima tem papel chave nos cloroplastos em cooperação com superóxido dismutase, bem como, na fotorespiração e no caminho glicolítico. Na parede celular o Fe ligado a peroxidases catalizam a polimerização dos fenois em lignina. Peroxidases são abundantes nas paredes celulares da rizoderme e endoderme da raiz. Existem evidências de que as peroxidases na parede rizodermal tem papel regulador na absorção de ferro. Compostos fenólicos são precursores da biosíntese de lignina, que são liberados no apoplasto das células rizodermas, portanto, a síntese de lignina também requer H_2O_2 , a formação do qual é catalizado por outra peroxidase resultado da oxidação de NADH na membrana plasmática. A outra proteína de ferro é coordenada pelo grupo tiol de cisteína e/ou enxofre orgânico. O mais predominante é a ferredoxina, que age como um elétron transmitindo

em um número de processos básicos metabólicos como na NADP^+ (fotossíntese); nitrato redutase, sulfato redutase e redução do N_2 . A necessidade de ferro na síntese de proteínas é refletida nas folhas pelo declínio no número de ribossomos, os sítios de síntese de proteínas, e um aumento na concentração de aminoácidos em folhas cloróticas. Na deficiência de ferro o conteúdo de proteínas por unidade de área e o volume celular aumentam (isto é, o conteúdo de clorofila por unidade de área foliar diminui), e o número de cloroplastos permanece inalterado visto que, o volume do cloroplasto e a quantidade de proteínas por cloroplastos declinam. Nas folhas deficientes de ferro a taxa de fotossíntese diminui por unidade de área foliar mas não por unidade de clorofila, indicando que o mecanismo fotossintético é intacto (MARSCHNER, 1986).

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que a deficiência de Fe é similar a deficiência de Mg, mas sempre iniciando nas folhas mais novas, com clorose internerval e um fino padrão reticulado frequentemente observado nas folhas novas, as nervuras verde escuras contrastando com superfície de cor verde brilhante ou amarelado das folhas, e as folhas mais novas podem ser completamente embranquecidas e totalmente sem clorofila.

INGESTAD (1957) observou folhas amareladas brilhantes nos ápices das plantas e muitas vezes folhas amareladas com margens verdes.

MALAVOLTA (1994) descreve como sintomas de deficiência em folhas ou órgãos mais novos apresentando clorose, nervuras em reticulado verde fino.

2.2.8. Boro

Em soluções aquosas o boro ocorre principalmente como ácido bórico, H_3BO_3 [ou $\text{B}(\text{OH})_3$]. Não existe indicação que boro seja um componente de enzimas, e há poucas evidências que a atividade de algumas enzimas seja aumentada ou diminuída pelo boro. Boro é um elemento mineral essencial para todas as plantas vasculares. As funções do boro são primariamente extracelular e relacionadas à lignificação e diferenciação do xilema (MARSCHNER, 1986).

Muitos trabalhos propõe que as reações dos íons de borato com compostos ricos em hidroxil, tais como açúcares e álcool açúcar ("sugar alcohols"), podem ser significantes na interpretação do papel do boro nos sistemas biológicos, muito relacionado aos processos de crescimento da planta, como a divisão celular, ou na conjunção com compostos ricos em hidroxil existente nas membranas celulares (açúcares, glicoproteínas, etc.). O ácido bórico pode estar diretamente envolvido na atividade da membrana ou servir como uma unidade de ligação para biossíntese de polissacarídeos na parede celular (DUGGER, 1983).

DUGGER (1983) relata o papel do boro na germinação do pólen, incluindo efeitos no: 1) crescimento do tubo polínico; 2) regulação da ruptura dos grãos de pólen como resultado da absorção irregular de água; e 3) tecido do estigma influenciando o crescimento do

tubo polínico e a compatibilidade da fertilização cruzada. No processo da germinação e do crescimento do tubo polínico o boro: 1) facilita a absorção do açúcar e metabolismo, possivelmente formando complexos borato açúcar; 2) aumenta a respiração; e 3) age na biossíntese da parede do tubo polínico. O efeito do boro na elongação do tubo polínico parece ser específico e não relacionado ao efeito da absorção de açúcar ou da respiração. Plantas deficientes em boro têm mais compostos solúveis nitrogenados, bem como maiores níveis de açúcares que na planta controle, além da diminuição do nível de fósforo orgânico. O boro tem um papel essencial na biossíntese de auxinas nos meristemas da planta, e a deficiência de boro leva a: 1) uma diminuição do nível de auxina livre; 2) um aumento de auxina não livre; e 3) uma redução da atividade da AIA oxidase. O metabolismo dos ácidos nucleicos, síntese de RNA e DNA também diminuem em plantas deficientes em boro.

A ausência do boro é mostrado afetar o metabolismo do ácido nucléico e do carboidrato. A presença do boro é essencial para manter a integridade estrutural das membranas das plantas, e que muitos sintomas da deficiência do boro em plantas são efeitos secundários causados pelas mudanças na permeabilidade da membrana. A deficiência de boro nas plantas aparecem primeiro como crescimento anormal ou retardado dos pontos de crescimento apical, ou interrupção do crescimento do tubo polínico (PILBEAN & KIRKBY, 1983).

Alguns dos sintomas de deficiência de boro foi descrito por MARSCHNER (1986), caracterizados por encurtamento do internódio, clorose internerval das folhas mais velhas, deformação da lâmina foliar, aumento do diâmetro do pecíolo e do caule, diminuição da formação do botão floral, flores e desenvolvimento do fruto.

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que a deficiência de boro aparece primeiramente como crescimento anormal ou retardamento da região apical da planta. As folhas jovens são deformadas, encarquilhadas e são freqüentemente engrossadas e de uma coloração verde azulada escura; as folhas e caules tornam-se quebradiços; ocorre uma redução e inibição na formação de flores e frutos; afeta a formação do tubo polínico, germinação do pólen e formação do fruto; ocorrência de partenogênese; inibição do crescimento da raiz, necrose no ápice da raiz; folhas jovens encrespadas e atrofiadas tornando-se marrons ou pretos; e as folhas velhas quebradiças e cloróticas.

MALAVOLTA (1994) descreve como sintomas de deficiência em folhas ou órgãos mais novos apresentando folhas menores e deformadas, morte das gemas, encurtamento dos internódios e superbrotamento, suberização das nervuras e aparecimento de fendas na casca.

2.2.9. Cobre

Existem vários trabalhos relatando se o cobre é absorvido como Cu^{2+} ou cobre quelatado. Devido à alta afinidade do Cu^{2+} por vários ligantes (aminoácidos, fenólicos, e quelatores sintéticos), em soluções nutrientes com Cu^{2+} pode formar complexos rapidamente. Se Cu^{2+} está presente em concentrações equimolar, sua taxa de absorção é mais elevada que cobre complexado aos quelatores sintéticos, tais como, EDTA ou DTPA. Muitas das funções do cobre são baseadas na participação da ligação enzimática nas reações redox. Nas reações redox das oxidases terminais, enzimas com cobre reagem diretamente com moléculas de oxigênio. Entretanto, a oxidação terminal em células vivas é catalizada por cobre e não pelo ferro. Cobre está presente em 3 diferentes formas de proteínas: 1) proteínas azuis sem atividade da oxidase (ex. plastocianina), que funcionam como elétron de transferência; 2) proteínas não azuis, que produzem peroxidases e monofenóis em difenóis e; 3) proteínas multicobre, que atuam como oxidases. A citocromo oxidase é uma proteína constituída de cobre-ferro que cataliza a oxidação terminal na mitocôndria. Geralmente, mais de 50% do cobre localizado nos cloroplastos está ligado à plastocianina. A plastocianina é um componente da cadeia de transporte de elétrons do fotossistema I. Em plantas deficientes de cobre, a taxa de fotossíntese também pode ser reduzida por outras reações diretamente relacionados pelo papel do cobre nos cloroplastos. Cobre é componente de outras enzimas dos cloroplastos e é necessário para síntese de quinonas (citocromo oxidase, ascorbato oxidase, fenolase, lacase e amino oxidase). A fenolase está envolvida na biossíntese de lignina e alcalóides e na formação de substâncias melanóticas. Estas substâncias também atuam como fitoalexinas, inibindo a germinação dos esporos e crescimento dos fungos. A atividade da fenolase é menor em plantas deficientes em cobre, igualmente para as atividades da AIA oxidase e peroxidase. Na deficiência de cobre os sintomas mais comuns seriam um crescimento retardado, distorção e murchamento das folhas mais novas, necrose do meristema apical, branqueamento das folhas mais novas e a lignificação prejudicada da parede celular (MARSCHNER, 1986).

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que a deficiência afetando a viabilidade dos grãos de pólen, com a diminuição do internódio, com folhas finas e torcidas com ápice embranquiçado, forma "pêndula" das árvores e redução da síntese de lignina.

MALAVOLTA (1994) descreve como sintomas de deficiência em folhas ou órgãos mais novos apresentando murchamento, cor verde amarelada, deformação do limbo; encurvamento dos ramos; deformação das folhas; exsudação de goma (ramos e frutos).

2.2.10. Zinco

Zinco é um micronutriente essencial para inúmeros aspectos da fisiologia e bioquímica da planta, incluindo biossíntese de hormônios, estabilidade estrutural de organelas, síntese do citocromo c; ativação e própria função de um número de enzimas, síntese de proteínas, e estabilidade e integridade das células da membrana plasmática da raiz (MARSCHNER, 1986; BROWN *et al.*, 1993).

O zinco é predominantemente absorvido como cátion divalente Zn^{2+} ; à pH elevado, presumivelmente também é absorvido como cátion monovalente $ZnOH^+$. Elevadas concentrações de outros cátions divalentes tais como Ca^{2+} inibem a absorção de zinco. Zinco atua ou como um componente metal de enzimas ou como um cofator regulatório funcional ou estrutural para um grande número de enzimas. Pelo menos 4 enzimas contendo zinco existem nas plantas: álcool desidrogenase (que catalizam a redução de acetaldeído a etanol, principalmente nas zonas meristemáticas), superóxido dismutase Cu-Zn (envolvido no mecanismo de detoxificação de O_2^- gerado na fotorespiração), carbônico anidrase (catalizam a hidratação do CO_2) e RNA polimerase. O zinco é necessário para a ativação de vários tipos de enzimas, incluindo desidrogenases, aldolases, isomerases, transfosforilases, e RNA e DNA polimerases. Portanto, a deficiência de zinco está associada a um enfraquecimento do metabolismo de carboidratos e síntese de proteínas (MARSCHNER, 1986).

Evidências sugerem que o zinco tem um papel na estabilização da estrutura do DNA e RNA, em manter a atividade do DNA sintetizando enzimas e controlando a atividade do RNA degradando enzimas. Assim, zinco pode ter um papel no controle da expressão gênica. (BROWN *et al.*, 1993)

Os sintomas mais comuns da deficiência de zinco incluem crescimento atrofiado, encurtamento dos internódios e pecíolos, folhas pequenas e mal formadas que resultam no clássico sintoma de “roseta”. Os primeiros sintomas são vistos em folhas novas (zinco é considerado imóvel sob condições de deficiência). Estas folhas permanecem pequenas, com margens viradas para cima, com clorose internerval, quebradiços e na superfície das folhas pontos necróticos (BRENNAN *et al.*, 1993).

Os sintomas mais visíveis da deficiência de zinco em dicotiledôneas seriam o crescimento retardado com o encurtamento do internódio e uma redução da área foliar, e combinados com estes sintomas as folhas mais velhas apresentam clorose e necrose. Além da redução da produção de grãos e sementes, devido ao papel específico do zinco na fertilização, afetando a germinação dos grãos de pólen (MARSCHNER, 1986).

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que na deficiência de zinco ocorrem sintomas de clorose internerval das folhas, de coloração verde claro, amareladas ou embranquecidas, distribuição irregular de cachos ou rosetas de folhas pequenas dormentes que

foram formadas no final das gemas jovens/novas, diminuição do número de brotos, diminuição do internódio, áreas cloróticas nas folhas mais velhas e inibição da síntese de RNA.

MALAVOLTA (1994) descreve como sintomas de deficiência em folhas ou órgãos mais novos apresentando folhas lanceoladas (dicotiledônea), clorose internerval, internódios curtos e morte de gemas ou regiões de crescimento.

2.2.11. Manganês

O manganês é absorvido principalmente como Mn^{2+} e é translocado predominantemente como cátion divalente livre do xilema das raízes para as gemas. O manganês age como constituinte estrutural, semelhante ao ferro, como um sistema redox [Mn (II)/Mn (III)]. A mais conhecida e extensivamente estudada função do manganês nas plantas verdes é o seu envolvimento na evolução do O_2 fotossintético. Poucas enzimas contendo manganês foram isoladas até agora. Existem evidências de que superóxido dismutase contendo manganês é grandemente distribuído em várias famílias de plantas superiores, porém em nível menor que os superóxidos dismutase contendo cobre e zinco. Nas células a concentração de magnésio é 50-100 vezes maior que a concentração de manganês. Para a ativação do RNA polimerase a concentração de magnésio deve ser 10 vezes maior do que a de manganês. Um aumento na atividade da peroxidase é uma típica característica de tecidos deficientes em manganês, embora a atividade da catalase não seja afetada. Folhas deficientes de manganês exibem elevada atividade de AIA oxidase, podendo ocasionar um aumento da degradação de auxina (AIA) nos tecidos. Embora manganês seja constituinte de ribossomos e também na atividade da RNA polimerase, síntese de proteínas é alterado nos tecidos deficientes de manganês. A deficiência de manganês tem efeitos severos nos níveis de carboidratos solúveis, que é drasticamente reduzido, principalmente nas raízes. Considerando o papel do manganês na fotossíntese, a diminuição do nível de carboidratos é esperado. O papel do manganês no metabolismo dos lipídios não é bem esclarecido. Em células deficientes de manganês não somente o conteúdo de clorofila, mas também o conteúdo dos constituintes da membrana dos cloroplastos, tais como, glicolipídios e ácidos graxos não polissaturados é reduzido. A taxa de alongação parece sentir mais rapidamente a deficiência de manganês do que a taxa de divisão celular. A formação de raízes laterais decresce completamente, e há formação de grande número de células não vacuoladas nestas raízes, indicando que a alongação de células é impariado em tecidos deficientes de manganês (MARSCHNER, 1986).

MARSCHNER (1986) descreve que níveis críticos de deficiência de manganês afeta a produção de matéria seca, fotossíntese líquida, e o conteúdo de clorofila. E são mais suscetíveis aos danos pela temperaturas mais baixas. Em dicotiledôneas, clorose intercostal das folhas mais novas e manchas verde cinzento na base das folhas são os maiores sintomas.

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que os cloroplastos são os mais sensíveis de todas as organelas na deficiência de manganês. Foi observado uma desorganização do sistema lamelar das folhas, com volume celular pequeno dominado pela parede celular e os tecidos inter epidermais enrugados (“shrunk”), com clorose internerval nas folhas mais novas em contraste com a do magnésio que ocorre nas folhas mais velhas com e manchas verde pardo e estriadas na parte basal da folha.

MALAVOLTA (1994) descreve como sintomas de deficiência em folhas ou órgãos mais novos apresentando folhas de tamanho normal, nervura em reticulado verde grosso.

2.2.12. Cobalto

Existem evidências de que cobalto é essencial para o crescimento de leguminosas sob condições simbióticas. A ausência de cobalto afeta o crescimento das plantas, as quais apresentam clorose similar aos sintomas da deficiência de nitrogênio. Nódulos de raízes em plantas suplementado com cobalto contém elevados níveis de vitamina B₁₂ e leghemoglobina. Cobalto é parte essencial da vitamina B₁₂. Leghemoglobina é um componente essencial para o processo de fixação de nitrogênio em nódulos de leguminosas (LÄUCHLI & BIELESKI, 1983).

São conhecidos três sistemas específicos de dependência de cobalto, e mudanças induzidas nas suas atividades são responsáveis pela relação entre suprimento de cobalto, nodulação, e fixação de N₂ em leguminosas. Estes sistemas são: 1) Metionina sintase. Sob condições de deficiência de cobalto, redução da síntese de proteínas podem ocorrer em *Rhizobium*; 2) Ribonucleotide redutase. Esta enzima está envolvida na redução de ribonucleotídeos a deoxiribonucleotídeos e portanto na síntese de DNA e; 3) Coenzima A metilmalonil mutase. Esta enzima está envolvida na síntese de heme (ferro porfirinas) nos bacterióides e assim - na cooperação com as células nodulares hospedeiras - na síntese de leghemoglobina (MARSCHNER, 1986).

2.2.13. Molibdênio

Embora molibdênio seja um metal, ocorre em solução aquosa principalmente como oxiânion molibdato, MoO₄²⁻, na sua forma altamente oxidada [Mo (IV)]. Nas plantas apenas poucas enzimas contém molibdênio como cofator. Estes incluem xantina oxidase/dehidrogenase, aldeído oxidase, sulfito oxidase, nitrato redutase, e nitrogenase. Em plantas superiores são conhecidas duas enzimas contendo molibdênio: nitrogenase e nitrato redutase. Todos os sistemas biológicos fixadores de N₂ requerem nitrogenase. Cada molécula de nitrogenase contém dois átomos de molibdênio, que são associados ao ferro, algumas destas com 4Fe-4S ou com ferredoxina. A nitrato redutase contém, ambos heme ferro e dois átomos de

molibdênio e cataliza a redução de nitrato a nitrito pela troca reversível de valência (MARSCHNER, 1986).

Em muitas espécies de plantas os sintomas mais típicos da deficiência de molibdênio seria uma drástica redução e irregularidades na formação da lâmina foliar conhecido como “whiptail”, causada pela necrose nos tecidos e insuficiente diferenciação dos feixes vasculares no estágio inicial do desenvolvimento da folha. Clorose e necrose ao longo da nervura principal das folhas mais velhas e “whiptail” em folhas mais novas podem refletir os mesmos tipos de distúrbios metabólicos, ocorrendo entretanto, nos diferentes estágios de desenvolvimento das folhas (MARSCHNER, 1986).

MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem que a deficiência de molibdênio assemelha-se a deficiência de nitrogênio, com clorose das folhas mais velhas. E ao contrário da deficiência de nitrogênio, a necrose é mais rápida nas margens das folhas devido ao acúmulo de nitrato. As folhas tornam-se pálidas e eventualmente embranquiçadas; afetam a formação de flores; folhas de idade intermediária e nas mais velhas com coloração amareladas a verde amareladas e as margens enroladas; folhas pequenas com manchas necróticas; clorose internerval ocorrem em folhas de aparência sadia e de coloração verde; a lamela média da parede celular mal formadas; e no caso extremo, a lamina foliar não é formada, apenas as nervura das folhas.

MALAVOLTA (1994) descreve como sintomas de deficiência em folhas ou órgãos mais velhos apresentando clorose uniforme, com ou sem estrangulamento do limbo e manchas pardas internervais; encurvamento (ou não do limbo).

2.3. Nutrição mineral *in vitro*

Tendo em vista a escasses de referências bibliográficas em relação a deficiência *in vitro*, foram selecionados somente trabalhos relacionados com nutrição mineral de espécies arbóreas.

SINGHA *et al.* (1987) cultivaram gemas apicais de *Malus* sp. cv. Almey e *Pyrus communis* L. cv. Seckel em meio líquido MS contendo 8,8 μM de BA, em pH ajustado a 5,7 e mantido com 16 horas de fotoperíodo a $25^\circ \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 9 semanas. Os autores observaram que a proliferação de gemas em maçãs aumentou linearmente durante o período de cultura, mas na cultura de pêra observou-se uma diminuição na proliferação de gemas depois de 4 semanas. O peso seco das gemas de ambas as espécies mostraram aumento linear no mesmo período. Quanto à concentração de nutrientes, os autores verificaram que houve um rápido declínio na concentração de P e Fe para as duas espécies e de Zn no meio de cultura da maçã, mas que os níveis destes elementos em 8 semanas não foi deficiente. Mas, Ca e Mg foram deficientes para os explantes no mesmo período.

TEASDALE & RICHARDS (1990) cultivaram células de *Pinus radiata* em suspensão, em meio MS líquido modificado, a 25°C, suplementado com 2 mg/l de ANA em diferentes concentrações de Ca (0,2 mM e 3mM) e Mg (1,5 mM e 7,5 mM). Após 16 dias de cultura, os autores verificaram que nível elevado de Mg (7,5 mM) no meio de cultura provocou um ligeiro aumento na produção de células; e resultado similar foi obtido quando a concentração de Ca (0,2 mM) foi reduzida. Entretanto, quando ambas estas mudanças foram combinadas ([Ca] = 0,2 mM; [Mg] = 7,5 mM), 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 houve um aumento na concentração de Mg.

O crescimento *in vitro* de *Actinidia deliciosa* C.F. Liang cv Hayward e as mudanças na composição mineral do meio e nas diferentes partes dos explantes (calos, caule e folhas), foram analisados após 0, 15, 30, 45 e 60 dias de cultura em cada uma das três sucessivas subculturas de 60 dias por MEZZETTI *et al.* (1991). Os autores observaram que o peso fresco e o peso seco dos explantes aumentaram principalmente durante os primeiros 30 dias de cultura, com um aumento de peso fresco predominantemente nas folhas e uma igual distribuição no peso seco dos calos e das folhas. Os pesos seco e fresco do caule foram menores do que os observados em calos e folhas. Em contra partida, o peso fresco e seco do meio de cultura diminuíram com o tempo. A presença dos explantes induziu um decréscimo do pH inicial (de 5,8 para $\pm 4,8$) do meio de cultura durante os primeiros 15 dias de cultura seguido pelo retorno ao nível inicial até o final da cultura. Os autores verificaram que em relação aos nutrientes do meio de cultura, o conteúdo inicial de P (3,6 mg) no meio de cultura MS foi insuficiente para um cultivo longo. Após 30 dias de cultura, 94,5% do P presente no meio foi absorvido pelos explantes e igualmente distribuído nas diferentes partes da planta. Durante o primeiro mês, 85% do N inicial foi absorvido. No final da cultura, somente 2% do P inicial e 5% do N permaneceram no meio de cultura. Estes dois elementos foram igualmente distribuídos nos calos e folhas durante o primeiro mês de cultura, enquanto que nos 30 dias finais somente aumentou nos calos. A concentração inicial do meio MS de K, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn e Cu foram suficientes para 60 dias de crescimento dos explantes. Sempre todos estes elementos foram absorvidos durante os primeiros 30 dias de cultura. O calo foi o principal lugar para acumulação de todos estes elementos minerais.

VILLEGAS *et al.* (1991) analisaram a influência de N-NO₃ e N-NH₄ na composição mineral de rizomas de 3 variedades de videiras cultivados *in vitro*. Os autores observaram que nos tratamentos com NaNO₃ (5, 10, 15, 20 e 25 mM) induziram um acúmulo de Na, causados pela presença de íons de Na nos sais e um pequeno aumento de N e decréscimo de Ca, e nos tratamentos com (NH₄)₂ SO₂ (5, 10, 15, 20 e 25 mM) houve um grande acúmulo de N, P e Fe e ao mesmo tempo um decréscimo de K em todas as variedades estudadas. Os mesmos

autores observaram que a absorção de N-NH_4 foi maior e menos controlado que N-NO_3 , provocando elevado conteúdo de N nos tecidos e paralelamente induzindo alteração em outros nutrientes, especificamente resultando em nível baixo de K.

KAUL & HOFFMAN (1993) avaliaram o efeito dos íons NO_3^- e NH_4^+ no crescimento de calos de *Pinus strobus* L.. Os calos obtidos dos segmentos do hipocótilo foram mantidos no meio MS modificado suplementado com 0,2 mg/l de ANA conteúdo 18,8 mM de KNO_3 e 20,6 mM de NH_4NO_3 . Entretanto, o crescimento do calo foi totalmente inibido quando NH_4Cl foi usado como fonte de nitrogênio. O efeito inibitório de NH_4Cl foi eliminado adicionando quantidade apropriado de KNO_3 no meio. Os autores observaram que o efeito inibitório no crescimento do calo foi devido ao NH_4^+ e não do íon Cl^- ; ótimo crescimento dos calos ocorreram no meio contendo KCl. A acidificação do meio devido NH_4^+ não foi a causa da inibição do crescimento. Os dados sugerem que a inibição do crescimento dos calos foram causados pelo acúmulo dos níveis tóxicos de NH_4^+ que inibiram a atividade da glutamina sintetase nos tecidos.

ARDUINI *et al.* (1994) observaram o desenvolvimento e morfologia das raízes em plântulas de *Pinus pinea* e *P. pinaster* cultivados em soluções de Gautheret¹ contendo (μM): 500 KCl; 435 NaNO_3 ; 200 MgSO_4 ; 45 NaH_2PO_4 ; 100 CaCl_2 ; 0,37 FeCl_3 ; 0,35 ZnSO_4 ; 1,6 H_3BO_3 ; 0,6 MnSO_4 ; 0,012 CuSO_4 ; 0,021 AlCl_3 ; 0,023 NiSO_4 ; 0,006 KI em pH 5,5. As soluções foram suplementados com 0,0; 0,1; 1; ou 5 μM de CdSO_4 ou com 1 μM CdSO_4 e 1 μM de CuSO_4 combinados. Em ambas as espécies, a elongação da raiz pivotante foi reduzido nos tratamentos com 5 μM de Cd^{2+} e com $\text{Cd}^{2+} + \text{Cu}^{2+}$. O suprimento de 0,1 ou 1 μM de Cd^{2+} aumentou a elongação das raízes em *Pinus pinea* sem significativa influência na elongação da raiz em *P. pinaster*. Nas duas espécies, a densidade da raiz e a largura do cortex, aumentam em resposta a exposição do Cd^{2+} . Em *P. pinaster* o índice mitótico decresceu em elevada concentração de Cd^{2+} e na combinação de Cd^{2+} e Cu^{2+} . Os dados sugerem que a elongação celular foi mais sensível ao Cd^{2+} do que em relação a divisão celular. O número e o comprimento das raízes laterais foi mais afetado pelo tratamento com Cd^{2+} em *P. pinaster* do que em *P. pinea*, refletindo a diferente tolerância nas duas espécies.

Em culturas de calos de duas variedades de *Cocos nucifera* L., DUSSERT *et al.* (1995) observaram que a sacarose e SO_4^{2-} foram absorvidos somente durante a fase lag e no início da fase exponencial do crescimento. E a absorção de H_2PO_4^- e NO_3^- ocorreram somente durante a segunda metade da fase exponencial e o balanço iônico foi mantido pelo K^+ e Cl^- . A organização da zona meristemática nos calos nas duas variedades foi bastante diferente, mas não foi afetado pela nutrição, e nem pelas doses de 2,4-D ($2,7 \times 10^{-4}$ M e $3,6 \times 10^{-4}$ M) em relação ao peso seco. Contudo, foi observado que a hidrólise da sacarose foi influenciado pelo pH do meio na

¹ GAUTHERET, R.J. La culture de tissus vegetaux. Masson & Cie, Paris, 1959.

absorção de NO_3^- e H_2PO_4^- . A absorção dos compostos nitrogenados, no pH extracelular, e a importância do K^+ e Cl^- na manutenção do balanço iônico estariam em conexão com os mecanismos nutricionais do crescimento *in vitro* de calos de *Cocos nucifera*.

SACCHI *et al.* (1995), estudando os parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante duas subculturas de calos de *Actinidia deliciosa*, verificaram que as mudanças nos níveis de K , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Na^+ foram similares nas duas subculturas. Na análise da primeira subcultura, entre o 10º e 35º dia houve um decréscimo do nível de K^+ enquanto que os outros íons mostraram uma tendência a aumentar, após 35 dias de cultura. Os níveis de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} diminuíram enquanto que o Na^+ aumentou drasticamente. Durante os primeiros 10 dias de cultura da segunda subcultura, os níveis de K^+ e Mg^{2+} aumentaram, o nível de Ca^{2+} permaneceu o mesmo, enquanto que o Na^+ diminuiu repentinamente. Entre o 10º e 35º dia de cultura houve um decréscimo no nível de K^+ e um leve aumento dos níveis dos outros íons. Após 30 dias, o nível de K^+ e Ca^{2+} foi essencialmente constante, o nível de Mg^{2+} decresceu, enquanto que o nível de Na^+ aumentou, similar ao observado na primeira subcultura.

LU *et al.* (1995) verificaram a influência da deficiência de ferro e do magnésio na estrutura e organização das membranas do tilacóide em *Arabidopsis thaliana*. Sementes foram germinadas em meio de cultura MS deficientes em magnésio e ferro, por 4 semanas, em fotoperíodo de 12 horas e uma temperatura de 25°C. Após este período, a clorofila e as membranas dos tilacóides foram isolados; e a concentração de clorofila, de proteínas e carotenóides determinadas. Os autores verificaram que na deficiência de Fe ou Mg houve um decréscimo da quantidade de clorofila e proteínas, mas um aumento nas quantidades de carotenóides. A superfície de tensão das membranas dos tilacóides deficientes de Fe ou Mg foi maior em plantas cultivadas em meio de cultura não deficientes, indicando que as membranas dos tilacóides de plantas deficientes de Fe ou Mg são mais facilmente acessados pelos surfactantes. Os autores concluíram que a deficiência de Fe ou Mg resultaram em baixa organização das membranas dos tilacóides em relação ao controle, sendo que as plantas deficientes de Mg resultaram em membranas mais desorganizadas que em deficientes de Fe. E que estas plantas deficientes contém pequenas quantidades de complexos ligados ao fotossistema II.

2.4. Programa Geochem para o cálculo do equilíbrio químico do meio de cultura

O programa Geochem foi inicialmente desenvolvido para o cálculo do equilíbrio químico nas soluções do solo e outros sistemas naturais de água (MATTIGOD & SPOSITO, 1979; SPOSITO & MATTIGOD, 1980). Este programa Geochem é uma versão do

programa de computador REDEQL2, que foi desenvolvido pelo Instituto de Tecnologia da Califórnia por F.M.M. Morel, R.E. McDuff, e J.J. Morgan.

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 aplicado para: 1) predição da concentração dos complexos inorgânicos e orgânicos de um cátion metal na solução do solo; 2) cálculo da concentração de uma substância química particular de um elemento nutriente em uma solução nutriente de plantas, bem como, correlacionar com a absorção de nutrientes; 3) predição do destino de um metal poluente adicionado na solução do solo de características conhecidas e; 4) 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.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no laboratório de Fisiologia das Árvores do Departamento de Ciências Florestais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, em Piracicaba, Estado de São Paulo.

3.1. Material vegetal utilizado

Todos os híbridos utilizados no trabalho foram obtidos de material originário do trabalho de CORREIA (1993), mantidos *in vitro* no laboratório de Fisiologia das Árvores. Os híbridos utilizados foram:

- a) *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*
- b) *E. grandis* x *E. urophylla*
- c) *E. urophylla* x *E. grandis*

3.2. Explante-padrão e condições de crescimento das culturas

Para uniformização das culturas, explantes-padrão foram definidos, os quais consistiam-se de tufo de brotações com parte aérea pouco desenvolvida e peso aproximado de matéria seca de 10 mg/explante (aproximadamente 0,5 cm de diâmetro).

As culturas permaneceram em condições ambientais para o crescimento à temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas e iluminância de 1000 lux, fornecida por luz branca fria localizadas 30 cm acima do nível de cada prateleira, provenientes de 2 lâmpadas de 110 W cada uma, modelo H.O. marca Sylvania.

3.3. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado no trabalho baseou-se no meio JADS, citado por CORREIA (1993). Este meio de cultura foi definido com base em informações bibliográficas sobre teores nutricionais da espécie *E. grandis*, obtidos a partir de vários estudos realizados com materiais juvenis.

Conforme a Tabela 2, a omissão dos elementos minerais, com exceção das vitaminas e hormônios, ocorreu nos tratamentos sem nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio. No tratamento sem enxofre, somente o sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foi substituído por nitrato de magnésio [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], enquanto que as outras fontes de sulfato (SO_4) foram mantidas de acordo com o meio de cultura completo. Nos tratamentos em que se

omitiu os micronutrientes, apenas os sais foram retirados, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (e $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, respectivamente para ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio. E em relação ao boro e cobalto foi retirado o ácido bórico (H_3BO_3) e cloreto de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), respectivamente.

Em todos os tratamentos adicionou-se ao meio de cultura 0,5 mg/l de ácido nicotínico; 0,5 mg/l de piridoxina.HCl; 5,0 mg/l de tiamina.HCl; 100,0 mg/l de inositol; 7,0 mg/l de L-arginina; 146,0 mg/l de L-glutamina; 2,5 mg/l de L-cisteína; 2,4 mg/l de pantotenato de cálcio; 0,2 mg/l de BAP, 0,1 mg/l de ANA e 30 g/l de sacarose. O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ utilizando NaOH a 1 M, antes da autoclavagem, à temperatura de 121°C e à pressão de 1,05 kg/cm, durante 15 minutos.

Após o preparo, o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (25 mm x 150 mm) um volume de 15 ml por tubo. Para sustentar os explantes sobre o meio de cultura utilizou-se resina fenólica “OASIS Espuma Floral” (Smithers-Oasis Company do Brasil) com dimensões de 20 mm x 20 mm x 40 mm. A resina fenólica foi previamente lavado em água corrente por cerca de 10 minutos, e seca em estufa à temperatura de 100°C .

O experimento foi instalado com delineamento estatístico inteiramente casualizado, com 15 repetições para cada híbrido/tratamento.

A duração do experimento foi de 21 dias, com avaliações a cada 7 dias.

Os tratamentos do experimento foram:

a) Completo (testemunha)	h) sem Ferro
b) sem Nitrogênio	i) sem Boro
c) sem Fósforo	j) sem Cobre
d) sem Potássio	k) sem Zinco
e) sem Cálcio	l) sem Manganês
f) sem Magnésio	m) sem Cobalto
g) sem Enxofre	n) sem Molibdênio

3.4. Descrição dos sintomas de deficiência

Em todos os tratamentos foram observados os sintomas de deficiência através das características visuais observadas durante os 21 dias de cultura. Foram fotografadas e descritas as principais características de deficiência de todos os tratamentos.

3.5. Análise da concentração dos nutrientes no material vegetal

As determinações dos elementos químicos do material vegetal foram realizadas no Laboratório de Hidrologia, Ecologia e Nutrição Florestal do Departamento de Ciências Florestais.

As amostras que se constituíram de parte aérea e raiz foram secas (temperatura de 60°C), moídas e submetidas às digestões nítrico perclórica e sulfúrica, onde foram determinadas as concentrações dos elementos nos extratos obtidos, segundo a metodologia descrita por SARRUGE & HAAG (1974).

As determinações de nitrogênio foram realizadas através do método analítico do micro Kjeldahl. Para o fósforo, as determinações foram feitas por colorimetria pelo método vanado-molibdato de amônio enquanto que os teores de potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. As determinações de enxofre foram feitas por turbidimetria da suspensão de sulfato de bário.

3.6. Análise do equilíbrio químico do meio de cultura

O equilíbrio químico dos meios de cultura foi calculado pelo programa para computador Geochem (MATTIGOD & SPOSITO, 1979; SPOSITO & MATTIGOD, 1980).

Antes de inserir os dados ao programa Geochem foi necessário obter a concentração molar total de cada metal e ligante de cada meio de cultura utilizado no trabalho. O pH foi definido para todos os meios de cultura como sendo de 5,8.

Os resultados do equilíbrio químico dos meios de cultura com deficiência de nutrientes minerais foram comparados e discutidos com o meio completo (testemunha).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, constatou-se que na literatura são raros os trabalhos relacionados à diagnose de deficiência *in vitro* para espécies arbóreas, e principalmente para espécies de *Eucalyptus*. Desta forma, os sintomas de deficiência foram comparados com trabalhos realizados em casa-de-vegetação e/ou estufas de algumas espécies de *Eucalyptus* e pelos sintomas amplamente observados para a maioria dos vegetais.

Em relação ao programa para computador Geochem, a dificuldade foi maior, pois não foi possível compará-los com outros trabalhos. O uso do programa Geochem é uma inovação na área de cultura de tecidos.

4.1. Sintomas de deficiência

Em estudos preliminares com os 3 híbridos, cultivados em meio de cultura desprovido de macronutrientes, foi possível definir que os sintomas de deficiência *in vitro* somente se manifestaram até o 15º dia de cultura. Desta forma, foi definido para este estudo a observação dos sintomas de deficiência por um período máximo de 21 dias de cultura.

Muitos sintomas podem estar relacionados à deficiência do elemento em questão, mas também com a toxidez de outros causado pela sua ausência. Desta forma, os resultados do estudo descrevem e discutem a deficiência de cada elemento, tentando relacionar as possíveis causas dos sintomas apresentados.

Durante os 21 dias de cultura, foi observado que o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* apresentou sintomas de deficiência em meio de cultura completo. Entre estes sintomas destacam-se o avermelhamento do caule, clorose internerval e da nervura central das folhas mais velhas, encarquilhamento das folhas e o engrossamento do caule. O meio de cultura completo JADS não foi formulado adequadamente para este híbrido, sugerindo que as concentrações dos nutrientes e/ou a quantidade para cada tubo de ensaio não foram ideais para o seu crescimento. As

Figuras 1, 3 e 5 mostram os 3 híbridos desenvolvidos no meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Na deficiência de nitrogênio, os 3 híbridos apresentaram sintomas conforme a Tabela 3. Os 3 híbridos apresentaram uma inibição das gemas laterais, coloração avermelhada do caule, redução do número de folhas, formação de calos na base do caule e/ou na base dos pecíolos e um aspecto de raquitismo generalizado comparado com explantes crescidos no meio completo. Os sintomas de clorose nas folhas mais velhas, redução do número de folhas, redução da área foliar, inibição das gemas laterais, manchas de antocianinas na lâmina foliar foram características observadas por MELLO *et al.* (1961), WILL (1961), KAUL *et al.* (1966, 1968, 1970), ROCHA FILHO *et al.* (1978) e DELL *et al.* (1995) para espécies de *Eucalyptus* cultivados sob condições *in vivo*. Além desses, SIMÕES & COUTO (1973), HAAG & MEDEIROS (1986), MENGEL & KIRKBY (1987) e MUNIZ & SILVA (1995) também verificaram sintomas semelhantes para outras espécies arbóreas. Em consequência, as plântulas apresentaram crescimento reduzido quando comparado à testemunha (Figuras 1, 3 e 5).

Tabela 3. Sintomas de deficiência de nitrogênio para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de nitrogênio, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • caule avermelhado • clorose na extremidade das folhas mais velhas • clorose na nervura central • coloração levemente avermelhada (antocianinas) nas margens e posterior clorose (generalizada) das folhas mais velhas • formação de calos no pecíolo • inibição das gemas laterais • redução aparente da área foliar • redução do número de folhas • senescência precoce das gemas 	<ul style="list-style-type: none"> • caule avermelhado • folhas novas com coloração marrom (necróticas) • formação de calos na base do caule • inibição das gemas laterais • redução aparente da área foliar • redução do internódio • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • caule avermelhado • clorose das folhas mais velhas • engrossamento do caule • escurecimento (antocianina) e morte das folhas mais novas • formação de calo na base do caule e no pecíolo • inibição das gemas laterais • necrose das gemas apicais • presença de glândulas de óleo nas folhas • redução aparente da área foliar • redução do número de folhas

Os sintomas de deficiência de fósforo para os 3 híbridos estão descritos na Tabela 4. Entre as características de deficiência para os 3 híbridos destacam-se a redução do número de folhas, redução da área foliar e clorose sempre nas folhas mais velhas. Esta clorose acompanhada de pontos necróticos sempre foi observada nas folhas mais velhas e no ápice das folhas mais novas. Os sintomas variaram conforme o híbrido, apresentando inibição da formação de gemas laterais, bem como a diminuição do internódio.

BHYMAYA & KAUL (1966), KAUL *et al.* (1966, 1968, 1970) e ROCHA FILHO *et al.* (1978) diagnosticaram sintomas semelhantes em espécies de *Eucalyptus*, como folhagens relativamente fino e pequeno em tamanho, internódio curto, pouca ramificação e quando comparado à testemunha apresentaram porte inferior. A clorose das folhas mais velhas e pontuações escuras foram também verificadas por MELLO *et al.* (1961) e DELL *et al.* (1995) para espécies de *Eucalyptus*. As Figuras 1, 3 e 5 mostram os 3 híbridos com sintomas de deficiência de fósforo ao lado de plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 4. Sintomas de deficiência de fósforo para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de fósforo, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • clorose e escurecimento do ápice para base das folhas mais velhas • clorose no ápice das folhas mais novas • formação de calos na base do caule • inibição das gemas laterais • presença de glândulas de óleo nas folhas • redução aparente da área foliar • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • caule avermelhado (marrom ou bronzeado) • clorose no ápice das folhas mais novas • encarquilhamento das folhas mais novas • engrossamento e clorose da nervura central nas folhas mais velhas • formação de calos na base do caule • inibição das gemas laterais • presença de glândulas de óleo nas folhas • redução do internódio • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • clorose e pigmentos de coloração avermelha nas folhas mais novas • engrossamento e clorose da nervura central • escurecimento e morte dos ponteiros • formação de calo na base do caule • hiperhidria • inibição das gemas laterais • pontuações de coloração preta nas folhas mais velhas • redução aparente da área foliar • redução do internódio • redução do número de folhas

Os sintomas de deficiência de potássio estão descritos na Tabela 5. Para os híbridos *E. grandis* x *E. tereticornis* e *E. urophylla* x *E. grandis* a deficiência de potássio causaram um aumento da brotação lateral e clorose tanto na lâmina, margem e na nervura central das folhas mais velhas, durante os 21 dias de cultura. O encarquilhamento das folhas mais velhas foi visível no híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*. Foi observado um avermelhamento e/ou escurecimento no ápice das folhas mais novas e nas folhas mais velhas, além do crescimento impariado ou deformado das folhas mais velhas.

O encarquilhamento das folhas mais velhas e o aparecimento de pontuações cloróticas na lâmina foliar também foram observados por KAUL *et al.* (1966; 1970), ROCHA FILHO *et al.* (1978) e DELL *et al.* (1995) para espécies de *Eucalyptus*. Faixas cloróticas nas folhas mais velhas foram observadas também por MUNIZ & SILVA (1995) em mudas de peroba-rosa, *Aspidosperma polyneuron*. As Figuras 1, 3 e 5 mostram os 3 híbridos com sintomas de deficiência de potássio em comparação com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 5. Sintomas de deficiência de potássio para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de potássio, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • clorose nas folhas mais velhas • deformações das folhas mais novas • engrossamento da base do ramo lateral • escurecimento no ápice das folhas mais novas • excesso de brotação lateral • formação de calos na base do caule • hiperhidria • redução do internódio 	<ul style="list-style-type: none"> • caule avermelhado • clorose marginal das folhas mais velhas • crescimento impariado das folhas mais velhas (deformações) • encarquilhamento das folhas mais velhas • engrossamento do caule • escurecimento no ápice das folhas mais novas 	<ul style="list-style-type: none"> • aumento da brotação lateral • avermelhamento no ápice das folhas mais velhas • clorose e engrossamento da nervura central • formação de calos nas folhas • presença de glândulas de óleo nas folhas

Os sintomas de deficiência para cálcio (Tabela 6) mais comuns nos 3 híbridos foram a deformação das folhas, ocasionando um ondulamento da lâmina foliar e um crescimento impariado das folhas. Ao final do 21º dia de cultura foi observado a queda das folhas e ramos nos três híbridos.

Para plântulas de *E. grandis*, KAUL *et al.* (1968) observaram resultados semelhantes, como folhas mais novas com clorose internerval enquanto que nas folhas mais velhas a sua extremidade e margens encurvadas, ou seja com deformidades. DELL *et al.* (1995) também observaram sintomas como expansão impariado nas margens e folhas distorcidos como sintomas de deficiência de cálcio para espécies de *Eucalyptus*. O murchamento da planta e, em estágio mais avançado a queda das folhas foram observados também por MUNIZ & SILVA (1995) em mudas de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron*). As Figuras 1, 3 e 5 mostram os sintomas da omissão de cálcio para os 3 híbridos comparados à testemunha.

Tabela 6. Sintomas de deficiência de cálcio para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de cálcio, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • clorose na nervura central das folhas mais novas • crescimento impariado das folhas • folhas mal formadas • formação de calos na base do caule 	<ul style="list-style-type: none"> • clorose marginal • coloração vermelha na nervura central das folhas • encarquilhamento das folhas mais velhas • formação de calos na base do caule • murcha das folhas mais velhas • pouca brotação lateral 	<ul style="list-style-type: none"> • folhas mal formadas

Os sintomas de deficiência de magnésio foram muito variáveis entre os 3 híbridos (Tabela 7). Semelhante a deficiência de potássio, o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* apresentou folhas mais velhas encarquilhadas.

Foi observado que a clorose internerval iniciava-se sempre a partir das folhas mais velhas, estes sintomas foram descritos por MELLO *et al.* (1961), KAUL *et al.* (1968, 1970) e ROCHA FILHO *et al.* (1978) para espécies de *Eucalyptus*. Sintomas semelhantes foram observados por HAAG *et al.* (1981) para *Gmelina arborea* e por MUNIZ & SILVA (1995) para *Aspidosperma polyneuron*. DELL *et al.* (1995) descreveram além dos sintomas anteriormente descritos para espécies de *Eucalyptus*, anomalias na forma da folha (rostriforme) e o encarquilhamento das folhas mais velhas, sintomas estes que também foram observados neste estudo. As Figuras 1, 3 e 5 mostram os 3 híbridos com sintomas de carência de magnésio em comparação com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 7. Sintomas de deficiência de magnésio para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura, na ausência de magnésio, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • anomalia da folha (mais comprida e fina) • clorose internerval das folhas mais velhas • engrossamento basal do caule • falta de dominância apical • pontos necróticos no ápice das folhas mais velhas evoluindo no sentido da nervura principal 	<ul style="list-style-type: none"> • caule fino e longo • encarquilhamento das folhas mais velhas • formação de calos na base do caule • pouca brotação lateral • presença de glândulas de óleo nas folhas • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • clorose internerval das folhas mais velhas evoluindo no sentido da nervura principal • engrossamento do caule • folhas mal formadas • formação de calos na base do caule e nas folhas • formação de raiz • necrose das folhas mais velhas • presença de glândulas de óleo nas folhas

O aspecto de clorose generalizada das folhas mais velhas com coloração verde-limão e o avermelhamento das folhas mais novas, além da redução da área foliar e redução do número de folhas foram característicos na deficiência de magnésio para os 3 híbridos estudados (Tabela 8). Sintomas semelhantes à deficiência de nitrogênio.

A coloração verde-limão das folhas mais novas foram descritos também por MELLO *et al.* (1961) e ROCHA FILHO *et al.* (1978) para espécies de *Eucalyptus*. Os mesmos sintomas foram observados por HAAG & MEDEIROS (1986) para mudas de algaroba (*Prosopis juliflora*) e por MUNIZ & SILVA (1995) para mudas de *Aspidosperma polyneuron*. MENGEL & KIRKBY (1987) descrevem sintomas semelhantes para outras espécies vegetais. Além da coloração verde-limão, DELL *et al.* (1995) verificaram com o tempo, um avermelhamento nas folhas mais novas em espécies de *Eucalyptus*, como observados neste estudo. As Figuras 1, 3 e 5 mostram os 3 híbridos com sintomas de deficiência de enxofre em comparação com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 8. Sintomas de deficiência de enxofre para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de enxofre, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • ausência de dominância apical • clorose (cor verde-limão) generalizada das folhas mais novas • clorose internerval • coloração verde-limão e avermelhado das folhas mais jovens • folhas mal formadas • presença de glândulas de óleo nas folhas • ramos novos com coloração avermelhado • redução do internódio 	<ul style="list-style-type: none"> • caule avermelhado • clorose das folhas mais novas • engrossamento do caule • hiperhidria • inibição das gemas laterais • redução aparente da área foliar • redução do internódio • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • avermelhamento da nervura central e marginal • avermelhamento do caule • clorose e avermelhamento das folhas mais novas • folhas com coloração verde-limão • redução do internódio

A deficiência de ferro foi caracterizada pela coloração verde clara das folhas, redução da brotação e o estiolamento dos brotos nos 3 híbridos estudados (Tabela 9).

Segundo MENGEL & KIRKBY (1987), as características de deficiência de ferro é similar a deficiência de magnésio, mas que neste estudo não foi observada a redução do internódio. Além do número reduzido de brotos, houve um estiolamento do caule. A coloração verde claro das folhas também foi observada por ROCHA FILHO *et al.* (1978) e DELL *et al.* (1995) para espécies de *Eucalyptus*. As Figuras 1, 2 e 3 mostram os 3 híbridos com sintomas de deficiência de ferro em comparação com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 9. Sintomas de deficiência de ferro para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de ferro, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • ausência de ramificação • caule fino e estiolado • clorose internerval nas folhas mais velhas • folhas de coloração verde claras • pouca brotação • presença de calos na base do caule 	<ul style="list-style-type: none"> • aumento da área foliar • avermelhamento das folhas mais novas • caule grosso e enrugado • pouca brotação e ausência de brotação • deformações da área foliar • folhas com coloração verde claro 	<ul style="list-style-type: none"> • despigmentação das folhas mais novas • folhas de coloração verde claras • presença de calos nas folhas

Os sintomas de deficiência de boro estão apresentados na Tabela 10. Os sintomas mais comuns foram a redução da área foliar, redução do internódio, deformação das folhas e clorose da nervura central.

A característica marcante foi a deformação da lâmina foliar nos três híbridos, como descritas por ROCHA FILHO *et al.* (1978, 1979), MARSCHNER (1986), MENGEL & KIRKBY (1987) e MALAVOLTA (1994). A clorose da nervura central em direção a margem das folhas, clorose em direção do ápice à base das folhas mais velhas, encarquilhamento das folhas e o excesso de brotação foram descritos também por DELL *et al.* (1995) como sintomas de deficiência para espécies de *Eucalyptus*, como observado neste estudo. As Figuras 2, 4 e 6 mostram os 3 híbridos apresentando os sintomas de deficiência em comparação com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 10. Sintomas de deficiência de boro para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de boro, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • caule grosso e redução da ramificação e da brotação • clorose da nervura central em direção a margem das folhas • escurecimento e necrose das gemas apicais e das folhas mais novas • folhas deformadas • presença de calos na base do caule • presença de glândulas de óleo das folhas mais novas • redução do internódio 	<ul style="list-style-type: none"> • caule enrugado e grosso • clorose da nervura central • clorose em direção do ápice à base das folhas mais velhas • encarquilhamento das folhas • folhas deformadas • redução aparente da área foliar • redução do internódio 	<ul style="list-style-type: none"> • engrossamento do caule no pecíolo das folhas • excesso de brotação • folhas pequenas e finas • hiperhidria • presença de glândulas de óleo nas folhas mais velhas • redução aparente da área foliar • redução do internódio

Os sintomas de deficiência de cobre estão apresentados na Tabela 11. O engrossamento do caule foi característico nos 3 híbridos estudados. A forma irregular das folhas foram observados nos híbridos *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*. E a clorose da nervura central nos híbridos *E. grandis* x *E. tereticornis* e *E. grandis* x *E. urophylla*.

Somente o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* apresentou o aspecto “pêndulo”, ou seja folhas viradas para baixo e deformadas, além do caule grosso e enrugado, sintomas estes descritos por MENGEL & KIRKBY (1987) e DELL *et al.* (1995) para a deficiência de cobre. As Figuras 2, 4 e 6 mostram os 3 híbridos desenvolvidos em meio de cultura com omissão de boro em comparação com híbridos desenvolvidos em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 11. Sintomas de deficiência de cobre para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de cobre, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • caule grosso • clorose da nervura central das folhas mais novas • presença de calos na base do caule • redução aparente da área foliar 	<ul style="list-style-type: none"> • caule grosso enrugado e de coloração avermelhado • clorose das nervuras • encarquilhamento das folhas mais velhas • folhas viradas para baixo • lâmina foliar enrugado • pouca brotação 	<ul style="list-style-type: none"> • ausência de ramificação • caule grosso e enrugado • deformação nas folhas • hiperhidria • presença de calos no pecíolo • presença de glândulas de óleo nas folhas

Os sintomas de deficiência de zinco estão apresentados na Tabela 12. A redução do número de folhas e da área foliar foram característicos nesta deficiência para os 3 clones. Manchas avermelhadas foram observados nos ápices das folhas mais novas e velhas e nas gemas apicais.

A morte das gemas ou das regiões de crescimento foi descrita por MALAVOLTA (1994) como característica da deficiência de zinco, observados nos três híbridos. A clorose internerval das folhas mais novas, encarquilhamento das folhas mais velhas e o avermelhamento das folhas mais velhas e o encurtamento do internódio foram descritos como sintomas de deficiência de zinco por DELL *et al.* (1995), para espécies de *Eucalyptus*. As Figuras 2, 4 e 6 mostram os híbridos desenvolvidos em meio de cultura com omissão de zinco em comparação com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 12. Sintomas de deficiência de zinco para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de zinco, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • ápice das folhas mais velhas avermelhadas tornando-se necróticas • clorose das nervuras das folhas novas e velhas • clorose internerval das folhas mais novas • internódio curto • redução aparente da área foliar • redução da ramificação 	<ul style="list-style-type: none"> • avermelhamento das gemas apicais • avermelhamento e necrose do ápice das folhas mais velhas • clorose internerval • encarquilhamento das folhas mais velhas • presença de calos na base do caule • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • avermelhamento e necrose dos ápices das folhas mais velhas • caule grosso e enrugado • gemas apicais de coloração avermelhadas • hiperhidria • internódio curto • pouca brotação • presença de glândulas de óleo • redução aparente da área foliar

Os sintomas de deficiência de manganês estão apresentados na Tabela 13. Para os 3 híbridos foi observado a presença de calos na base do caule. Os sintomas de deficiência foram variáveis nos 3 clones. O híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* foi o que apresentou maior deficiência com aspecto avermelhado do caule e das margens das folhas mais velhas, bem como redução do número de folhas e da área foliar. Os sintomas encontrados para os 3 híbridos não estão de acordo com os autores consultados. Não foi possível diagnosticar sintomas característicos na omissão de manganês. As Figuras 2, 4 e 6 mostram os 3 híbridos desenvolvidos no meio de cultura com carência de manganês comparados com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 13. Sintomas de deficiência de mangânes para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de manganês, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • clorose do ápice das folhas mais velhas • excesso de brotação • internódio curto • presença de calos na base do caule • presença de glândulas de óleo na lâmina das folhas mais novas 	<ul style="list-style-type: none"> • caule de coloração avermelhada e grosso • encarquilhamento das folhas mais velhas • folhas mais novas cloróticas e com avermelhamento na base • margem das folha mais velhas avermelhadas • pouca brotação • presença de calos na base do caule • redução aparente da área foliar • redução do número de folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • ausência de ramificação • excesso de brotação • folhas pequenas • presença de calos na base do caule

Em relação ao cobalto, a despigmentação das folhas foi evidente nos híbridos *E. grandis* x *E. tereticornis* e *E. urophylla* x *E. grandis* (Tabela 14). E para os 3 híbridos foi observado a presença de calos na base do caule. Segundo LÄUCHLI & BIELESKI (1983), os sintomas de deficiência de cobalto de assemelham-se com a deficiência de nitrogênio. Neste estudo não foi possível verificar sintomas característicos para a ausência de cobalto. As Figuras 2, 4 e 6 mostram os 3 híbridos desenvolvidos no meio de cultura sem cobalto comparados com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 14. Sintomas de deficiência de cobalto para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de cobalto, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • clorose da nervura principal • despigmentação e secamento das margens das folhas mais velhas • folhas mais compridas que largas • folhas mais velhas viradas para baixo • presença de calos na base do caule 	<ul style="list-style-type: none"> • ápice das folhas mais velhas com coloração avermelhada • ausência de brotação • caule de coloração avermelhada • folhas mais velhas viradas para baixo ou encarquilhamento • presença de calos na base do caule 	<ul style="list-style-type: none"> • ápice das folhas mais velhas despigmentadas e secas (algumas) • excesso de brotação • presença de calos na base do caule e no pecíolo

A Tabela 15 estão apresentados os sintomas de deficiência de molibdênio para os 3 híbridos. No híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* não foi observado sintomas que possa ser definido como deficientes, apenas a presença de calos na base do caule. Entretanto, para os outros dois híbridos as deficiências foram variados destacando-se a redução da brotação. As características da deficiência descritos por MARSCHNER (1986), MENGEL & KIRKBY (1987) e MALAVOLTA (1994), como redução e deformações na lâmina foliar e clorose uniforme nos órgão mais velhos não foram observados neste trabalho para os 3 híbridos de *Eucalyptus*, após 21 dias de cultura. Seria necessário mais um subcultivo em meio de cultura deficiente de molibdênio para que os sintomas fossem observados. As Figuras 1, 2 e 3 mostram os 3 híbridos desenvolvidos em meio de cultura sem molibdênio comparados com plantas desenvolvidas em meio de cultura completo, após 21 dias de cultura.

Tabela 15. Sintomas de deficiência de molibdênio para os híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis* cultivados em meio de cultura JADS, na ausência de molibdênio, durante 21 dias de cultura.

<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>
<ul style="list-style-type: none"> • presença de calos na base do caule 	<ul style="list-style-type: none"> • ausência de brotação • avermelhamento, secamento e necrose do ápice das folhas mais velhas • caule grosso e enrugado • clorose das nervuras • encarquilhamento das folhas 	<ul style="list-style-type: none"> • clorose apical das folhas mais velhas • hiperhidria • pouca brotação • presença de calos nas folhas e pecíolos • presença de glândulas de óleo nas folhas • redução do internódio

Neste estudo, foi observado que a ausência de certos elementos não provocou sintomas de deficiência marcantes. Isto ocorreu em relação à maioria dos micronutrientes. Os sintomas de deficiência dos micronutrientes provavelmente não foram manifestadas devido ao período da cultura, já que a duração de 21 dias foi definida pelo experimento preliminar, somente com deficiência de macronutrientes. Por outro lado, as deficiências de nitrogênio, cálcio, enxofre, ferro e zinco apresentaram sintomas semelhantes nos 3 híbridos. Outros como cobalto e molibdênio apresentaram características que visualmente não podem ser descritos como sintomas de deficiência destes elementos. Somente com a análise

química dos elementos no material vegetal ou através da predição da concentração dos complexos inorgânicos e orgânicos dos metais e ligantes pode-se realmente chegar a uma conclusão em relação à deficiência.

Foi possível verificar que a deficiência de nutrientes minerais promoveu alterações morfológicas. Essas alterações revelaram-se por meio de sintomas visíveis como redução do crescimento, alterações na coloração das folhas (do amarelecimento ao avermelhamento), alterações na morfologia das folhas (do encarquilhamento a forma “pêndula”) e outras anomalias. A sintomatologia da deficiência foi mais ou menos características para cada nutriente, dependendo também da sua taxa de crescimento e de fatores ambientais, bem como dos fatores genéticos. INGESTAD (1982) revelou que o fator nutricional depende do fluxo de densidade ou a quantidade de nutrientes utilizados por unidade de tempo e unidade de área. A absorção de nutrientes minerais é afetada pela composição do meio de cultura, composição do tecido da planta e o ambiente da cultura (WILLIAMS, 1991), fatores que poderiam prognosticar e/ou predizer a adequada composição do meio de cultura baseada nas análises de tecido de plantas crescidos *in vitro*.

Figura 1. Sintomas de deficiência de nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), cálcio (-Ca), magnésio (-Mg), enxofre (-S) apresentados pelo híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* comparados à testemunha (completo), após 21 dias de cultura.

Figura 2. Sintomas de deficiência de ferro (-Fe), boro (-B), cobre (-Cu), zinco (-Zn), manganês (-Mn), cobalto (-Co), molibdênio (-Mo) apresentados pelo híbrido *E. grandis* x *E. tereticornis* comparados à testemunha (completo), após 21 dias de cultura.

Figura 3. Sintomas de deficiência de nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), cálcio (-Ca), magnésio (-Mg), enxofre (-S) apresentados pelo híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* comparados à testemunha (completo), após 21 dias de cultura.

Figura 4. Sintomas de deficiência de ferro (-Fe), boro (-B), cobre (-Cu), zinco (-Zn), manganês (-Mn), cobalto (-Co), molibdênio (-Mo) apresentados pelo híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* comparados à testemunha (completo), após 21 dias de cultura.

Figura 5. Sintomas de deficiência de nitrogênio (-N), fósforo (-P), potássio (-K), cálcio (-Ca), magnésio (-Mg), enxofre (-S) apresentados pelo híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* comparados à testemunha (completo), após 21 dias de cultura.

Figura 6. Sintomas de deficiência de ferro (-Fe), boro (-B), cobre (-Cu), zinco (-Zn), manganês (-Mn), cobalto (-Co), molibdênio (-Mo) apresentados pelo híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* comparados à testemunha (completo), após 21 dias de cultura.

4.2. Concentração de nutrientes nos híbridos de eucalipto

O valor total dos elementos minerais (Tabela 20) dos híbridos cultivados em meio de cultura com deficiências foram comparados aos dos híbridos cultivados em meio de cultura completo. Os resultados estão mostrados nas Tabelas 16, 17 e 18, respectivamente para os híbridos *E. grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*.

Tabela 16. Comportamento dos elementos minerais no material vegetal do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, cultivados em meios de cultura deficientes em relação ao meio JADS completo, após 21 dias de cultura.

N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Fe	Zn	Na	
Meio de cultura JADS											
Meio de cultura JADS											
-52,66	-2,94	+16,67	+18,37	+11,11	+39,29	+50,00	-10,00	-35,00	-20,00	-24,00	sem N
+18,50	-75,00	-7,41	*	-5,56	+57,14	*	-10,00	+8,00	*	-29,00	sem P
+31,66	+4,41	-11,11	+18,37	+11,11	+53,57	*	+14,00	-6,00	*	-24,00	sem K
+12,23	*	-1,85	-70,41	-47,22	+7,14	+50,00	+14,00	-6,00	+60,00	-29,00	sem Ca
+7,84	-2,94	-9,26	+28,57	-72,22	-10,71	*	+10,00	-11,00	-20,00	-41,00	sem Mg
-5,33	-5,88	-9,26	+10,20	-5,66	-75,00	*	*	-34,00	+20,00	-41,00	sem S
-14,42	*	+25,93	+30,61	+22,22	-21,43	+50,00	+19,00	-88,00	-20,00	-18,00	sem Fe
-7,52	+4,41	+24,07	+30,61	+44,44	-21,43	+50,00	+14,00	-29,00	-60,00	+6,00	sem B
-5,64	*	+24,07	+30,61	+44,44	-46,43	-35,00	+29,00	-23,00	-70,00	+6,00	sem Cu
-8,15	-2,94	+14,81	+30,61	+44,44	-42,86	+150,0	+14,00	-23,00	-70,00	+18,00	sem Zn
-8,15	*	+27,78	+38,78	+33,33	-42,86	+100,0	-81,00	-24,00	-20,00	+6,00	sem Mn
-11,29	-2,94	+20,37	+46,94	+44,44	-17,86	+50,00	+19,00	-30,00	-20,00	-6,00	sem Co
-6,58	*	+22,22	+34,69	+33,33	-50,00	+100,0	+14,00	-31,00	-20,00	*	sem Mo

+ valores maiores do que os da testemunha (completo)

- valores menores do que os da testemunha (completo)

* valores iguais aos da testemunha (completo)

Os resultados da composição mineral das plântulas, após 21 dias de cultura, indicou que a ausência ou deficiência de um determinado elemento no meio de cultura afetou a concentração de outros elementos nas plântulas.

No híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis* (Tabela 16) houve um acúmulo de N, na ausência de P, K, Ca e Mg; P na ausência de K e B; K na ausência de N, Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; Ca na ausência de N, K, Mg, S, Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; Mg na ausência de N, K, Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; S na ausência de N, P, K e Ca; Cu na ausência

de N, Ca, Fe, B, Zn, Mn, Co e Mo; Mn na ausência de K, Ca, Mg, Fe, B, Cu, Zn, Co e Mo; Fe na ausência de P; Zn na ausência de Ca e S, e Na na ausência de B, Cu, Zn, Mn e Co.

Tabela 17. Comportamento dos elementos minerais no material vegetal do híbrido *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, cultivados em meios de cultura deficientes em relação ao meio JADS completo, após 21 dias de cultura.

N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Fe	Zn	Na	
(%)											Meio de cultura JADS
-48,21	-6,78	-2,08	-21,43	-23,53	+76,67	*	-27,00	+31,00	*	-33,00	sem N
-5,21	-72,88	-4,17	-16,07	-17,65	+83,33	*	-19,00	+46,00	*	-20,00	sem P
+27,69	*	-70,83	*	+5,88	+20,00	*	+4,00	+10,00	+11,00	+13,00	sem K
+7,17	*	-2,08	-74,11	-32,35	+53,33	*	*	+2,00	*	-7,00	sem Ca
+13,03	*	+2,08	+7,14	-85,29	-33,33	*	-8,00	+8,00	+33,00	-13,00	sem Mg
-25,73	-5,08	-8,33	-3,57	-5,88	-86,67	*	-4,00	+16,00	-11,00	+27,00	sem S
-14,33	+3,39	+25,00	+25,00	+52,94	-56,67	+50,00	+8,00	-84,00	+11,00	-27,00	sem Fe
-6,19	+11,86	+35,42	+28,57	+64,71	-20,00	+100,0	+4,00	-11,00	-11,00	+13,00	sem B
-7,82	+15,25	+54,17	+25,00	+64,71	-40,00	-30,00	+4,00	-18,00	*	+13,00	sem Cu
-6,84	+8,47	+10,42	+21,43	+52,94	-46,67	+300,0	*	-7,00	-56,00	+13,00	sem Zn
-9,77	+8,47	+25,00	+28,57	+64,71	-40,00	+50,00	-81,00	-5,00	-11,00	*	sem Mn
#	+15,25	+30,21	+29,46	+61,76	-50,00	+25,00	+6,00	-18,00	-17,00	-8,00	sem Co
-6,51	+8,47	+22,92	+39,29	+52,94	-33,33	+50,00	+4,00	-16,00	-11,00	*	sem Mo

+ valores maiores do que os da testemunha (completo)

- valores menores do que os da testemunha (completo)

* valores iguais aos da testemunha (completo)

amostra perdida

Para o híbrido *E. grandis* x *E. urophylla* (Tabela 17) houve um acúmulo de N na ausência de K, Ca e Mg; P na ausência de Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; K e Ca na ausência de Mg, Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; Mg na ausência de K, Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; S na ausência de N, P, K e Ca; Cu na ausência de Fe, B, Cu, Zn, Mn, Co e Mo; Mn na ausência de K, Fe, B, Zn, Mn, Co e Mo; Fe na ausência de N, P, K, Ca, Mg e S; Zn na ausência de K, Mg e Fe e, Na na ausência de K, S, B, Cu e Zn.

Tabela 18. Comportamento dos elementos minerais no material vegetal do híbrido *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*, cultivados em meios de cultura deficientes em relação ao meio JADS completo, após 21 dias de cultura.

N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Fe	Zn	Na	
Meio de cultura JADS											(%)
-68,21	*	+1,96	-38,71	-21,05	+97,30	*	-35,00	+11,00	+122,0	-33,00	sem N
-26,63	-83,82	-17,65	-37,10	-15,79	+24,32	+50,00	-23,00	+61,29	+122,0	-39,00	sem P
+12,50	+4,41	-56,86	-16,13	*	+5,41	*	-4,00	+16,00	+89,00	-22,00	sem K
+22,83	+7,35	+17,65	-83,87	-39,47	+5,41	+50,00	+4,00	+11,00	+11,00	-28,00	sem Ca
-12,50	*	+9,80	+48,39	-86,84	-24,32	+50,00	+8,00	*	-11,00	-28,00	sem Mg
-18,48	-2,95	+17,65	+67,74	+47,37	-86,49	*	*	*	+56,00	-39,00	sem S
-20,38	+4,41	+41,18	+22,58	+47,37	-62,16	+50,00	+8,00	-84,00	+11,00	-17,00	sem Fe
-19,84	+4,41	+33,33	+19,35	+57,89	-54,05	*	+15,00	-16,00	-11,00	+6,00	sem B
-18,48	+7,35	+29,41	+25,81	+47,37	-51,35	-50,00	+15,00	-5,00	-22,00	+11,00	sem Cu
-19,84	*	+27,45	+16,13	+57,89	-37,84	-25,00	+8,00	-13,00	-67,00	+11,00	sem Zn
-22,83	+4,41	+25,49	+9,68	+47,37	-54,05	-50,00	-85,00	-10,00	-33,00	+17,00	sem Mn
-17,12	*	+23,53	+29,03	+47,37	-32,43	+100,0	+12,00	-16,00	-11,00	-17,00	sem Co
-10,33	+7,35	+27,45	+22,58	+47,37	-27,03	+50,00	+12,00	-19,00	+11,00	-6,00	sem Mo

+ valores maiores do que os da testemunha (completo)

- valores menores do que os da testemunha (completo)

* valores iguais aos da testemunha (completo)

Para o híbrido *E. urophylla* x *E. grandis* (Tabela 18) houve um acúmulo de N na ausência de K e Ca; P na ausência de K, Ca, Fe, B, Cu, Mn e Mo; K na ausência de todos os micronutrientes, N, Ca, Mg e S; Ca na ausência de todos os micronutrientes, Mg e S; Mg na ausência de todos os micronutrientes e S; S na ausência de N, P, K e Ca; Cu na ausência de P, Ca, Mg, Fe, Co e Mo; Mn na ausência de Ca, Mg, Fe, B, Cu, Zn, Co e Mo; Fe na ausência de N, P, K e Ca; Zn na ausência de N, P, K, Ca, S e Fe e; Na na ausência de B, Cu, Zn e Mn.

Segundo ROBSON & PITMAN (1983), as interações entre nutrientes em plantas superiores ocorrem quando o suprimento de um nutriente afetam a absorção, distribuição ou função de outro nutriente. Dependendo do suprimento de nutrientes, interações entre nutrientes podem induzir deficiência ou toxidades e podem modificar a resposta ao crescimento e desenvolvimento das plantas.

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 (OLSEN, 1972). Segundo o mesmo autor, 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.

Em consequência das informações observadas pode-se, portanto, descrever as seguintes interações (em *itálico> as interações comuns para os três híbridos):*

Na deficiência de nitrogênio	> K, Ca, Mg, <i>S</i> , Cu	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> <i>S</i> , Fe	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> K, <i>S</i> , Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, P, <i>Mn</i> , Fe, Zn, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, P, K, Ca, Mg, <i>Mn</i> , <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, Ca, Mg, <i>Mn</i> , <i>Na</i>	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de fósforo	> N, <i>S</i> , <i>Fe</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> <i>S</i> , <i>Fe</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> <i>S</i> , Cu, <i>Fe</i> , Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< <i>P</i> , <i>K</i> , Mn, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, <i>P</i> , <i>K</i> , Ca, Mg, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, <i>P</i> , <i>K</i> , Ca, Mg, Mn, <i>Na</i>	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de potássio	> N, P, Ca, Mg, <i>S</i> , Mn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> N, Mg, <i>S</i> , Mn, Fe, Zn, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> N, P, <i>S</i> , Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< <i>K</i> , Fe, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< <i>K</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< <i>K</i> , Ca, Mn, <i>Na</i>	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de cálcio	> N, <i>S</i> , Cu, Mn, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> N, <i>S</i> , Fe, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> N, P, K, <i>S</i> , Cu, Mn, Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< K, <i>Ca</i> , <i>Mg</i> , Fe, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< K, <i>Ca</i> , <i>Mg</i> , <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< <i>Ca</i> , <i>Mg</i> , <i>Na</i>	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de magnésio	> N, <i>Ca</i> , Mn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> N, K, <i>Ca</i> , Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> K, <i>Ca</i> , Cu, Mn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< P, K, <i>Mg</i> , <i>S</i> , Fe, Zn, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< <i>Mg</i> , <i>S</i> , Mn, <i>Na</i>	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, <i>Mg</i> , <i>S</i> , Zn, <i>Na</i>	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)

Na deficiência de enxofre	> Ca, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> Fe, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> K, Ca, Mg, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, P, K, Mg, S, Fe, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, P, K, Ca, Mg, S, Mn, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, P, S, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de ferro	> K, Ca, Mg, Cu, Mn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, S, Fe, Zn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, S, Fe, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de boro	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Mn, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, S, Fe, Zn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, S, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de cobre	> K, Ca, Mg, Mn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Mn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Mn, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, S, Cu, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, S, Fe	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Cu, Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de zinco	> K, Ca, Mg, Cu, Mn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> K, Ca, Mg, Mn, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, P, S, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, S, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Cu, Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de manganês	> K, Ca, Mg, Cu, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, S, Mn, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, S, Mn, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Cu, Mn, Fe, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
Na deficiência de cobalto	> K, Ca, Mg, Cu, Mn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> K, Ca, Mg, Cu, Mn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, P, S, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< S, Fe, Zn, Na	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Fe, Zn, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)

Na deficiência de molibdênio	> K, Ca, Mg, Cu, Mn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	> P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Zn	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)
	< N, S, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>)
	< N, S, Fe, Zn	(<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>)
	< N, S, Fe, Na	(<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>)

As interações dos elementos minerais nas plantas foram descritas por vários autores (OLSEN, 1972; HEWITT & SMITH, 1974; MARSCHNER, 1986; MENGEL & KIRKBY, 1987; LONERAGAN & WEBB, 1993; MALAVOLTA, 1994).

Tabela 19. Interação entre os elementos no processo de absorção (+ aumento, - diminuição)

	inibição ou sinergismo do nutriente mineral																			
elemento	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Co	Cu	Fe	Mn	Mo	Ni	Zn	Cd	Cr	Pb	Na	NO ₃	NH ₄ ⁺
N	+				-	-			-	-				-						
P		+						-	-	-		+	-	±		-	-			
K			+		-															
Ca				+				-	-					-	-		-			
Mg					+					-	-			-						
S						+				-	-					-				
B							+							-						
Co								+		-	-			-						
Cu									+	-	-			-	-					
Fe										+	+		-	+	-					
Mn										-	+			-						
Mo										-		+								+
Ni										-	-		+	-	-					
Zn										-	-			+			-			
Cd										-	-				+					
Cr										-	-					+				
Pb																	+			
Na																		+		
NO ₃		-				-													+	
NH ₄ ⁺						-														+

A Tabela 19 apresenta as interações mais comuns descritas pelos autores acima citados, independente da espécie e do estágio de desenvolvimento da planta como comparação com os obtidos neste estudo. De uma maneira geral, pelas interações nos 3 híbridos, alguns minerais tiveram comportamentos semelhantes nos 3 híbridos, como por exemplo o acúmulo de S na ausência de nitrogênio. Mas por outro lado, existem fatores internos e externos que influenciariam a absorção dos nutrientes como: pH, inibição ou sinergismo com outros íons, níveis de carboidratos, estado iônico interno e as características genéticas da planta (MALAVOLTA, 1994).

JONES JR (1972) descreve, de forma geral, a concentração de micronutrientes que poderiam causar deficiências nas plantas: para boro, menos que 15 ppm (20 a

100 ppm, concentração aceitável e > 200 ppm toxidez); para cobre, menos que 4 ppm (5 a 20 ppm, concentração aceitável); para ferro, menos de 100 ppm (300 a 400 ppm, concentração aceitável em material juvenil); para manganês, menos que 20 ppm (20 a 500 ppm, concentração aceitável e > que 500 ppm toxidez); para molibdênio, menos que 0,10 ppm; e para zinco, menos que 20 ppm (25 a 150 ppm, concentração aceitável e > 400 ppm toxidez). Enquanto para MALAVOLTA (1994), os teores de micronutrientes geralmente considerados adequados para espécies de eucaliptos seriam: para boro de 40-50 ppm; para cobre de 8-10 ppm; para ferro de 150-200 ppm; para manganês de 100-600 ppm; para molibdênio de 0,50-1,0 ppm e para zinco de 40-60 ppm. Conforme as concentrações encontradas no material vegetal dos 3 híbridos (Tabela 20), a concentração de manganês na ausência do elemento estaria abaixo da faixa considerado por MALAVOLTA (1994) como adequado, o mesmo acontecendo para zinco. Mas as concentrações de ferro e cobre estariam acima da faixa considerada adequada com os valores apresentados pelo autor.

Em relação aos macronutrientes, níveis adequados de nitrogênio corresponde cerca de 2-4%; fósforo de 0,3-0,4%; enxofre 0,2-0,5% da matéria seca (MENGEL & KIRKBY, 1987), e potássio de 2-5%, magnésio em torno de 0,5% e para cálcio de 0,1-5% (MARSCHNER 1986), para espécies vegetais. Os valores encontrados, neste trabalho, para nitrogênio e enxofre estão nas faixas descritas por MENGEL & KIRKBY (1987) e para cálcio e potássio como descritas por MARSCHNER (1986). Quando houve a omissão dos macronutrientes, os teores foram inferiores aos descritos pelos autores, ou seja, concentrações consideradas deficientes (Tabela 20).

Tabela 20. Concentração dos elementos minerais do material vegetal dos híbridos *Eucalyptus grandis* x *E. tereticornis*, *E. grandis* x *E. urophylla* e *E. urophylla* x *E. grandis*, após 21 dias de cultivo.

meio de cultura JADS														
nitrogênio (%)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	3,19	1,51	3,78	4,20	3,58	3,44	3,02	2,73	2,95	3,01	2,93	2,93	2,83	2,98
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	3,07	1,59	2,91	3,92	3,29	3,47	2,28	2,63	2,88	2,83	2,86	2,77	#	2,87
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	3,68	1,17	2,7	4,14	4,52	3,22	3,00	2,93	2,95	3,00	2,95	2,84	3,05	3,30
fósforo (%)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	0,68	0,66	0,17	0,71	0,68	0,66	0,64	0,68	0,71	0,68	0,66	0,68	0,66	0,68
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	0,59	0,55	0,16	0,59	0,59	0,59	0,56	0,61	0,66	0,68	0,64	0,64	0,68	0,64
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	0,68	0,68	0,11	0,71	0,73	0,68	0,66	0,71	0,71	0,73	0,68	0,71	0,68	0,73
potássio (%)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	3,24	3,78	3,00	2,88	3,18	2,94	2,94	4,08	4,02	4,02	3,72	4,14	3,90	3,96
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	2,88	2,82	2,76	0,84	2,82	2,94	3,12	3,60	3,90	4,44	3,18	3,60	3,75	3,54
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	3,06	3,12	2,52	1,32	3,60	3,36	3,60	4,32	4,08	3,96	3,90	3,84	3,78	3,90
cálcio (%)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	0,98	1,16	0,98	1,16	0,29	1,26	1,08	1,28	1,28	1,28	1,28	1,36	1,44	1,32
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	1,12	0,88	0,94	1,12	0,29	1,20	1,08	1,40	1,44	1,40	1,36	1,44	1,45	1,56
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	1,24	0,76	0,78	1,04	0,20	1,84	2,08	1,52	1,48	1,56	1,44	1,36	1,60	1,52
magnésio (%)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	0,36	0,40	0,34	0,40	0,19	0,19	0,34	0,44	0,52	0,52	0,52	0,48	0,52	0,48
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	0,34	0,26	0,28	0,36	0,23	0,05	0,32	0,52	0,56	0,56	0,52	0,56	0,55	0,52
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	0,38	0,30	0,32	0,38	0,23	0,05	0,56	0,56	0,60	0,56	0,60	0,56	0,56	0,56
enxofre (%)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	0,28	0,39	0,44	0,43	0,30	0,25	0,07	0,22	0,22	0,15	0,16	0,16	0,23	0,14
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	0,30	0,53	0,55	0,36	0,46	0,20	0,04	0,13	0,24	0,18	0,16	0,18	0,15	0,20
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	0,37	0,73	0,46	0,39	0,39	0,28	0,05	0,14	0,17	0,18	0,23	0,17	0,25	0,27

Continuação da Tabela 20.

meio de cultura JADS													
manganês (ppm)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	210	190	190	240	240	230	210	250	240	270	240	40	240
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	260	190	210	270	260	240	250	280	270	270	260	50	270
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	260	170	200	250	270	280	260	280	300	300	280	40	290
ferro (ppm)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	800	520	860	750	750	710	530	100	570	620	620	610	550
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	610	800	890	670	620	660	710	100	540	500	570	580	510
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	620	690	1000	720	690	620	620	100	520	590	540	560	500
zinco (ppm)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	100	80	100	100	160	80	120	80	40	30	30	80	80
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	90	90	90	100	90	120	80	100	80	90	40	80	80
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	90	200	200	170	100	80	140	100	80	70	30	60	80
sódio (ppm)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	1700	1300	1200	1300	1200	1000	1000	1400	1800	1800	2000	1800	1700
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	1500	1000	1200	1700	1400	1300	1900	1100	1700	1700	1700	1500	1500
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	1800	1200	1100	1400	1300	1300	1100	1500	1900	2000	1800	2100	1700
cobre (ppm)	completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Mo
<i>E. grandis</i> x <i>E. tereticornis</i>	20	30	20	20	30	20	20	30	30	13	50	40	40
<i>E. grandis</i> x <i>E. urophylla</i>	20	20	20	20	20	20	20	30	40	14	80	30	30
<i>E. urophylla</i> x <i>E. grandis</i>	20	20	30	20	30	30	20	30	20	10	15	10	30

4.3. Equilíbrio químico dos meios de cultura

Pelo programa Geochem, foi possível obter a distribuição dos metais e ligantes para cada meio de cultura pelo cálculo do equilíbrio químico. A Tabela 21 mostra o resultado do programa Geochem ou seja, a distribuição primária de cada componente (metal e ligante), juntamente com as suas possíveis formas químicas.

Os valores apresentados na Tabela 22 representam a distribuição de cada componente (metal e ligante) juntamente com as suas formas químicas, em mM. Foi possível verificar que a distribuição dos componentes, quando se retira um determinado elemento, alterou o equilíbrio químico e consequentemente a disponibilidade dos metais e ligantes para as plantas. Esta disponibilidade para as plantas poderia causar um desequilíbrio no seu crescimento e desenvolvimento. Desta forma, pela Tabela 23, foi possível verificar o comportamento dos metais e ligantes em relação ao meio de cultura completo. Estes dados foram obtidos através dos valores em mM da Tabela 22. Os asteriscos (*) representam valores semelhantes ao meio completo.

Pelos resultados, observa-se que na maioria dos tratamentos, com exceção dos tratamentos sem boro, cobalto e molibdênio, houve alterações nas concentrações dos metais e ligantes em relação ao meio completo. Estequiometricamente, pelo programa Geochem, a ausência do H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não influenciou as concentrações dos metais e ligantes nos respectivos meios de cultura.

Para os metais Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} e o ligante PO_4^{3-} , o tratamento sem o zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) diminuiu a concentração nas suas formas livres, respectivamente 14,05%, 11,70%, 25,78% e 33,33% para os metais e 7,37% para o ligante.

O tratamento sem fósforo aumentou em 46,93% e o tratamento sem manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) diminuiu 57,14% a concentração livre de Fe^{2+} . E o K^+ livre sofreu uma redução na concentração de 17,93% no tratamento sem magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). A ausência de nitrogênio ocasionou os maiores aumentos na concentração de SO_4^{2-} livre (123,42%) e do Cl^- (476565,87%) em relação ao meio completo. O aumento do SO_4^{2-} pode ser devido a substituição do KNO_3 por K_2SO_4 e do cloro pela substituição da fonte de cálcio [de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ por $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. No tratamento sem cálcio, os maiores aumentos foram verificados nos ligantes NH_3^- (122,34%), PO_4^{3-} (8,82%) e MoO_4^{2-} (1293,75%) em relação ao meio completo. E a ausência do enxofre ocasionou uma diminuição da concentração dos ligantes NH_3^- (75,29%), e NO_3^- (22,19%).

Além das alterações das concentrações dos metais e ligantes livres a Tabela 23 mostra as modificações das concentrações das interações que ocorreram em cada tratamento, ou seja, os metais com SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- e EDTA^{4-} e os ligantes com Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e H^+ . Desta forma, as alterações da distribuição dos metais e ligantes livres nos meios de cultura deficientes foram:

Na ausência de nitrogênio	$> \text{SO}_4^{2-}, \text{Cl}^-, \text{MoO}_4^{2-}$ $< \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$
Na ausência de fósforo	$> \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{SO}_4^{2-},$
Na ausência de potássio	$> \text{NH}_3^-$ $< \text{NO}_3^-, \text{MoO}_4^{2-}$
Na ausência de cálcio	$> \text{NH}_3^-, \text{MoO}_4^{2-}, \text{SO}_4^{2-}, \text{PO}_4^{3-}$ $< \text{Mg}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{NO}_3^-$
Na ausência de magnésio	$> \text{NH}_3^-, \text{PO}_4^{3-}$ $< \text{K}^+, \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}, \text{MoO}_4^{2-}, \text{NO}_3^-$
Na ausência de enxofre	$> \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{NO}_3^-$ $< \text{NH}_3^-, \text{PO}_4^{3-}, \text{MoO}_4^{2-}$
Na ausência de ferro	$> \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}$ $< \text{Na}^+, \text{SO}_4^{2-}, \text{PO}_4^{3-}, \text{MoO}_4^{2-}$
Na ausência de boro	não houve alterações
Na ausência de cobre	$< \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}$
Na ausência de zinco	$< \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}, \text{PO}_4^{3-}, \text{MoO}_4^{2-}$
Na ausência de manganês	$> \text{PO}_4^{3-}$ $< \text{Fe}^{2+}, \text{SO}_4^{2-}, \text{MoO}_4^{2-}$
Na ausência de cobalto	$< \text{Fe}^{2+}$
Na ausência de molibdênio	não houve alterações

Continuação da Tabela 21

		Meio de cultura JADS													
		Completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
metais		----- % -----													
Na ⁺	livre	97,8	95,9	97,5	97,8	97,5	98,1	99,1	97,9	97,8	97,8	97,3	97,9	97,8	97,8
	com SO ₄ ²⁻	1,5	3,3	2,1	1,6	1,9	1,2	0,1	1,4	1,5	1,5	1,9	1,5	1,5	1,5
	com PO ₄ ³⁻	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
	com NO ₃ ⁻	0,4	0	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4
	com Cl ⁻	0	0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fe ²⁺	livre	19,6	18,4	28,8	19	17,5	18,8	20,9	0	19,6	18,7	13,7	8,4	19,4	19,6
	com SO ₄ ²⁻	1,8	3,9	3,8	2	2,3	1,5	0,2	0	1,8	1,7	2,7	0,8	1,8	1,8
	com PO ₄ ³⁻	14,5	13,5	0	15	15,3	15,9	15	0	14,5	13,9	16	6,2	14,4	14,5
	com EDTA ⁴⁻	63,8	64,1	66,9	63,7	64,6	63,4	63,5	0	63,8	65,3	67,2	84,5	64,1	63,8
	com NO ₃ ⁻	0,3	0	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3
Mn ²⁺	livre	38	35	47,4	37,1	34,7	37,2	41	75,5	38,1	36,8	28,2	0	37,8	38
	com SO ₄ ²⁻	4,4	9,3	7,8	5	5,7	3,8	0,5	8,5	4,4	4,3	6,9	0	4,4	4,4
	com PO ₄ ³⁻	7,4	6,8	0	7,8	8,1	8,3	7,8	14,5	7,4	7,2	9	0	7,3	7,4
	com EDTA ⁴⁻	49,4	48,7	43,9	49,5	51	50	49,8	0	49,4	51,1	55	0	49,7	49,4
	com NO ₃ ⁻	0,7	0	0,8	0,6	0,5	0,7	0,9	1,4	0,7	0,7	0,8	0	0,7	0,7
	com Cl ⁻	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continuação da Tabela 21.

		Meio de cultura JADS													
		Completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
metais		%													
Cu ²⁺	com EDTA ⁴⁻	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100	100	100	100
	livre	0	0	0	0	0	0	0	31,1	0	0	0	0	0	0
	com SO ₄ ²⁻	0	0	0	0	0	0	0	4,4	0	0	0	0	0	0
	com NH3	0	0	0	0	0	0	0	55,9	0	0	0	0	0	0
	com PO ₄ ³⁻	0	0	0	0	0	0	0	7,7	0	0	0	0	0	0
	com NO ₃ ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0,8	0	0	0	0	0	0
	com OH ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0
Zn ²⁺	com EDTA ⁴⁻	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	0	100	100	100
	livre	0	0	0	0	0	0	0	76,8	0	0	0	0	0	0
	com SO ₄ ²⁻	0	0	0	0	0	0	0	10,9	0	0	0	0	0	0
	com PO ₄ ³⁻	0	0	0	0	0	0	0	9,9	0	0	0	0	0	0
	com B(OH) ₄ ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0
	com NO ₃ ⁻	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0	0	0	0	0
Co ²⁺	livre	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	79,8	0,3	0,3	0,2	0	0	0,3
	com EDTA ⁴⁻	99,6	99,6	99,5	99,6	99,6	99,6	99,6	0	99,6	99,6	99,7	99,9	0	99,6
	com PO ₄ ³⁻	0	0	0	0	0	0	0	7,2	0	0	0	0	0	0
	com SO ₄ ²⁻	0	0	0	0	0	0	0	11,3	0	0	0	0	0	0
	com B(OH) ₄ ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0
	com NO ₃ ⁻	0	0	0	0	0	0	0	1,4	0	0	0	0	0	0

Continuação da Tabela 21.

		Meio de cultura JADS													
		Completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
ligantes		%													
SO ₄ ²⁻	livre	75,4	76,4	75,5	75,7	86	78,8	72,8	74,4	75,4	75,4	56,2	74,7	75,4	75,4
	com Ca ²⁺	14	13,3	13,9	15,9	0	17,7	15,7	14,5	14	14	25,9	14,5	14	14
	com Mg ²⁺	7	6,6	7,1	7,9	9,4	0	7,8	7,3	7	7	13,3	7,3	7	7
	com K ⁺	3,2	3,3	3,1	0	4,1	3	3,2	3,3	3,2	3,2	4	3,3	3,2	3,2
	com Na ⁺	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	com Fe ²⁺	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1
Cl ⁻	com Mn ²⁺	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0	0,1	0,1
	livre	98,5	98,5	98,5	98,8	99,2	98,8	98,3	98,4	98,5	98,5	97,8	98,4	0	98,5
	com Ca ²⁺	0,7	0,7	0,7	0,8	0	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	1,1	0,8	0	0,7
	com Mg ²⁺	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4	0	0,4
	com K ⁺	0,4	0,4	0,4	0	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0	0,4
	com H ⁺	99,9	0	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
PO ₄ ³⁻	com Ca ²⁺	8,4	7,7	0	8,9	0	9,7	8,9	8,3	8,4	8,4	11,5	8,3	8,4	8,4
	com Mg ²⁺	6,6	5,9	0	6,9	7,5	0	6,9	6,5	6,6	6,6	9,3	6,5	6,6	6,6
	com K ⁺	1,1	1,1	0	0	1,2	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
	com Fe ²⁺	1	0,9	0	1	1	1,1	1	0	1	0,9	1,1	0,4	1	1
	com Mn ²⁺	0,2	0,2	0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,2	0,2	0,3	0	0,2	0,2
	com H ⁺	82,7	84,1	0	82,9	90	88	81,9	83,5	82,7	82,7	82,7	76,6	83,6	82,7

Continuação da Tabela 21.

Meio de cultura JADS														
	Completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
ligantes														
EDTA ⁴⁻	1,6	1,6	1,2	1,7	0	1,7	1,7	0	1,6	1,7	2,2	5	1,7	1,6
	63,8	64,1	66,9	63,7	64,6	63,4	63,5	0	63,8	65,3	67,2	84,5	64,1	63,8
	24,2	23,9	21,5	24,2	25	24,5	24,4	0	24,2	25	27,6	0	24,4	24,2
	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0	2,5	0	2,5	2,5	2,5	2,5
	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	0	7,4	7,4	0	7,4	7,4	7,4
com Co ²⁺	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0,5
B(OH) ₄ ⁻	com H ⁺	99,9	99,9	99,8	99,9	99,9	99,9	99,7	0	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
	com Mn ²⁺	0	0	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0
MoO ₄ ²⁻	livre	1,6	1,7	1,6	1,4	22,3	1,4	1,4	1,5	1,6	0,6	1,5	1,6	0
	com Ca ²⁺	93,7	93,6	93,6	93,9	0	98,6	94	93,8	93,7	94,5	93,8	93,7	0
	com Mg ²⁺	4,7	4,6	4,8	4,7	77,3	0	4,6	4,7	4,7	4,9	4,7	4,7	0
	com H ⁺	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0
NO ₃ ⁻	livre	98,4	0	98,4	98,8	99,3	98,5	98,3	98,4	98,4	97,8	98,4	98,4	98,4
	com Ca ²⁺	1	0	1	1	0	1,1	1,1	1	1	1,4	1	1	1
	com Mg ²⁺	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
	com K ⁺	0,5	0	0,5	0	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5

Continuação da Tabela 22.

		Meio de cultura JADS													
		completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
ligantes		----- mM -----													
PO ₄ ³⁻	total	2,9981	2,9981	0,0000	2,9993	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981	2,9981
	com H ⁺	2,4794	2,5214	0,0000	2,4864	2,6983	2,6383	2,4555	2,5034	2,4794	2,4794	2,2966	2,5064	2,4794	2,4794
	com Ca ²⁺	0,2518	0,2309	0,0000	0,2669	0,0000	0,2908	0,2668	0,2488	0,2518	0,2518	0,3448	0,2488	0,2518	0,2518
	com Mg ²⁺	0,1979	0,1769	0,0000	0,2070	0,2249	0,0000	0,2069	0,1949	0,1979	0,1979	0,2788	0,1949	0,1979	0,1979
	com K ⁺	0,0330	0,0330	0,0000	0,0000	0,0360	0,0300	0,0330	0,0330	0,0330	0,0330	0,0360	0,0330	0,0330	0,0330
	com Fe ²⁺	0,0300	0,0270	0,0000	0,0300	0,0300	0,0330	0,0300	0,0000	0,0300	0,0270	0,0330	0,0120	0,0300	0,0300
	com Mn ²⁺	0,0060	0,0060	0,0000	0,0090	0,0090	0,0090	0,0090	0,0150	0,0060	0,0060	0,0090	0,0000	0,0060	0,0060
	com H ⁺	2,4794	2,5214	0,0000	2,4864	2,6983	2,6383	2,4555	2,5034	2,4794	2,4794	2,2966	2,5064	2,4794	2,4794
EDTA ⁴⁻	total	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001	0,0000	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001	0,2001
	com Ca ²⁺	0,0032	0,0032	0,0024	0,0034	0,0000	0,0034	0,0034	0,0000	0,0032	0,0034	0,0044	0,0100	0,0034	0,0032
	com Fe ²⁺	0,1277	0,1283	0,1339	0,1275	0,1293	0,1269	0,1271	0,0000	0,1277	0,1307	0,1345	0,1691	0,1283	0,1277
	com Mn ²⁺	0,0484	0,0478	0,0430	0,0484	0,0500	0,0490	0,0488	0,0000	0,0484	0,0500	0,0552	0,0000	0,0488	0,0484
	com Cu ²⁺	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050	0,0000	0,0050	0,0000	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
	com Zn ²⁺	0,0148	0,0148	0,0148	0,0148	0,0148	0,0148	0,0148	0,0000	0,0148	0,0148	0,0000	0,0148	0,0148	0,0148
	com Co ²⁺	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0000	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0000	0,0010
B(OH) ₄ ⁻	total	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0000	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501
	com H ⁺	0,0501	0,0501	0,0500	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0500	0,0000	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501
	com Mn ²⁺	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Continuação da Tabela 22.

		Meio de cultura JADS													
		completo	sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
ligantes		----- mM -----													
MoO ₄ ²⁻	total	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0000
	livre	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	com Ca ²⁺	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0000	0,0010	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0009	0,0000
	com Mg ²⁺	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	com H ⁺	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
NO ₃ ⁻	total	22,0517	0,0000	22,0517	18,0978	17,0017	20,0030	25,0037	22,0517	22,0517	22,0517	22,0517	22,0517	22,0517	22,0517
	livre	21,6989	0,0000	21,6989	17,8806	16,8827	19,7030	24,5786	21,6989	21,6989	21,6989	21,5665	21,6989	21,6989	21,6989
	com Ca ²⁺	0,2205	0,0000	0,2205	0,1810	0,0000	0,2200	0,2750	0,2205	0,2205	0,2205	0,3087	0,2205	0,2205	0,2205
	com Mg ²⁺	0,0221	0,0000	0,0221	0,0181	0,0170	0,0000	0,0250	0,0221	0,0221	0,0221	0,0441	0,0221	0,0221	0,0221
	com K ⁺	0,1103	0,0000	0,1103	0,0000	0,0850	0,0800	0,1250	0,1103	0,1103	0,1103	0,1323	0,1103	0,1103	0,1103

Tabela 23. Comparação da distribuição dos metais e ligantes dos tratamentos com ausência de macro e micronutrientes em relação ao meio JADS (CORREIA, 1993) completo.

		Meio de cultura JADS												
		sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
metais		----- % -----												
Ca²⁺	total	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
	livre	-8,41	1,35	-1,23		*	8,63	*	*	*	-14,05	*	*	*
	com SO ₄ ²⁻	107,58	43,15	13,68		-12,63	-89,47	-3,15	*	*	80,00	-1,05	*	*
	com PO ₄ ³⁻	-9,70		3,92		13,72	3,92	-1,96	*	*	35,29	-1,96	*	*
	com NO ₃ ⁻		*	-11,90		4,76	28,57	7,14	*	*	47,61	4,76	*	*
Mg²⁺	total	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*
	livre	-9,33	3,54	-1,53	-4,13		7,66	*	*	*	-11,70	*	*	*
	com SO ₄ ²⁻	107,69	47,43	14,10	35,89		-89,74	-2,56	*	*	87,17	*	*	*
	com PO ₄ ³⁻	-10,60		4,54	13,63		4,53	-1,51	*	*	40,90	-1,51	*	*
	com NO ₃ ⁻		*	-20,00	-20,00		19,98	*	*	*	30,00	*	*	*
K⁺	total	*	*		*	-18,18	*	*	*	*	*	*	*	*
	livre	*	*		*	-17,93	*	*	*	*	*	*	*	*
	com SO ₄ ²⁻	120,00	40,03		30,00	-34,54		*	*	*	30,00	*	*	*
	com PO ₄ ³⁻				*	-18,18	*	*	*	*	*	*	*	*
	com NO ₃ ⁻		*		-20,00	-26,36	10,00	*	*	*	20,00	*	*	*
Na⁺	total	*	*	*	*	*	*	-99,50	*	*	*	*	*	*
	livre	-1,94	*	*	*	*	1,32	-99,50	*	*	*	*	*	*
	com SO ₄ ²⁻	120,00	40,00	6,66	26,66	-20,00	-93,33	-99,54	*	*	26,66	*	*	*
	com PO ₄ ³⁻	*		*	*	*	*	-99,50	*	*	*	*	*	*
	com NO ₃ ⁻		*	-25,00	-25,00	*	*	-99,50	*	*	25	*	*	*
Fe²⁺	total	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
	livre	-6,12	46,93	-3,06	-10,714	-4,08	6,63		*	-4,59	-30,10	-57,14	-1,02	*
	com SO ₄ ²⁻	116,66	111,11	11,11	27,77	-16,66	-88,88		*	-5,55	50,00	-55,55	*	*
	com PO ₄ ³⁻	-6,89		3,44	5,51	9,65	3,44		*	-4,13	10,34	-57,24	*	*
	com EDTA ⁴⁻	*	4,85	*	1,25	*	*		*	2,35	5,32	32,44	*	*
	com NO ₃ ⁻		66,66	*	*	*	33,33		*	*	33,33	-33,33	*	*

* valor semelhante ao observado no meio de cultura completo

Continuação da Tabela 23.

		Meio de cultura JADS												
		sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
metais		----- % -----												
Mn²⁺	total	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*
	livre	-7,89	24,73	-2,36	-8,68	-2,10	7,89	98,68	*	-3,15	-25,78		*	*
	com SO ₄ ²⁻	111,36	77,27	13,63	29,54	-13,63	-88,63	93,18	*	-2,27	56,81		*	*
	com PO ₄ ³⁻	-8,10		5,40	9,45	12,16	5,40	95,94	*	-2,70	21,62		-1,35	*
	com EDTA ⁴⁻	-1,41	-11,13	*	3,23	1,21	*		*	3,44	11,33		*	*
	com NO ₃ ⁻		14,28	-14,28	-28,57	*	28,57	100,00	*	*	14,28		*	*
Cu²⁺	total	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	com EDTA ⁴⁻	*	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*
Zn²⁺	total	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*
	com EDTA ⁴⁻	*	*	*	*	*	*		*	*		*	*	*
Co²⁺	total	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
	livre	*	33,33	*	*	*	*	2650,00	*	*	-33,33			*
	com EDTA ⁴⁻	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*		*

* valor semelhante ao observado no meio de cultura completo

Continuação da Tabela 23.

		Meio de cultura JADS												
		sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
ligantes		----- % -----												
SO ₄ ²⁻	total	120,49	45,18	*	*	-30,11	-90,36	-6,02	*	*	*	-3,01	*	*
	livre	123,42	45,38	*	14,05	-26,96	-90,69	-7,27	*	*	-25,80	-3,91	*	*
	com Ca ²⁺	109,47	44,15	13,57		-11,64	-89,19	-2,66	*	*	84,16	*	*	*
	com Mg ²⁺	107,89	47,26	12,85	34,28		-89,26	-1,99	*	*	89,14	1,14	*	*
	com K ⁺	127,39	40,65		28,12	-34,48	-90,36	-3,08	*	*	24,43	*	*	*
	com Na ⁺	120,49	45,18	*	*	-30,11	-90,36	-6,02	*	*	*	-3,01	*	*
	com Fe ²⁺	120,49	190,37	*	*	-30,11	-90,36		*	*	99,09		*	*
	com Mn ²⁺	120,49	190,37	*	100,00	39,77	-90,36	181,93	*	*	99,09		*	*
Cl ⁻	total	476339,10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
	livre	476565,87	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*
	com Ca ²⁺	476565,87	*	14,28		14,28	14,28	14,28	*	*	57,14	14,28		*
	com Mg ²⁺	357399,40	*	*	*		*	*	*	*	50,00	*		*
	com K ⁺	476565,87	*		*	-25,00	*	*	*	*	25,00	*		*
NH ₃ ⁻	total		*	100,00	122,34	48,22	-75,29	*	*	*	*	*	*	*
	com H ⁺		*	100,00	122,34	48,22	-75,29	*	*	*	*	*	*	*
PO ₄ ³⁻	total	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	com Ca ²⁺	-8,33		5,995		15,476	5,95	-1,19	*	*	36,90	-1,19	*	*
	com Mg ²⁺	-10,60		4,588	13,63		4,54	-1,51	*	*	40,90	-1,51	*	*
	com K ⁺	*			9,09	-9,09	*	*	*	*	9,09	*	*	*
	com Fe ²⁺	-10,00		*	*	10,00	*		*	-10,00	10,00	-60,00	*	*
	com Mn ²⁺	*		50,06	50,00	50,00	50,00	150,00	*	*	50,00		*	*
	com H ⁺	1,69		*	8,82	6,40	-1,00	1,00	*	*	-7,37	1,08	*	*

* valor semelhante ao observado no meio de cultura completo

Continuação da Tabela 23.

		Meio de cultura JADS												
		sem N	sem P	sem K	sem Ca	sem Mg	sem S	sem Fe	sem B	sem Cu	sem Zn	sem Mn	sem Co	sem Mo
ligantes		----- % -----												
EDTA ⁴⁻	total	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
	com Ca ²⁺	*	-25,00	6,25		6,25	6,25		*	6,25	37,50	212,50	6,25	*
	com Fe ²⁺	*	4,85	*	1,25	*	*		*	2,35	5,32	32,44	*	*
	com Mn ²⁺	-1,24	-11,15	*	3,30	1,24	*		*	3,30	14,05		*	*
	com Cu ²⁺	*	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*
	com Zn ²⁺	*	*	*	*	*	*		*	*		*	*	*
	com Co ²⁺	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*		*
B(OH) ₄ ⁻	total	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*
	com H ⁺	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*
MoO ₄ ²⁻	total	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	livre	6,25	*	-12,50	1293,75	-12,50	-12,50	-6,25	*	*	-6,25	-6,25	*	
	com Ca ²⁺	*	*	*		5,22	*	*	*	*	*	*	*	
	com Mg ²⁺	-2,12	2,12	*	1544,6		-2,12	*	*	*	4,255	*	*	
	NO ₃ ⁻ total		*	-17,93	-22,90	-9,29	13,38	*	*	*	*	*	*	*
	livre		*	-17,59	-22,19	-9,19	13,27	*	*	*	*	*	*	*
	com Ca ²⁺		*	-17,93		*	24,72	*	*	*	40,00	*	*	*
	com Mg ²⁺		*	-17,93	-22,90		13,38	*	*	*	100,00	*	*	*
	com K ⁺		*		-22,90	-27,43	13,38	*	*	*	20,00	*	*	*

* valor semelhante ao observado no meio de cultura completo

O programa Geochem mostra o balanço químico dos macro e micronutrientes dos meios de cultura estudados neste trabalho, mas este programa não permite a inclusão dos hormônios e vitaminas, bem como dos açúcares. Os resultados poderiam ser diferentes com a inclusão das concentrações de vitaminas, hormônios e açúcares, mas como modelo teórico foi possível simular as condições de balanço químico do meio de cultura. Portanto, comparando os resultados das interações das concentrações dos nutrientes minerais do material vegetal com os resultados do programa Geochem (modelo teórico) seria possível constatar o acúmulo ou diminuição dos nutrientes na planta, diagnosticando-se a sua deficiência para certos nutrientes e vice-versa (Tabela 24)

Tabela 24. Acúmulo (+) ou redução (-) induzido pela interação dos nutrientes do material vegetal e do meio de cultura sob condições de deficiência

deficiência	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	Co	Na
N	-					+				-		
P		-				+	+					
K	+		-									
Ca	+			-	-	+						
Mg					-	-						
S	-	-				-						
Fe						-	-			+		-
Cu						-	-	-				
Zn						-	-		-			
Mn						-	-			-		
Co							-				-	

Os resultados (Tabela 24) confirmaram a tendência para o acúmulo ou diminuição dos elementos minerais na sua deficiência. Desta forma, o programa Geochem poderia auxiliar, mesmo que de forma teórica (interpretativa), o comportamento dos metais e ligantes nos meios de cultura.

5. CONCLUSÕES

- A metodologia utilizando balanço químico do meio de cultura e das concentrações dos nutrientes do material vegetal mostraram as diferentes exigências nutricionais para cada híbrido.
- Os híbridos se comportaram de maneira diferenciada à deficiência de nutrientes comprovando que a absorção depende não somente da relação e/ou interação dos nutrientes, mas também dos fatores genéticos.
- Esta metodologia apresentou respostas mais rápidas e típicas na diagnose e avaliações das deficiências quando comparados com experimentos *ex vitro*.
- Muitos sintomas de deficiência *in vitro* foram novos em relação aos sintomas descritos nas condições *ex vitro*.
- A ausência de certos elementos não provocou sintomas de deficiência marcantes. Isto ocorreu em relação à maioria dos micronutrientes. Por outro lado, deficiências de N, Ca, S, Fe e Zn apresentaram sintomas semelhantes nos 3 híbridos.
- Através da comparação dos resultados das interações dos nutrientes do material vegetal e do meio de cultura com os resultados do programa Geochem, modelo teórico, permitiu constatar o acúmulo ou diminuição dos nutrientes na planta, diagnosticando-se a sua demanda e eficiência nutricional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅGREN, G.I. Theory for growth of plants derived from the nitrogen productivity concept. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **64**(1): 17-28, 1985.
- ARDUINI, I.; GODBOLD, D.L.; ONNIS, A. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **92**(4): 675-80, 1994.
- BHYMAYA, C.P. & KAUL, R.N. Levels os macro and micro elements in *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (*E. rostrata* Schlecht). *Nature*, London, **212**: 319-20, 1966.
- BRENNAN, R.F.; ARMOUR, J.D.; REUTER, D.J. Diagnosis of zinc deficiency. In: ROBSON, A.D., ed. *Developments in plant and soil sciences*. vol. 55., Dordrecht, Kluwer, 1993. p.167-181
- BROWN, P.H.; CAKMAK, I.; ZHANG, Q. Form and function of zinc plants. In: ROBSON, A.D., ed. *Developments in plant and soil sciences*. vol. 55., Dordrecht, Kluwer, 1993. p.93-105.
- 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 de Mestrado - ESALQ/USP)
- DELL, B.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. *Nutrient disorders in plantation eucalyptus*. Canberra City, ACIAR, 1995. 110p.
- DUGGER, W.M. Boron in plant metabolism. In: LÄUCHLI, A & BIELESKI, R.L., ed. *Inorganic Plant Nutrition*. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Berlin, Springer-Verlag, 1983. v.15B p.625-50.
- DUSSERT, S.; VERDEIL, J.L.; RIVAL, A.; NOIROT, M.; BUFFART-MOREL, J. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. *Plant Science*, Limerick, **106**(2): 185-93, 1995.
- EPSTEIN, E. *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1975. 341p.
- EVANS, H.J. & SORGER, G.J. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, **17**: 44-77, 1966.
- HAAG, H.P. & MEDEIROS, A.A. Desnutrição de macronutrientes em plantas de algaroba. IPEF, Piracicaba, (32): 53-5, 1986.

- 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 das deficiências dos macronutrientes e composição mineral. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. v.2 p926-932
- HEWITT E.J. & SMITH, T.A. **Plant mineral nutrition**. London, Unibooks, 1974. 298p.
- INGESTAD, T. Studies on the nutrition of forest tree seedlings I. Mineral nutrition of birch. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 10: 418-39, 1957.
- INGESTAD, T. Mineral nutrition requirements of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 45(4): 373-80, 1979a.
- INGESTAD, T. Nitrogen stress in birch seedlings. II. N, P, K, Ca, and Mg nutrition. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 45(1): 149-57, 1979b.
- INGESTAD, T. Relative addition rate and external concentration: driving variables used in plant nutrition research. **Plant Cell Environmental**, 5: 443-53, 1982.
- INGESTAD, T. New concepts on soil fertility and plant nutrition as illustrated by research on forest trees and stands. **Geoderma**, 40(3-4): 237-52, 1987.
- INGESTAD, T. & ÅGREN, G.I. Theories and methods on plant nutrition and growth. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 84(1): 177-84, 1992.
- INGESTAD, T. & ÅGREN, G.I. Plant nutrition and growth: basic principles. **Plant and Soil**, Dordrecht, 168/169: 15-20, 1995.
- INGESTAD, T. & LUND, A.-B. Theory and techniques for steady state mineral and growth of plants. **Scandinavia Journal of Forestry Research**, 1: 439-453, 1986.
- INGESTAD, T. & McDONALD, J.S. Interaction between nitrogen and photon flux density in birch seedlings at steady-state nutrition. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 77(1): 1-11, 1989.
- JONES JR, J.B. Plant tissue analysis for micronutrients. In: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L., ED. **Micronutrients in agriculture**. Madison, Soil Society of America, 1972. p.319-45
- KAUL, K. & HOFFMAN, S.A. Ammonium ion inhibition of *Pinus strobus* L. callus growth. **Plant Science**, Limerick, 88(2): 169-73, 1993.
- KAUL, O.N.; SRIVASTAVA, P.B.L.; BORA, N.K.S. Nutrition studies on *Eucalyptus*. I. Diagnoses of mineral deficiencies in *Eucalyptus* hybrid seedlings. **Indian Forester**, Dehra Dun, 92(4): 264-68, 1966.
- KAUL, O.N.; SRIVASTAVA, P.B.L.; TANDON, V.N. Nutrition studies on *Eucalyptus*. III. Diagnoses of mineral deficiencies in *Eucalyptus grandis* seedlings. **Indian Forester**, Dehra Dun, 94(11): 831-34, 1968.

- KAUL, O.N.; SRIVASTAVA, P.B.L.; TANDON, V.N. Nutrition studies on *Eucalyptus*. IV. Diagnoses of mineral deficiencies in *Eucalyptus globulus* seedlings. **Indian Forester**, Dehra Dun, 96(6): 453-56, 1970.
- KRAMER P.J. & KOSLOWSKI, I.I. **Physiology of trees**. New York, McGraw-Hill Book Co. Inc., 1960. 642p.
- LÄUCHLI, A & BIELESKI, R.L. **Inorganic Plant Nutrition**. In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Berlin, Springer-Verlag, 1983. vol.15A e 15B. 870p.
- 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, 1991. p.43-57.
- LONERAGAN, J.F. & WEBB, M.J. Interactions between zinc and other nutrients affecting the growth of plants. In: ROBSON, A.D., ed. **Developments in plant and soil sciences**. vol. 55., Dordrecht, Kluwer, 1993. p.119-133
- LU, Y-K.; CHEN, Y-R.; YANG, C-M. Influence of Fe-and-Mg-deficiency on the thylakoid membranes of a chlorophyll-deficient *ch5* mutant of *Arabidopsis thaliana*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, 36(3): 175-79, 1995.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: metais pesados, mitos, mistificação e fatos**. São Paulo, ProduQuímica, 1994. 153p.
- 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**, Washington, (93): 837-56, 1979.
- MELLO, F.A.F.; BRASIL SOBRINHO, M.O.C.; MELLO, H.A.; VEIGA, A.A.; ARZOLLA, S. Efeitos da adubação nitrogenada, fosfatada e potássica sobre o "stand" em *Eucalyptus* (*Eucalyptus alba* Reiw). In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. v.2 p.933-37
- MENGEL, K. & KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. Berne, International Potash Institute, 1987. 593p.
- MEZZETTI, B.; ROSATI, P.; CASALICCHIO, G. *Actinidia deliciosa* C. F. Liang *in vitro*. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 25(2): 91-8, 1991.
- MUNIZ A.S. & SILVA, M.A.G. Exigências nutricionais de mudas de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron* Muller argoviensis) em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, 19(2): 263-71, 1995.

- OLSEN, S.R. Micronutrient interaction. In: MORTVEDT, J.J.; GIORDANO, P.M.; LINDSAY, W.L., ED. **Micronutrients in agriculture**. Madison, Soil Society of America, 1972. p.199-227
- PILBEAM, D.J. & KIRKBY, E.A. The physiological role of boron in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 6(7): 563-82, 1983.
- ROBSON A.D. & PITMAN, M.G. Interactions between nutrients in higher plants. In: LÄUCHLI, A & BIELESKI, R.L., ed. **Inorganic Plant Nutrition**. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Berlin, Springer-Verlag, 1983. v.15A p.147-180.
- ROCHA FILHO, J.V.C.; HAAG, H.P.; OLIVEIRA, G.D. Deficiência de macronutrientes, boro e ferro em *Eucalyptus urophylla*. **Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, 35: 19-34, 1978.
- SACCHI, G.A.; MORGUTTI, S.; ABRUZZESE, A.; ALISI, C.; COCUCCI, M.; ESPEN, L.; LEVA, A.R.; MULEO, R.; NEGRINI, N.; COCICCI, S.M. Changes in some physiological and biochemical parameters during two subcultures in kiwi (*Actinidia deliciosa*) callus. **Plant Science**, Limerick, 106(1): 107-13, 1995.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.
- SIMÕES, J.W. & COUTO, H.T.Z. Efeitos da omissão de nutrientes na alimentação mineral do pinheiro do Paraná *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze cultivado em vaso. **IPEF**, Piracicaba, (7): 3-40, 1973.
- SINGHA, S.; OBERLY, G.O.; TOWNSEND, E.C. Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, 11(2): 209-20, 1987.
- 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, University of California, Riverside, 1980. 107p.
- TEASDALE, R.D. & RICHARDS, D.K. Boron deficiency in cultured pine cells. **Plant Physiology**, Rockville, 93(3): 1071-77, 1990.
- VILLEGAS, A.; MAZUELOS, C.; TRONCOSO, A. Influence of N-NO₃ and N-NH₄ on the mineral composition of grape-vine root stocks cultured *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, (300): 119-21, 1991.
- WILL, G.M. Some notes on nutrient deficiency in *Eucalyptus* spp. In: CONFERÊNCIA MUNDIAL DO EUCALIPTO, 2., São Paulo, 1961. v.2 p939-41
- WILLIAMS, R.R. Factors determining mineral uptake *in vitro*. **Acta Horticulturae**, Wageningen, (289): 165-66, 1991.