UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ELCIO FERREIRA DOS SANTOS

**Avaliações bioquímicas e fisiológicas para previsão de
desordens nutricionais de macronutrientes no desenvolvimento inicial
do pinhão-mansão**

Piracicaba
2014

ELCIO FERREIRA DOS SANTOS

**Avaliações bioquímicas e fisiológicas para previsão de
desordens nutricionais de macronutrientes no desenvolvimento inicial
do pinhão-manso**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

Piracicaba

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Santos, Elcio Ferreira dos

Avaliações bioquímicas e fisiológicas para previsão de desordens nutricionais de macronutrientes no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão/ Elcio Ferreira dos Santos; orientador José Lavres Junior. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
82 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ativação enzimática 2. Diagnose foliar 3. Fotossíntese 4. Nutrição vegetal
5. Plantas oleaginosas I. Título

CDU631.811 : 633.9

Aos meus pais amados que tanto trabalharam para me garantir educação de qualidade. Ao meu irmão que tanto torce por mim.

DEDICO

A Deus, por ter me agraciado com a vida, pelas oportunidades, saúde e por sempre estar iluminando e guiando todas as etapas da minha vida

A toda minha família pelo apoio e carinho.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP e ao Programa de Pós-Graduação do respectivo centro pela realização do curso.

Ao Professor Dr. José Lavres Junior pela orientação, ensinamentos, oportunidades e, principalmente, pela confiança depositada em mim.

Ao Professor Dr. Marcos Antonio Camacho, pelos os auxílios pessoais, paciência e sincera amizade.

A Profa. Giuseppina Pace Pereira Lima, pela oportunidade de realização de parte das minhas análises, pelas facilidades disponibilizadas para a pesquisa, pelos ensinamentos, além do excelente exemplo de amor pela pesquisa.

Em especial à Cleusa Pereira Cabral, grande amiga e conselheira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Ref. Proc. 2011/15208-0) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA, por toda ajuda e companheirismo: Aline Grella de Campos, André Francisco de Oliveira, Bruno José Zanchim, Dra. Cristiane Prezotto Silveira, Ezio Nalin de Paulo, Felipe Furlan, Fernando Giovannetti de Macedo, José Carlos Pöpl, Raphael Florencio Garrone e Riviane Maria de Albuquerque Donha.

Aos estudantes do Laboratório de Bioquímica da UNESP-Botucatu, em especial a Josiane Pereira da Silva e Marizete Cavalcante de Souza Vieira e Sérgio Marques Costa pelo auxílio das análises.

À Aparecida Fátima Patreze pelo precioso auxílio nas atividades laboratoriais.

Aos amigos de moradia Ismael Meurer, Fabio Sérgio Paulino e Fernando Gimenez.

Aos amigos “melhores” Camila Lucena, Éder Fanaya, Elisângela Casanova, Helder Lima, Helder de Oliveira, Priscilla Nátaly e Rodrigo Ferreira, que, mesmo longe, foram incansáveis no estímulo e confiança depositada.

Aos colegas de pós-graduação da USP, em especial a Alice Casserani, Camila Pires, Fábio Pértile, Ioná Rech, Jéssica Drum, Juliana Deganello, Layane Souza, Matheus Donegá, Nericles Marcante, Paulo Roger, Tatiane Beloni e Thays Pereira pelo convívio e momentos de descontração.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

"There is no such thing as a free lunch"

Dr. Milton Friedman

RESUMO

SANTOS, E.F. **Avaliações bioquímicas e fisiológicas para previsão de desordens nutricionais de macronutrientes no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão.** 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

No Brasil, vários trabalhos com pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) têm estudado a avaliação do estado nutricional, porém são poucas as investigações objetivando caracterizar a marcha de absorção, bem como as respostas bioquímicas e fisiológicas desta espécie ao manejo nutricional. antecipadamente o estado nutricional das plantas. Desse modo, o objetivou-se com este estudo avaliar a marcha de absorção no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.), bem como as omissões de N, P, K, Ca, Mg e de S no crescimento inicial e no comportamento bioquímico e fisiológico dessa espécie e, por fim, prever os quadros sintomatológicos das deficiências. Para alcançar os objetivos propostos foram realizados dois experimentos simultâneos, conduzidos em casa de vegetação, sendo que as plantas foram cultivadas individualmente em vasos contendo solução nutritiva. No primeiro experimento - referente à marcha de absorção - a plantas foram cultivadas em solução nutritiva completa, sendo que as plantas eram retiradas a cada 14 dias para a determinação do acúmulo de massa seca e macronutrientes. No segundo experimento as plantas foram cultivadas em solução completa (controle) e omissão individual de N, P, K, Ca, Mg e de S. Neste experimento foram realizados testes bioquímicos e fisiológicas para a previsão de desordens nutricionais aos 20, 30, 40 e 120 dias após o início dos tratamentos. As primeiras manifestações de deficiência foram observadas para o Ca e N, seguidas das de Mg e K, contudo não foram observados sintomas de carência de P e S. As atividades das enzimas redutase do nitrato, da fosfatase ácida e da peroxidase, bem como a avaliação das concentrações de poliaminas, efetuadas no início do desenvolvimento das plantas, demonstraram ser indicadores para previsão das desordens nutricionais de N, P e K, respectivamente. As omissões individuais dos macronutrientes limitaram o desenvolvimento inicial do pinhão-mansão, reduziram os teores de clorofila e a taxa fotossintética de forma distinta. Porém, a omissão de Ca foi a que mais limitou o desenvolvimento dessa espécie para todas as variáveis avaliadas.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Diagnose foliar. *Jatropha curcas*. Taxa fotossintética.

ABSTRACT

SANTOS, E.F. **Physiological and biochemical assessments for prediction of nutritional macronutrient disorders in the initial development on physic nut.** 2014. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

In Brazil, several studies with physic nut (*Jatropha curcas* L.) have studied the assessment of nutritional status, but there are few investigations aiming to characterize the uptake and the biochemical and physiological responses to nutritional management of this species, for the purpose of prediction the nutritional status of plants. Thus, the objective with this study was to evaluate the uptake in the initial development of physic nut (*Jatropha curcas* L.), as well as the omission of N, P, K, Ca, Mg and S, to physiological and biochemical assessments, and finally, predicting symptomatology frames deficiencies. To achieve the proposed objectives two experiments were conducted in a greenhouse. The plants were grown individually in pots containing nutrient solution. In the first experiment – uptake of macronutrients - the plants were grown in complete nutrient solution, whereas plants were taken every 14 days for the determination of dry matter and macronutrients accumulation. In the second experiment, the plants were grown in complete solution (control) and the omission of N, P, K, Ca, Mg and S. In this experiment biochemical and physiological tests were performed for predicting nutritional disorders at 20, 30, 40 and 120 days after initiation of treatment. The first manifestations of deficiency were observed for Ca and N, followed by Mg and K, but don't were observed symptoms of P and S deficiency. The activities of nitrate reductase, acid phosphatase and peroxidase, as well as the assessment of concentrations of polyamines, made in the early development of the plant, proved to forecast indicators of nutritional disorders of N, P and K, respectively. The individual macronutrients omissions limited the initial development of physic nut, in addition, reduced chlorophyll content and photosynthetic rate differently. However, the omission of Ca was the most limited growth of this species for all variables.

Keywords: Enzymatic assessment. *Jatropha curcas*. Nutritional status. Photosynthesis rate.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Caracterização do pinhão-mansão	17
2.2 Nutrição mineral do pinhão-mansão	19
2.3 Previsão de desordens nutricionais em plantas	21
2.3.1 Testes bioquímicos	22
2.3.2 Testes fisiológicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Local, período e espécie vegetal	28
3.2 Instalação e desenvolvimento dos experimentos	28
3.3 Experimento I: marcha de absorção de macronutrientes no pinhão-mansão	29
3.3.1 Acúmulo de massa seca, análise química vegetal e parâmetros de crescimento	29
3.4 Experimento II: omissão de macronutrientes no desenvolvimento de plantas de pinhão-mansão	30
3.4.1 Determinações das atividades da redutase do nitrato, da fosfatase ácida, peroxidase e teste bioquímico de poliaminas	30
3.4.2 Trocas gasosas	32
3.4.3 Área foliar e acúmulo de massa seca; análise química do material vegetal e cálculo de eficiências nutricionais	33
3.5 Análise dos resultados	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Marcha de absorção de macronutrientes em plantas de pinhão-mansão	35
4.1.1 Produção de massa seca	35
4.1.2 Parâmetros de crescimento	36
4.1.3 Acúmulo de macronutrientes	38
4.2 Omissão de macronutrientes no desenvolvimento de plantas de pinhão-mansão	44
4.2.1 Diagnóstico Visual	44
4.2.2 Altura das plantas, diâmetro do caule, produção de massa seca e área foliar total ..	45
4.2.3 Acúmulo e eficiência de macronutrientes	49
4.2.4 Atividade da redutase do nitrato	53

4.2.5 Atividade da fosfatase ácida	57
4.2.6 Concentração de poliaminas e atividade da peroxidase	58
4.2.7 Teor de clorofila em unidades SPAD	62
4.2.8 Trocas gasosas.....	63
5 CONCLUSÕES	70
REFERENCIAS	71
APÊNDICES.....	80

1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento dos preços do petróleo bruto e preocupações ambientais tendem a promover uma maior busca por combustíveis a partir de fontes renováveis, como o biodiesel. O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) apresenta grande potencial como matéria prima para produção deste bicomcombustível e possibilidade de cultivo em áreas não tradicionalmente agrícolas.

No Brasil, vários trabalhos com pinhão-manso têm estudado a avaliação do estado nutricional, porém são poucas as investigações objetivando caracterizar a marcha de absorção de nutrientes por esta espécie, bem como as respostas bioquímicas e fisiológicas do pinhão-manso ao manejo nutricional. Além disso, os trabalhos com abordagem de nutrição mineral em pinhão-manso têm avaliado somente a diagnose foliar e visual, evidenciando desta maneira, a necessidade de estudos das respostas fisiológicas e bioquímicas, referentes ao processo fotossintético em condições de desordens nutricionais.

A avaliação nutricional do pinhão-manso por meio do estudo de marcha de absorção de nutrientes é ferramenta efetiva e indispensável ao manejo nutricional eficiente no desenvolvimento inicial desta espécie, pois permitem identificar a época de maior acúmulo de massa seca, mostrando a repartição de nutrientes na planta – parte aérea, caule, raízes, frutos – e por fim, podendo indicar a demanda por nutrientes. Assim, os estudos de marcha de absorção de nutrientes de uma espécie promovem o adequado manejo de nutrientes, sendo poucos os trabalhos na literatura enfocando a marcha de absorção do pinhão-manso.

A avaliação do comportamento fisiológico do pinhão-manso tem considerado apenas fatores ambientais de estresse abiótico, tais como temperatura, déficit hídrico e salinidade. Portanto, são essenciais trabalhos que contemplem a avaliação nutricional de macronutrientes, enfocando respostas metabólicas, especialmente quando se considera a análise de enzimas, a quantificação de poliaminas, a concentração de clorofila (unidades SPAD) e taxa fotossintética. Trabalhos clássicos de nutrição de plantas utilizando testes bioquímicos e atributos fisiológicos (*e.g.*, parâmetros de taxa fotossintética) constituem em importante ferramenta para a avaliação do estado nutricional de plantas, permitindo maior conhecimento das demandas nutricionais, bem como a possibilidade de previsão das desordens nutricionais da cultura, notadamente antes das manifestações visuais.

O crescimento e o desenvolvimento do vegetal são resultados de uma série de eventos biológicos regulados, também, pela disponibilidade de nutrientes. Por sua vez, a manifestação externa de anormalidade provocada pela deficiência de qualquer nutriente é o resultado de

uma cadeia de acontecimentos iniciados a nível molecular, com modificação subcelular e posterior alteração celular a qual, finalmente, resulta em modificação no tecido - o sintoma. Portanto, parte-se da hipótese de que as avaliações bioquímicas e fisiológicas efetuadas antes da manifestação visual dos sintomas (diagnose visual) são efetivas para diagnosticar antecipadamente o estado nutricional das plantas. Além disso, o adequado manejo nutricional do pinhão-mansão para ser alcançado deve-se levar em consideração a marcha de absorção da espécie.

Desse modo, o objetivou-se com este estudo avaliar a marcha de absorção no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.), bem como as omissões de N, P, K, Ca, Mg e de S no crescimento inicial e no comportamento bioquímico e fisiológico dessa espécie e, por fim, prever os quadros sintomatológicos das deficiências.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização do pinhão-manso

As plantas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) pertencem à família Euforbiáceae, da qual outras plantas de interesse econômico também se incluem como a mamona (*Ricinus communis*), a mandioca (*Manihot esculenta*), a seringueira (*Hevea brasiliensis*) e a coroa-de-cristo (*Euphorbia milii*) (OPENSHAW, 2000). O fruto dessa espécie tem aproximadamente 28 % de óleo em sua massa seca, e as plantas possuem capacidade de produção em 6.000 kg ha⁻¹ de sementes equivalendo aproximadamente a 2.000 kg ha⁻¹ de óleo, possibilitando um lucro elevado pela sua exploração (ARRUDA et al., 2004; SATURINO et al., 2005; DIAS et al., 2007; LAVIOLA; DIAS, 2008).

As plantas de pinhão-manso possuem origem tropical com alta adaptação às diversas regiões do Brasil, aparecendo em plantios desde a linha do equador até o estado do Paraná. Estas plantas possuem interessante distribuição geográfica, sendo que por volta de dois terços das 150 espécies conhecidas são americanas, e o outro terço se encontra quase toda na África Tropical, com algumas poucas espécies no continente asiático (PARAWIRA, 2010).

O local exato de origem do pinhão-manso é controverso, pois é possível encontrar essa espécie em várias regiões de clima tropical da América Central e do Sul, da África e da Ásia (OPENSHAW, 2000). O Brasil é citado como um dos centros de origem desta espécie, entretanto, o México é a região de origem mais provável, pois foi observado nesta região, o aparecimento do *Jatropha curcas* de maneira natural nas florestas costeiras da região e não apenas em áreas cultivadas ou cercas vivas (XU; WANG, 2011).

As plantas de pinhão-manso caracterizam-se por serem arbustiva com altura média de 2,5 metros, podendo atingir 12 metros de altura. A espécie possui uma copa larga e irregular, caule reto e liso, com diâmetro de aproximadamente 20 cm e com casca fina e amarelada coberta por cera. O lenho das plantas de pinhão-manso é flexível com pouca resistência e com ramos compridos e que se dividem desde a base do tronco. O sistema radicular dessa planta é pivotante podendo alcançar grandes profundidades e estabelecer grande quantidades de raízes laterais (ARRUDA et al., 2004; SATURINO et al., 2005; DIAS et al., 2007; LAVIOLA; DIAS, 2008).

A espécie *Jatropha curcas* (L.) constitui em uma planta decídua (perde suas folhas na estação seca) com folhas de coloração verde intenso, brilhantes, simples, com 3 a 5 lóbulos, alternas, glabras, com forma de palma, lanceoladas. Possui inflorescências do tipo cimeira e

seu florescimento ocorre durante a estação chuvosa. O período produtivo rentável é alcançado entre três e quatro anos, podendo-se estabelecer por 40 anos, sendo que, em regiões com umidade constante, o florescimento pode ocorrer ao longo do ano (ALBUQUERQUE et al., 2009). O pinhão-manso apresenta um sistema misto de reprodução, combinando autofecundações, apomixia, de forma assexuada e sem troca de pólen. Desta forma, esse sistema de reprodução resulta em sementes idênticas à planta mãe, bem como o cruzamento de indivíduos aparentados, explicando a pequena diversidade genética da planta (BRESSAN et al., 2013).

A espécie apresenta algumas características desejáveis, tais como óleo de alta qualidade e possibilidade de inserção na cadeia produtiva da agricultura familiar (KING et al., 2009; ROSADO et al., 2010). Fairless (2007) relatou que ao longo do ano de 2008, cerca de 900 mil hectares foram cultivados com pinhão-manso no mundo, destacando-se a Ásia, e estimou que o território mundial com plantações de pinhão-manso chegaria a mais de 12 milhões de ha em 2015. Porém, o cultivo mundial do pinhão-manso foi intensamente estimulado sem o prévio conhecimento agronômico adequado da espécie e com diversidade genética limitada (ROSADO et al., 2010).

No Brasil, o cultivo do pinhão-manso surgiu como opção para ocupar áreas marginais de pequenos agricultores, bem como alternativa na agricultura familiar. Entretanto, limitações técnicas têm impedido a inserção plena desta espécie na matriz energética brasileira. A maturação desuniforme dos frutos, a baixa produtividade de óleo e as baixas produções observadas em diferentes condições edafoclimáticas brasileiras, têm limitado a viabilidade econômica no cultivo do pinhão-manso (ROCHA et al., 2012). A baixa diversidade genética das plantas de pinhão-manso dificulta a seleção de sementes e explica em parte a dificuldade no cultivo da espécie (BRESSAN et al., 2013). Além disso, a falta de informações agronômicas impede o estabelecimento do cultivo de grandes áreas com pinhão-manso. Nesse sentido, insere-se a importância de maiores informações sobre o manejo nutricional com o objetivo de estabelecimento da alta produtividade de plantas de pinhão-manso (ROSADO et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

Desta maneira, o pinhão-manso ainda está em fase de domesticação no Brasil e, uma vez que esta espécie é indicada como alternativa para produção de biodiesel, os estudos a fim de caracterizar o desenvolvimento e a demanda nutricional da espécie devem ser intensificados.

2.2 Nutrição mineral do pinhão-mansão

O pinhão-mansão é parcialmente adaptado a solos com baixa umidade e condições de fertilidade pouco favoráveis. No entanto, a produção rentável do pinhão-mansão deve ser acompanhada com o manejo nutricional adequado, a fim de alcançar a competitividade dos custos de bicomcombustível oriundo desta espécie (LAVIOLA; DIAS, 2008; SOUZA et al., 2011).

Os custos de produção de lavouras com alta exigência nutricional são muito elevados. No caso de culturas para produção de biodiesel, o equilíbrio energético deve ser considerado, ou seja, o total de energia bruta fornecida pelo produto deve ser maior que o total gasto do material não renovável para a produção. (PARAWIRA, 2010). Assim, trabalhos que enfoquem a avaliação da nutrição mineral do pinhão-mansão são essenciais a fim de se obter o manejo eficiente de adubos e corretivos, garantindo a produção rentável (MALAVOLTA, 2006). A avaliação da nutrição mineral do pinhão-mansão tem sido estudada em diferentes condições edafoclimáticas, apresentando contrastantes informações sobre a dinâmica nutricional desta espécie.

Em relação ao nitrogênio (N), a nutrição adequada deste elemento aumenta a assimilação de CO_2 e o conteúdo de clorofila, influenciando benéficamente o desenvolvimento das plantas de pinhão-mansão (MATOS et al., 2012). Ademais, por meio da adubação nitrogenada o cultivo do pinhão-mansão pode ser otimizado, promovendo o incremento do número total de frutos/sementes produzidos por plantas (YONG et al., 2010). Na fase inicial de desenvolvimento, no entanto, esta espécie possui baixa demanda de N, sendo que pequena quantidade deste macronutriente é suficiente para proporcionar o desenvolvimento inicial adequado (SOUZA et al., 2011).

Em relação ao fósforo (P), as plantas de pinhão-mansão parecem apresentar eficiência fisiológica no uso deste macronutriente, sendo que a omissão deste elemento resulta em pequena redução de massa seca total no desenvolvimento inicial da espécie (SILVA et al., 2009). Entretanto, o pinhão-mansão responde positivamente à adição de P, de forma que a adubação fosfatada incrementa o crescimento de raízes e promove a expansão da área foliar (LIMA et al., 2011a), além do aumento da produtividade por plantas cultivadas em disponibilidades adequadas de P (SURIHARN et al., 2011). Balota, Machineski e Scherer (2012) ressaltam a alta capacidade de associação desta espécie com fungos micorrízicos arbusculares, pela qual beneficia a nutrição fosfatada, bem como no crescimento das plantas de pinhão-mansão, podendo esse fato contribuir com as eficiências de absorção e de uso do P.

A deficiência de potássio (K) em plantas de pinhão-mansó acarreta em redução no crescimento dos brotos, além de reduzir a atividade fotossintética das folhas levando a baixos índices de produção (SURIHARN et al., 2011). A alocação de carbono da planta para a produção de frutos é acompanhada, necessariamente, pelo acúmulo de K, havendo aumento da exigência deste nutriente na fase em que o pinhão-mansó inicia a produção de frutos (LAVIOLA; DIAS, 2008). Além disso, esta espécie possui a capacidade de atenuar os efeitos salinos – problemas comuns em áreas de cultivo de pinhão-mansó no Brasil – por meio da absorção e utilização fisiológica de K. A presença de níveis adequados de K no meio de cultivo é capaz de atenuar a acumulação excessiva de sódio nas diversas partes da planta, pela diminuição do fluxo de sódio no xilema. Dessa forma, concentrações adequadas de K nas raízes podem mitigar os efeitos adversos do excesso de sódio e reduzir seu conteúdo em tecidos de pinhão-mansó (RODRIGUES et al., 2012).

O cálcio (Ca) é o segundo nutriente mais exigido para a formação das folhas e o terceiro mais acumulado pelos frutos de pinhão-mansó (LAVIOLA; DIAS, 2008). A espécie é muito exigente em Ca, sendo que a omissão total deste elemento culmina com a morte do meristema apical, além de ser o macronutriente mais limitante para o desenvolvimento inicial de mudas de pinhão-mansó (SILVA et al., 2009; MAIA et al., 2011).

O ciclo de desenvolvimento também influencia na dinâmica nutricional de plantas de pinhão-mansó. No desenvolvimento inicial do pinhão-mansó Chaves et al. (2009) relataram que os níveis de zinco (Zn) e cobre (Cu) não influenciaram o desenvolvimento da mudas de pinhão-mansó. Contudo, avaliando a taxa fotossintética de plantas de pinhão-mansó, Santos et al. (2013) encontraram redução na assimilação de CO₂, que por sua vez provocou a redução no acúmulo de biomassa em função da omissão de Cu e Zn, bem como a omissão de outros micronutrientes, como boro (B), ferro (Fe) e manganês (Mn).

As exigências de nutrientes minerais são menores nos dois primeiros anos de cultivo, aumentando rapidamente após o terceiro ano de implantação da cultura. Contudo, o pinhão-mansó extrai elevada quantidade de nutrientes na colheita e, se não adequadamente adubado, pode levar ao empobrecimento do solo ao longo dos anos de cultivo (LAVIOLA; DIAS, 2008). A deficiência de macro e micronutrientes acarreta em sintomas de carência nutricional comuns a outras espécies, limitando o desenvolvimento vegetal (SILVA et al., 2009). A estabilização no cultivo do pinhão-mansó e o incremento da concentração e da qualidade de óleo nas sementes dessa espécie exigem a manutenção nutricional ao dos anos de cultivo (XU; WANG, 2011).

Desta maneira, a avaliação da nutrição mineral do pinhão-mansão tem sido amplamente estudada, entretanto, somente tem sido avaliado o estado nutricional desta espécie por meio da diagnose foliar e visual, evidenciando desta maneira, a necessidade de estudos das respostas bioquímicas e fisiológicas, em condições de desordens nutricionais.

2.3 Previsão de desordens nutricionais em plantas

Os nutrientes essenciais exercem funções específicas no desenvolvimento vegetal. As funções dos nutrientes no metabolismo vegetal se classificam em estrutural, constituinte de enzimas e ativador enzimático (MALAVOLTA, 2006). A deficiência de qualquer nutriente essencial, independentemente de sua função, proporciona o inadequado desenvolvimento vegetal (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010). As desordens nutricionais que provocam a redução no desenvolvimento vegetal, bem como a menor produtividade agrícola são caracterizadas por sintomas visuais específicos. Em geral, os sintomas são claramente visíveis em condições de carência nutricional aguda, podendo ser agrupados em seis categorias: crescimento reduzido; clorose uniforme ou em manchas nas folhas; clorose internerval; necrose; coloração purpúrea; deformações (PRADO, 2008). Porém, a deficiência nutricional não severa possui difícil detecção, mas podem causar significativas reduções de produção e produtividade das culturas. Além disso, muitas espécies de plantas anuais e perenes, particularmente aquelas adaptadas para condições de baixa fertilidade do solo, ajustam a sua taxa de crescimento para o nutriente mais limitante e, portanto, não desenvolvem os sintomas de deficiência visual, porém apresentam menor desenvolvimento (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010).

As plantas podem não apresentar sintomas de deficiência, entretanto reduzir sua produção, apresentando “fome oculta”. A “fome oculta” possui difícil diagnose em função do seu efeito significativo no desenvolvimento vegetal sem o aparecimento de sintomas, bem como a dificuldade de diagnosticá-la por metodologias tradicionais – diagnose visual e foliar (MENGEL; KIRKBY, 2001; MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2012). Desta maneira, é importante o desenvolvimento de métodos que possam prevenir ou remediar a deficiência de nutrientes, visando a maximizar a produção e minimizar os prejuízos (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010).

A deficiência nutricional pode ser evitada por meio da análise prévia da fertilidade do solo, utilizando-se essa análise para a adubação adequada das plantas. Porém, a análise do solo, nem sempre pode assegurar que os teores de nutrientes detectados na análise são os

realmente disponíveis para as plantas. Além disso, a presença do nutriente no solo também não assegura que será absorvido na quantidade e na proporção adequada pelas plantas. Por isso, normalmente, se realiza também a análise foliar. Ademais, métodos diferentes executados e/ou com adaptações aleatórias para cada laboratório, podem levar a resultados distintos (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010).

A diagnose foliar constitui em metodologia amplamente realizada em sistemas de produção agrícola a fim de precaver a deficiência vegetal. Porém, apesar da melhoria dos processos analíticos, nem sempre pode ser assegurado que a concentração de nutrientes analisada corresponde à concentração de nutrientes disponíveis no metabolismo vegetal, destacando-se os micronutrientes (BAR-AKIVA, 1961; LAVON; GOLDSCHMIDT, 1999; SRIVASTAVA et al., 2000). Trabalhos realizados por Ruiz; López-Cantarero e Romero (2000), indicam que a grande discrepância entre as concentrações totais e as concentrações metabolicamente disponíveis de K, Ca e Mg no tecido foliar. Dessa forma, tem sido dada grande importância para os testes bioquímicos e fisiológicos, pois tendem a refletir melhor a concentração metabolicamente ativa dos nutrientes e, assim, indicar mais adequadamente o estado nutricional das plantas (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010). Contudo as avaliações bioquímicas e fisiológicas não são de uso generalizado, embora algumas delas possam até ser efetuadas no campo. Os testes bioquímicos e fisiológicos constituem em ferramentas de pesquisa que podem identificar e diagnosticar a carência nutricional antes do desenvolvimento do sintoma visual (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

2.3.1 Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos verificam a desordem nutricional de plantas por meio de possíveis alterações bioquímicas ocasionadas como mecanismos de resposta à carência nutricional. Assim, antes que ocorra o sintoma no tecido vegetal, as plantas promovem alterações nas vias metabólicas com o objetivo de garantir o desenvolvimento adequado (MARSCHNER, 2012). Dentre os primeiros pesquisadores que procuram desenvolver testes bioquímicos, destaca-se um grupo liderado por Bar-Akiva, que desenvolveu estudos com cítrus. A partir destes estudos pioneiros e da melhoria de métodos para análises química e bioquímica, muitos trabalhos têm dado atenção ao comportamento bioquímico vegetal em função do estado nutricional (CAZETTA; FONSECA; PRADO, 2010).

Os testes bioquímicos não fornecem diretamente a concentração de nutrientes no tecido vegetal, porém a atividade enzimática ou a modificação de metabólitos permite a

determinação do “status” nutricional da planta. O teste tem a possibilidade de ser realizado no tecido vegetal com sintoma de carência ou na parte vegetal em que melhor expressa a função deste nutriente no teste bioquímico (BAR-ALIVA, 1961).

A alteração da atividade de enzimas como a redutase do nitrato, a fosfatase ácida e a peroxidase, bem como a modificação no metabolismo de proteínas (*e.g.* poliaminas) ou no acúmulo de clorofila, podem ser utilizados como testes bioquímicos para previsão de desordens de macronutrientes.

A redutase do nitrato é uma enzima que reduz o NO_3^- (nitrato) a NO_2^- (nitrito), sendo induzida por molibdênio (Mo) e por nitrato no substrato de cultivo (EPSTEIN; BLOOM, 2006). Assim, a atividade da redutase no nitrato está diretamente ligada ao processo de assimilação de N, bem como os fatores bióticos e abióticos que podem influenciar a assimilação deste macronutriente (CAMPBELL, 1999), como interferir na absorção de outros nutrientes (*e.g.*, de K, P e S). Em substratos onde o nitrato é a principal fonte de N disponível, tem sido comprovado que a maior atividade da redutase do nitrato relaciona-se significativamente com o suprimento e absorção de N (REIS; FURLANI JÚNIOR; HAGA, 2007).

A forma mais comum da redutase do nitrato usa apenas NADH como um doador de elétron, enquanto outra forma encontrada predominantemente em tecidos não verdes, como raízes, pode usar tanto NADH quanto NADPH. Essa enzima é composta por homodímeros, compostos com duas subunidades idênticas (CAMPBELL, 1999), sendo que cada subunidade contém três grupos protéicos. Ademais, a redutase do nitrato é a principal proteína que contém Mo nos tecidos vegetais e um dos sintomas de deficiência de molibdênio é o acúmulo de nitrato.

Quanto à utilização de P pela planta em ambientes onde o suprimento desse nutriente é limitante, as plantas desenvolveram alguns mecanismos visando aumentar o conteúdo de P absorvido, afetando a eficiência de uso deste nutriente para a produção de biomassa. A ação da atividade da fosfatase ácida é uma das estratégias para a utilização eficiente de P (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994). A deficiência de P aumenta a atividade dessa enzima no tecido vegetal (GARCIA; ASCENCIO, 1992), e sua alta atividade tem sido relacionada à resposta da planta à deficiência desse nutriente (ASCENCIO, 1994).

A modificação da atividade das peroxidases pode indicar alterações metabólicas, como o estresse oxidativo. Alguns sintomas como a clorose e necrose em folhas são expressão do estresse oxidativo provocado pela maior geração de radicais livres – espécies reativas de oxigênio, como o O_2^- e o H_2O_2 – indicando um sistema de desintoxicação prejudicada em

condições de baixa disponibilidade de nutrientes (MENGEL; KIRKBY, 2001; MARSCHNER, 2012), como o íon K^+ . A reação das peroxidases consiste de dois passos sucessivos, envolvendo um elétron cada. Uma equação geral para reações catalisadas por peroxidases não pode ser formulada, pois o curso da reação depende do tipo de substrato, como fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e diferentes aminoácidos.

A carência nutricional influencia também na regulação da produção de compostos no metabolismo vegetal, como o acúmulo de poliaminas. As poliaminas estão envolvidas em uma gama de processos metabólicos vegetais, como a divisão celular, replicação do DNA, diferenciação celular, senescência de folhas, síntese de etileno e formação de embriões ou primórdios florais (GROPPA; BENAVIDES, 2008). Porém, o papel exato dessas moléculas nos processos de desenvolvimento e resposta a estresses não são bem compreendidos, todavia, sabe-se que são compostos reguladores do desenvolvimento.

A disponibilidade de potássio tem efeito significativo sobre o acúmulo de determinadas poliaminas, como a diamina putrescina, a triamina espermidina e a tetraamina espermina (WATSON; MALMBERG, 1996; FARIDUDDIN et al., 2013). A biossíntese de putrescina durante a deficiência de K é uma resposta ao desequilíbrio iônico causado pela acidificação do suco celular intensificado pelo excesso de amônio, bem como pelo aumento da atividade das enzimas que convertem arginina, ornitina e citrulina em putrescina (MALAVOLTA, 2006). Por sua vez, a putrescina é convertida a espermidina e espermina por sucessivas transferências de um ou dois grupos aminopropil via descarboxilação do S-adenosil metionina, sendo que esse processo também é regulado em parte pelo K (TIBURCIO; GENDY; TRANTHANH-VAN, 1989; MALAVOLTA, 2006).

A relação de presença de putrescina, espermidina e espermina com o desenvolvimento das plantas é evidente, porém não totalmente compreendida. Os sintomas típicos de carência de K – clorose seguida de necrose das pontas e margens das folhas velhas - são devidos, em parte, ao acúmulo de putrescina. A concentração de putrescina tem maior intensidade de resposta ao estresse por potássio do que as concentrações de espermidina e espermina. Diversos trabalhos têm mostrado que a formação de putrescina e espermidina é essencial para a embriogênese das plantas, e conseqüentemente, o crescimento, enquanto que a concentração de espermina no tecido vegetal não é essencial para o crescimento normal das plantas (MENGEL; KIRKBY, 2001; MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2012)

A determinação de clorofila constitui em efetivo teste bioquímico para previsão de desordens nutricionais envolvidos na biossíntese de clorofila com o nitrogênio e o magnésio. A quantificação indireta de clorofila por meio do clorofilômetro, responde ao teor do

pigmento presente na folha, fornecendo leituras em unidades SPAD. Esse instrumento tem sido usado para estimar a concentração de N, uma vez que esse nutriente é um componente da molécula de clorofila, sendo positivamente correlacionado com os valores SPAD. O clorofilômetro possui algumas vantagens, como: ser portátil e de fácil manuseio, possibilitar economia de tempo e dinheiro, viabilizar o diagnóstico prévio de uma possível deficiência de N podendo prevenir um estado de carência severa, além de ser uma técnica não destrutiva e que permite a amostragem tantas vezes quanto necessárias, sem a destruição do limbo foliar (MINOLTA CAMERA Co., 1989). Ademais, a utilização do clorofilômetro também pode ser destinada à diagnose de outros elementos, como o magnésio, enxofre, ferro e manganês, desde que se conheça o nutriente omitido ou limitante.

Os estudos que avaliam as consequências do acúmulo de poliaminas e alteração do conteúdo de clorofila, bem como a modificação da atividade das enzimas redutase do nitrato, fosfatase ácida e peroxidase no crescimento e desenvolvimento do pinhão-mansão, relacionando com a nutrição de macronutrientes, são necessários, em face da inexistência de trabalhos envolvendo essa espécie vegetal, bem como pela possibilidade de utilização destes métodos não convencionais de avaliação do estado nutricional para o monitoramento da nutrição vegetal, principalmente, para o diagnóstico prévio – notadamente em condição de fome oculta.

2.3.2 Testes fisiológicos

Os testes fisiológicos por meio da avaliação da taxa fotossintética (taxa de assimilação de CO₂, transpiração e condutância estomática) utilizando o aparelho IRGA (*Infrared Gas Analyzer – IRGA, LI 6400, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA*) possuem alta correlação com o estado nutricional das plantas, indicando o comportamento fisiológico exato da planta. Assim, esse aparelho constitui em importante ferramenta de caracterização da taxa fotossintética da planta analisada (LU et al., 2002; YONG et al., 2010; MATOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

A taxa fotossintética pode ser utilizada para prever possíveis desordens nutricionais em função de sua modificação, já que os nutrientes influenciam de diferentes formas, direta ou indiretamente, o processo fotossintético, sendo que existe uma correlação positiva entre a concentração de nutrientes nas folhas e a taxa fotossintética (PAPONOV; ENGELS, 2005; FLETCHER et al., 2008). Um exemplo de envolvimento direto de nutrientes na fase clara da fotossíntese é a entrada de Mg e K para o lúmen dos cloroplastos, induzida pela luz, a fim de

promover o balanceamento de cargas no lúmen. Já na reação escura, o influxo de K para dentro das células guardas é importante, pois possibilita a abertura dos estômatos, permitindo a entrada de CO₂ na folha, no qual é utilizado no processo fotossintético. Também na fase escura da fotossíntese, a concentração de P inorgânico no citosol, controla o transporte de triosefostato dos cloroplastos para o citosol (MARSCHNER, 2012).

Os nutrientes também influenciam no processo fotossintético por meio da biossíntese de aparatos fotossintéticos, como cofatores de enzimas envolvidas em vias fotossintéticas (*e.g.*, o Fe para síntese de clorofila). Nesse contexto, a deficiência de nutrientes envolvidos na síntese de proteínas ou pigmentos fotossintéticos resulta na formação de cloroplastos com baixa eficiência fotossintética, promovida pela mudança da estrutura dessa organela (CHEN et al., 2008). Além disso, o processo fotossintético é influenciado pelos nutrientes que fazem parte de componentes integrais de aparatos fotossintéticos (*e.g.*, Mg e N na constituição do o anel pirrólico) (MENGEL; KIRKBY, 2001; MARSCHNER, 2012). Vale ressaltar, a alteração da capacidade fotossintética em função da modificação de componentes estruturais por meio de outros nutrientes como o P (enzimas relacionada à fixação do carbono – ribulose 1,5-bifosfato carboxilase e fosfoenol piruvato carboxilase), o K (abertura e fechamento de estômatos) e o S (composição da ferredoxina e tioredoxina) (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

Em plantas de trigos, a taxa fotossintética em baixa intensidade luminosa foi semelhante àquela verificada tanto em plantas deficientes em N, quanto em plantas não deficientes. Por outro lado, em condição de alta intensidade de luz, as plantas deficientes em N apresentaram menores taxas fotossintéticas em relação àquelas bem nutridas. As plantas deficientes em N não conseguem aproveitar a maior energia luminosa disponível, proporcionada pelo aumento da intensidade da luz, para utilização em reações fotoquímicas, dissipando a energia luminosa não usada em forma de calor (DE GROOT et al., 2003). Mudanças similares também já foram relatadas em plantas deficientes em fósforo (LAUER et al., 1989) e em potássio (WENG et al., 2007).

O processo fotossintético também pode ser indiretamente influenciado pela disponibilidade de nutrientes, via os efeitos da nutrição no crescimento e nas relações fonte-dreno. As plantas deficientes em P na fase reprodutiva podem acumular carboidratos nas folhas e raízes. Desta maneira, a baixa eficiência fotossintética das folhas – principal tecido vegetal produtor de fotoassimilados – observadas em plantas deficientes em P, em parte é explicada pela menor demanda de carboidratos para o dreno mais forte (órgãos reprodutivos) (PIETERS; PAUL; LAWLOR, 2001).

Os nutrientes também podem agir indiretamente na modificação do processo fotossintético por meio de sinais hidráulicos ou hormonais que reduzem a condutância estomática, e consequentemente, modificam a capacidade fotossintética das plantas submetidas ao estresse nutricional (CRAMER; HAWKINS; VERBOOM, 2009). A baixa disponibilidade de nutrientes com o N-NO_3^- , P e S no meio de cultivo podem inibir o transporte de água por aquaporinas, modificando a taxa de transpiração (MAUREL et al., 2008). A deficiência de nutrientes, como o N e o K, também pode regular a condutância estomática por meio da alteração de hormônios provenientes de folhas, como ácido abscísico (WILKINSON; BACON; DAVIES, 2007).

Assim, os testes bioquímicos e fisiológicos constituem em importantes ferramentas no auxílio e previsão da diagnose nutricional por ser indicadora do *status* do nutriente na planta e, por sua vez, guardar relação com a produção de massa seca e a concentração de nutriente no tecido vegetal (MARSCHNER, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, período e espécie vegetal

O presente estudo foi realizado sob condições de casa de vegetação, no setor de Nutrição Mineral de Plantas, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo (CENA/USP), em Piracicaba-SP, no período de março a julho de 2012. As temperaturas máxima, mínima e média, durante o período experimental foram de 40,1; 20,4 e 30,2°C, respectivamente. A espécie estudada foi o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), sendo que as sementes utilizadas foram coletadas em área de cultivo, no Município de Lins, Estado de São Paulo. O estudo compreendeu dois experimentos realizados simultaneamente, um referente à marcha de absorção e outro referente à omissão de macronutrientes.

3.2 Instalação e desenvolvimento dos experimentos

As sementes de pinhão manso foram dispostas em bandeja rasa contendo vermiculita, umedecida com solução de sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), e quando as plantas emergidas atingiram cerca de 5 cm de altura foram transferidas para bandeja de plástico com capacidade de 40 L contendo solução nutritiva (JOHNSON et al., 1957) completa e diluída a 1/5 (denominada solução de adaptação) da concentração usual (Tabela 1), de modo a agravar as carências nutricionais, considerando a contribuição das reservas da semente. Após uma semana, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 2,5 L com seus respectivos tratamentos. As plantas foram fixadas na região do colo com espuma de plástico e foram mantidas sob aeração constante.

Em ambos os experimentos, o pH inicial (em torno de $5,5 \pm 0,5$) foi monitorado semanalmente, em cada unidade experimental (BECKMANN-CALVACANTE et al., 2010). Além disso, em todas as unidades experimentais foram mantidas constantes a relação 60: 40% entre N-NO_3^- e N-NH_4^+ (KIM; HAWKINS; MITCHELL, 2010). Durante o desenvolvimento do trabalho, as soluções nutritivas foram diariamente monitoradas e seus volumes completados com água deionizada quando necessário e, renovadas a cada 14 dias. Vale destacar que todos dos reagentes utilizados para a formulação da solução nutritiva eram ultrapuros.

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva utilizada para o cultivo de pinhão manso e volumes (mL L⁻¹) pipetados da solução estoque utilizados em cada tratamento

Solução estoque	Tratamentos						
	Completo	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S
KNO ₃ (1 mol L ⁻¹)	6,0	-	4,0	-	6,0	6,0	6,0
NH ₄ H ₂ PO ₄ (1 mol L ⁻¹)	2,0	-	-	2,0	2,0	2,0	2,0
NH ₄ NO ₃ (1 mol L ⁻¹)	4,0	-	6,0	4,0	4,0	4,0	4,0
MgSO ₄ .7H ₂ O (1 mol L ⁻¹)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	-	-
CaCl ₂ (1 mol L ⁻¹)	4,0	4,0	4,0	1,0	-	4,0	4,0
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (1 mol L ⁻¹)	-	-	-	3,0	-	-	-
KCl (1 mol L ⁻¹)	-	4,0	2,0	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (1 mol L ⁻¹)	-	2,0	-	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄ .10 H ₂ O (1 mol L ⁻¹)	-	-	-	-	-	2,0	-
MgCl ₂ .6H ₂ O (1 mol L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-	2,0
Micronutrientes* ⁽¹⁾	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA ⁽²⁾	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Fonte: Johnson et al. (1957) adaptado. ⁽¹⁾em g L⁻¹: KCl (3,728) [50 µmol L⁻¹]; H₃BO₃ (1,546) [25 µmol L⁻¹]; MnSO₄ . H₂O (0,338) [2 µmol L⁻¹]; ZnSO₄.7H₂O (0,575) [2 µmol L⁻¹]; CuSO₄.5H₂O (0,125) [0,5 µmol L⁻¹]; H₂MoO₄ (85% MoO₃) (0,081) [0,5 µmol L⁻¹]. ⁽²⁾ Dissolveu-se 33,2 g de EDTA-2Na em de 200 mL de H₂O deionizada. Juntou-se agitando, 89 mL de NaOH 1mol L⁻¹ (40g L⁻¹); Dissolveu-se separadamente, 24,9g de FeSO₄.7 H₂O em de 200 mL de H₂O deionizada e juntou-se, agitando à solução de EDTA [53,7 µmol L⁻¹]. Completou-se para 900 mL com H₂O deionizada; colocou-se em frasco escuro, arejando durante uma noite e completou-se a 1 L com H₂O deionizada; manteve-se o frasco escuro na geladeira.

3.3 Experimento I: marcha de absorção de macronutrientes no pinhão-manso

Os tratamentos constituíram em nove coletas, com intervalos de 14 dias entre elas, sendo a primeira aos sete dias após o início dos tratamentos (DAT), sendo o experimento conduzido por 119 dias. Em todas as amostragens, foram colhidas três plantas por repetição, separando-as em folhas, caule e raízes. As plantas desse experimento foram cultivadas apenas em solução nutritiva completa (Tabela 1). O delineamento experimental foi o de blocos completos ao acaso, com três repetições.

3.3.1 Acúmulo de massa seca, análise química vegetal e parâmetros de crescimento

Em seguida à colheita das plantas (119 DAT) o material foi identificado, separado em folha, caule e raiz. Posteriormente, o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e secado em estufa a 65°C (± 0,5), durante 72 horas. Por fim, foi pesado, triturado em moinho tipo Wiley (peneira com diâmetro de malha de 1 mm) para as determinações das concentrações de N, P, K, Ca, Mg e S nos tecidos vegetais, de acordo com método descrito por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). As quantidades acumuladas dos nutrientes nos tecidos

vegetais foram calculadas pela multiplicação da concentração com o valor da massa seca de cada parte da planta. Por meio dos resultados de massa seca foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento: taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR) e razão de massa foliar (RMF) (BENINCASA, 1988). Dessa forma obteve-se:

$$TCA = \frac{M_2 - M_1}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

$$TCR = \frac{\ln M_2 - \ln M_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

$$RMF = \frac{M_f}{M} \quad (3)$$

em que: $M_2 - M_1$ = diferença entre a massa seca total das plantas de cada unidade experimental; $t_2 - t_1$ = número de dias decorridos entre as duas amostragens; M = massa seca total de cada unidade experimental; M_f = massa seca das folhas de cada unidade de experimental; $\ln$ = logaritmo natural ($\ln$ = logaritmo decimal x 2,302585)

3.4 Experimento II: omissão de macronutrientes no desenvolvimento de plantas de pinhão-mansô

No experimento de omissão de macronutrientes, os tratamentos utilizados foram: soluções nutritiva completa (controle) e deficientes em N, P, K, Ca, Mg e S (Tabela 1). As plantas foram cultivadas por 130 dias. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos ao acaso, com os tratamentos arranjados nas unidades experimentais, constando de quatro repetições, em que as parcelas corresponderam aos tratamentos – deficiências de macronutrientes - e as subparcelas às épocas de avaliações (avaliações semanais). Semanalmente, foi efetuada a altura da parte aérea a partir do colo da planta; o diâmetro de caule, a dois centímetros do colo, com o uso de paquímetro (LAVRES JUNIOR et al., 2009); e a determinação indireta do teor de clorofila, expresso em unidades SPAD (MINOLTA CAMERA Co., 1989), no lóbulo mediano da terceira e quarta folhas recém-expandidas (LAVRES JUNIOR et al., 2005).

3.4.1 Determinações das atividades da redutase do nitrato, da fosfatase ácida, peroxidase e teste bioquímico de poliaminas

As avaliações foram realizadas aos 20, 30 e 40 DAT e próximo ao final do experimento (120 DAT). Foram utilizadas a terceira ou quarta folha superior recém-madura – folhas utilizadas para a diagnose foliar (LAVRES JUNIOR et al., 2005). As avaliações bioquímicas foram efetuadas conforme o esquema abaixo:

- redutase do nitrato: tratamentos com as omissões individuais de: N, P, K, S e tratamento completo;
- fosfatase ácida: tratamento com a omissão de P e tratamento completo;
- peroxidase e poliaminas: tratamento com a omissão de K e tratamento completo.

A atividade da redutase do nitrato [E.C. 1.6.6.1] foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Mulder, Boxma e Veen (1959). Uma amostra de 200 mg do tecido foliar foi picada e incubada por 2 horas em uma solução de KNO_3 em tampão fosfato pH 7,4. Após a incubação, uma alíquota de 1 mL do meio foi amostrada para análise de NO_2^- . Adicionou-se 1 mL de ácido sulfanílico e HCl a 20 % para paralisar a reação anterior. Em seguida, foi adicionado 1 mL de alfa-naftalamina e submetido o extrato líquido em colorímetro com comprimento de onda a 560 nm para determinação da absorbância. A determinação da atividade de redutase do nitrato se deu em função da concentração de nitrito do extrato estabelecida por curva padrão.

A determinação da atividade da fosfatase ácida [E.C. 3.1.3.2] foi realizada seguindo método descrito por Raposo et al. (2004). Uma amostra de 100 mg do tecido foliar foi picada e incubado com 8 mL de para-nitrofenilfosfato ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a pH 4,0 e mantido em banho-maria por 30 minutos a 30°C . Posteriormente, foram adicionado 2 mL de NaOH (2 mol L^{-1}) a 5 mL do sobrenadante e as leituras foram realizadas em colorímetro com comprimento de onda a 490 nm. A determinação da atividade da fosfatase ácida se deu em função da concentração de fosfato do extrato estabelecida por curva padrão.

Para a determinação da atividade da peroxidase [E.C.1.11.1.7], 200 mg das amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio pH 6,7 e centrifugadas a $12.100 \times g$, por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi usado para determinação da atividade da dessa enzima pelo método descrito por Allain et al. (1974). As leituras foram realizadas em colorímetro com comprimento de onda a 505 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido/min.mg de massa fresca}$.

As poliaminas foram determinadas nas folhas seguindo a técnica proposta por Flores e Galston (1982). Foram previamente pesadas e homogeneizadas 200 mg de amostra em ácido perclórico 5% resfriado (100 mg mL^{-1}), deixadas por 1 hora em banho de gelo e centrifugadas a $12.100 \times g$ por 20 minutos. O sobrenadante contendo poliaminas livres foi usado para dansilação. O processo de dansilação consistiu na adição de cloreto de dansila (5-[diametilamino] naftaleno 1-sulfonil [cloreto]), 400 mL de solução acetona (5 mg mL^{-1}) e

200 mL de Na_2CO_3 saturado junto à 200 mL do sobrenadante. Após agitação, a mistura foi deixada a temperatura ambiente, no escuro, por 16 horas. Posteriormente foi adicionada prolina (100 mL- 100 mg mL^{-1} de água), sendo que a mistura foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. As poliaminas foram extraídas com 500 mL de benzeno e a fase orgânica foi usada para determinação por cromatografia de camada delgada, em placas recobertas por sílica gel 60G. Como fase móvel utilizou-se clorofórmio-trietilamina (25:2 v/v). Quantidades conhecidas de padrões de poliaminas foram dansiladas e cromatografadas da mesma maneira. A determinação quantitativa das poliaminas foi realizada em densitômetro (Helena) (Figura 1). Os teores de poliaminas livres foram expressos em nmol/g matéria fresca.

Figura 1 - Perfil de putrescina (put), espermidina (spd) e espermina (spn) extraídas da terceira folha recém-expandida de plantas de pinhão-mansó desenvolvidas em solução completa e com omissão K, visualizadas sob a luz UV

3.4.2 Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas (taxa fotossintética [A] e condutância estomática [Gs]) foram efetuadas, aos 20, 30 e 40 DAT e próximo ao final do experimento (120 DAT), no período da manhã, entre 9:00 e 11:00 horas. Foram utilizadas a terceira ou quarta folha superior recém-madura – folhas utilizadas para a diagnose foliar (LAVRES JUNIOR et al., 2005). Foi utilizado um analisador portátil de gás por infravermelho (*Infrared Gas Analyzer – IRGA, LI 6400, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA*). O fornecimento de CO_2 foi de aproximadamente de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$. A intensidade luminosa foi de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com

temperatura da folha mantida entre 20 a 25°C (REIS et al., 2009). Por meio do produto entre os parâmetros de trocas gasosas e a área foliar foi determinada a taxa fotossintética por planta [$A \times \text{Área foliar}$] e a condutância estomática por planta [$G_s \times \text{Área foliar}$] (ANTEN; WERGER; MEDINA, 1998).

3.4.3 Área foliar e acúmulo de massa seca; análise química do material vegetal e cálculo de eficiências nutricionais

Na ocasião da colheita das plantas (130 DAT) ocorreu a separação das plantas em folhas recém-expandidas (superiores), folhas maduras (demais folhas), caule e raízes. Em seguida, os limbos (das folhas recém-expandidas e maduras) tiveram suas áreas foliares (A_f) quantificadas, por meio de sistema digital integrador de área LICOR[®], modelo LI-3100.

O material vegetal foi identificado, acondicionado em sacos de papel e secado em estufa a 65°C ($\pm 0,5$) durante 72 horas. Posteriormente, foi pesado, triturado em moinho tipo Wiley (peneira com diâmetro de malha de 1 mm) para as determinações das concentrações de N, P, K, Ca, Mg e S nos tecidos vegetais, de acordo com metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

As quantidades acumuladas dos nutrientes nos tecidos vegetais foram calculadas pela multiplicação da concentração com o valor da massa seca de cada parte da planta. A partir desses resultados, calcularam-se: i) eficiência de utilização ($EU, g^2 \text{ mg}$) = (massa seca da parte aérea, g)²/(acúmulo do nutriente na parte aérea, mg) (SIDDIQI; GLASS, 1981) e ii) eficiência de absorção ($EA, \text{mg g}^{-1}$) = (acúmulo total do nutriente, mg)/(massa seca do sistema radicular, g) (SWIADER et al., 1994).

3.5 Análise dos resultados

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico SAS – System for Windows 9.2 (SAS INSTITUTE, 2000). Foi realizada análise de variância para as variáveis respostas em função dos dias de avaliação (Experimento 1 e Experimento 2). No caso de interação significativa, procedeu-se o estudo de regressão para os componentes de primeiro e segundo grau. Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, pelo teste F ($p \leq 0,05$), e pelo coeficiente de determinação.

Os dados de produção de massa seca, de área foliar e de taxa fotossintética (assimilação de CO₂ e condutância estomática) obtidos ao final do experimento foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$) e em função da significância, procedeu-se ao teste de comparação de médias entre os tratamentos (Tukey, $p \leq 0,05$).

Também foram analisados os coeficientes de correlação (r) de Pearson, por meio da elaboração da matriz de correlação simples entre as concentrações foliares de nitrogênio e atividade da redutase do nitrato, bem como a correlação simples entre as concentrações foliares de macronutrientes, área foliar, unidades SPAD e massa seca total com os parâmetros de trocas gasosas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Marcha de absorção de macronutrientes em plantas de pinhão-mansó

4.1.1 Produção de massa seca

A produção de massa seca total, bem como o acúmulo de massa seca de raiz e caule, apresentou ajuste linear crescente durante todo o período de avaliação (Figura 2). Desta forma, as plantas ainda encontravam-se em fase de acúmulo de biomassa, visto a ausência da representação gráfica do platô, ou até de uma sigmóide. Diferentemente do observado para a produção de massa seca das folhas, em que o máximo acúmulo de massa seca ocorreu em aproximadamente 86 DAT. Deve-se considerar também que as avaliações contemplaram apenas alguns estágios do período vegetativo da planta, e ao final do experimento não havia indícios de início do florescimento.

Figura 2 - Acúmulo de massa seca de raízes, caule, folhas e total das plantas de pinhão-mansó, em função do tempo, desenvolvidas em solução nutritiva completa. ** - significativo a 1 % de probabilidade

O fato do maior acúmulo de massa seca ocorrer durante o ciclo de cultivo pelas folhas, e não ao final do experimento, é explicado pela maior alocação de carboidratos para o desenvolvimento do caule em função do desenvolvimento das plantas de pinhão-mansó. O

desenvolvimento do caule promoveu a redistribuição de fotoassimilados, provavelmente levando a redução na massa seca das folhas (TAIZ; ZEIGER, 2009), pois é uma espécie decídua. Esse fato pode ser comprovado também pela senescência das folhas do terço inferior durante a condução das plantas. Ademais, espécies arbóreas, como o pinhão-mansão, tendem a apresentar maior contribuição do caule na massa seca total em relação às demais partes vegetais, com o aumento do ciclo vegetal (ALBUQUERQUE et al., 2009).

4.1.2 Parâmetros de crescimento

A taxa de crescimento absoluto (TCA), que representa a velocidade de crescimento do pinhão-mansão, foi influenciada pela época de amostragem das plantas, sendo que a maior TCA ocorreu aos 35 dias após o início dos tratamentos (DAT) (Tabela 2). Assim, na fase inicial do desenvolvimento as plantas de pinhão-mansão apresentam crescimento pronunciado até os 35 DAT, com tendência a reduzir o crescimento diário das mudas. Resultados semelhantes foram observados para a razão da massa foliar (RMF) e para a taxa de crescimento relativo (TCR) (Tabela 2).

Tabela 2 -Taxa de crescimento absoluto (TCA), taxa de crescimento relativo (TCR) e razão da massa foliar (RMF) de plantas pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos

Época de avaliação	TCA	TCR	RMF
	g g/dia	g g/dia	g g ⁻¹
7 DAT	0,181	0,034	0,473
21 DAT	0,349	0,113	0,472
35 DAT	0,780	0,073	0,253
49 DAT	-0,173	-0,011	0,278
63 DAT	0,401	0,023	0,248
77 DAT	0,389	0,017	0,208
91 DAT	0,138	0,005	0,185
105 DAT	0,335	0,011	0,163
119 DAT	0,071	0,002	0,147

* Para a TCA e a TCR da primeira época de avaliação (7 DAT), foi considerado $M_1 = 0$ e $(T_2 - T_1) = 7$.

A maior RMF ocorreu no início do desenvolvimento das plantas de pinhão-mansão (7 e 21 DAT), sendo observado que com o desenvolvimento das plantas há decréscimo nos valores de RMF (Tabela 2). As folhas constituem no principal órgão fotossintético, assim as demais partes da plantas dependem da exportação de fotoassimilados produzidos nestas. Desta maneira a RMF expressa à fração de massa seca não exportada das folhas para as outras

partes vegetais (BENINCASA, 1988). Esse resultado corrobora com aquele observado para a produção de massa seca das folhas (Figura 2), no qual com o desenvolvimento das plantas de pinhão-mansó ocorreu maior alocação de carbono (biomassa) para o caule, explicando a redução da RMF em função da época de amostragem. Nos estágios iniciais da cultura o caule é pouco desenvolvido, sendo as folhas os órgãos (partes) com maior representatividade em relação ao acúmulo de massa seca total da planta. Essa relação tende a inverter à medida que o caule desenvolve-se e torna-se mais lignificado.

A TCR foi influenciada por cada época de amostragem das plantas de pinhão-mansó (Tabela 2). A variação em função do crescimento mostrou elevados valores nas primeiras semanas, com TCR máxima aos 21 DAT, exibindo maior queda a partir dos 49 DAT com progressiva redução, tendendo à estabilidade posteriormente. Vale destacar que a TCR e a TCA apresentaram valores negativos aos 49 DAT indicando a alta redução nessa época de amostragem (BENINCASA, 1988).

A redução na TCA e TCR com o desenvolvimento da planta é esperada em qualquer espécie vegetal nas primeiras semanas, pois no início do crescimento a predominância da biomassa de folhas jovens (alta RMF) garante elevada fixação de carbono e, por conseguinte, acentuado acúmulo de massa seca. Com o desenvolvimento da planta, a alocação de assimilados para a produção de outras estruturas que não as folhas e atendimento de suas perdas respiratórias comprometem a TCA e a TCR. Para as plantas de pinhão-mansó, a alocação de assimilados ocorreu para o desenvolvimento do caule. Entretanto, a redução dos parâmetros de crescimento avaliados foi apenas refletida na constituição do ponto de inflexão na produção de folhas (Figura 2).

As mudas de pinhão-mansó promoveram a alocação de fotoassimilados para o desenvolvimento do caule, sendo essa alocação de carbono representada em um ponto de inflexão na produção de massa seca das folhas, estimada aos 86 DAT, por meio da derivação da equação $\hat{Y} = 0,295 + 0,120X - 0,0007X^2$ (Figura 2). Segundo Nascimento et al. (2012), o ponto de inflexão corresponde à época de avaliação em que o acúmulo diário do órgão vegetal passa a decrescer. A modificação do tecido vegetal responsável pelo maior acúmulo de massa seca é comum em função da mudança de período de crescimento, no qual aumentam a relação de dreno dos tecidos mais novos, principalmente os tecidos dos órgãos reprodutivos (ZOBIOLE et al., 2010).

4.1.3 Acúmulo de macronutrientes

O acúmulo de N aumentou de forma linear em todas as partes vegetais com o desenvolvimento das plantas (Figura 3A). O pinhão-mansinho apresenta alta taxa de crescimento inicial, sendo o N essencial para assimilação de carbono no início do ciclo de desenvolvimento desta espécie (LAVIOLA; DIAS, 2008), explicando o padrão de absorção linear de N. O valor correspondente ao máximo acúmulo total (folha + caule + raiz) de N foi de aproximadamente 261 mg/planta.

O maior acúmulo relativo de N foi observado inicialmente nas folhas (Figura 3B). Aos 7 DAT o acúmulo de N nas folhas foi de 69 % do total absorvido pelas plantas, contudo, esse acúmulo relativo foi reduzido à 15 % ao final do experimento, diferentemente dos resultados encontrados para o caule, no qual o acúmulo relativo de N aumentou de 19 % (7 DAT) para 58 % (119 DAT). Entretanto, o acúmulo relativo de N na raiz foi contínuo, apresentando em média 17 % do acúmulo total das plantas em todas as épocas de avaliação. A variação do acúmulo relativo de N nas folhas em função do crescimento indicou elevados valores nas primeiras semanas, exibindo progressiva redução a partir dos 21 DAT. Vale destacar que, a partir dos 77 DAT, a taxa de acúmulo de N no caule aumentou de forma acentuada, ocorrendo maior redistribuição das folhas para o caule (Figura 3B), o que é coerente, em função da alta mobilidade deste nutriente no floema.

Figura 3 - Marcha de absorção de nitrogênio (N) [A] e respectivo acúmulo relativo [B] para cada parte das plantas de pinhão-mansinho desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

O acúmulo de P aumentou com desenvolvimento das plantas de pinhão-mansão em todas as partes vegetais (Figura 4A). Entretanto, apenas no caule este evento foi representado pelo aumento linear em função da época de avaliação, indicando possível incremento da absorção de P por este órgão em épocas de avaliação superiores as estudadas neste trabalho. A maior absorção de P pelas plantas ocorreu inicialmente nas folhas sendo redistribuídos para o caule. Assim, com o desenvolvimento das plantas de pinhão-mansão o acúmulo relativo das folhas diminuiu e o acúmulo relativo do caule aumentou (Figura 4B).

Comparando o início (7 DAT) e o final do experimento (119 DAT) as folhas reduziram o acúmulo relativo de P de 51 % para 19 %, inversamente o caule aumentou o acúmulo relativo de 29 % para 53 %. Ademais, o acúmulo relativo de P na raiz foi contínuo no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão, apresentando em média 16 % do acúmulo total das plantas em todas as épocas de avaliação, conforme também observado para o N. Porém, ao final do experimento, o acúmulo relativo de P na raiz tendeu a aumentar (Figura 4A).

Figura 4 - Marcha de absorção de fósforo (P) [A] e respectivo acúmulo relativo [B] para cada parte das plantas de pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

O acúmulo de K aumentou com desenvolvimento das plantas de pinhão-mansão em todas as partes vegetais (Figura 5A). Da mesma forma que o observado para o P, aos 21 DAT, a taxa de acúmulo de K reduziu na folha, devido à redistribuição para o caule (Figura 5B), o que é explicado pela alta mobilidade deste elemento quanto à redistribuição, como destacado também para o N e para o P. A maior taxa fotossintética no início do desenvolvimento das mudas de pinhão-mansão, verificada por Yong et al. (2010), ajuda a explicar o incremento no acúmulo de N no caule mais tardio (77 DAT) em comparação ao aumento do acúmulo relativo de P e K (21 DAT), observado neste estudo. Desta maneira, a maior taxa

fotossintética inicial das plantas provocou a maior necessidade de N nas folhas (principal órgão fotossintético), promovendo o maior acúmulo relativo de N nas folhas até os 77 DAT. Depois dessa época, as plantas começaram a redistribuir N a fim de garantir a adequada formação da planta. Vale destacar que ocorreu redução do acúmulo relativo de N a partir dos 21 DAT, contudo apenas aos 77 DAT é que o acúmulo relativo de N encontrado no caule foi superior ao observado nas folhas (Figura 2B).

O acúmulo relativo de K nas folhas reduziu de 44 %, aos 7 DAT, para 18 %, aos 119 DAT. Já para o acúmulo relativo de K no caule, ocorreu aumento de 32 %, aos 7 DAT, para 56 %, aos 119 DAT. O acúmulo relativo de K na raiz foi contínuo no desenvolvimento inicial do pinhão-manso, apresentando em média 16 % do acúmulo total das plantas em todas as épocas de avaliação. Porém, ao final do experimento, o acúmulo relativo de K na raiz tendeu a aumentar (Figura 5A).

Figura 5 - Marcha de absorção de potássio (K) [A] e respectivo acúmulo relativo [B] para cada parte das plantas de pinhão-manso desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

O acúmulo de Ca aumentou linearmente em todas as partes vegetais com o desenvolvimento das plantas (Figura 6A). O maior acúmulo relativo ocorreu nas folhas em todo período experimental, seguido do caule e da raiz (Figura 6B). A média do acúmulo relativo de Ca foi de 57 %, 32 % e 11 %, para as folhas, caule e raiz, respectivamente. Deve-se enfatizar que, o Ca é um elemento com baixíssima mobilidade quanto à redistribuição e o transporte a longa distância é governado pela taxa de transpiração das folhas (KERTON et al., 2009).

Figura 6 - Marcha de absorção de cálcio (Ca) [A] e respectivo acúmulo relativo [B] para cada parte das plantas de pinhão-manso, desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

O acúmulo de Mg aumentou em todas as partes vegetais com o desenvolvimento das plantas de pinhão-manso (Figura 7A). De forma semelhante ao Ca o acúmulo relativo de Mg manteve-se constante em todas as partes vegetais (Figura 7B). A média do acúmulo relativo de Mg foi de 59 %, 29 % e 12 %, para as folhas, caule e raiz, respectivamente.

Figura 7 - Marcha de absorção de magnésio (Mg) [A] e respectivo acúmulo relativo [B] para cada parte das plantas de pinhão-manso, desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

A absorção de S pelas plantas de pinhão-manso aumentou em função dos dias de cultivo (Figura 8A). Da mesma forma que o observado para o N, P e K, o maior acúmulo relativo ocorreu inicialmente nas folhas, sendo posteriormente redistribuído para o caule (Figura 8B). Aos 7 DAT o acúmulo de S foi de 58 %, sendo reduzido à 19 % ao final do experimento. Diferentemente do aumento de acúmulo relativo observado para o caule, no qual

apresentou 23 % aos 7 DAT e 56 % aos 119 DAT. Já o acúmulo relativo de S na raiz foi contínuo no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão, apresentando em média 20 % do acúmulo total das plantas, em todas as épocas de avaliação. Porém, ao final do experimento, o acúmulo relativo de S na raiz aumentou (Figura 8A). A partir dos 21 DAT, a taxa de acúmulo de S começou a diminuir na folha, sendo constatado maior acúmulo no caule (Figura 8B).

Figura 8 - Marcha de absorção de enxofre (S) [A] e respectivo acúmulo relativo [B] para cada parte das plantas de pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa, em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

Os resultados observados para os acúmulos relativos de N P, K e S seguiram o mesmo padrão, pois o acúmulo desses nutrientes em função das épocas de avaliação aumentou no caule, reduziu nas folhas e manteve-se constante nas raízes. Esse resultado é explicado em parte pela maior contribuição da massa seca do caule, ao final do experimento, em relação às outras partes (Figura 2). Desta maneira, de forma similar ao observado para a redistribuição de carbono, as plantas de pinhão-mansão redistribuíram N, P, K e S para o caule, a fim de garantir o desenvolvimento da planta. Vale destacar que a redistribuição destes nutrientes ocorreu preferencialmente para o caule, sendo a folha o principal órgão-fonte para essa repartição.

A baixa mobilidade do Ca no floema explica os resultados observados do maior acúmulo relativo deste elemento no tecido foliar (Figura 6B). A baixa redistribuição do Ca ocorre pelo fato de que predominam, em muitas espécies de plantas, formas do elemento insolúveis em água como o pectato da lamela média da parede celular (MALAVOLTA, 2006). Apesar do S também ser considerado pouco móvel quanto à redistribuição, as plantas de pinhão-mansão demonstraram realocação deste elemento das folhas para o caule (Figura 8B), ou mesmo, pela maior quantidade acumulada no caule, em função da maior proporção de biomassa alocada nesta parte. A alta capacidade de redistribuição deste elemento das folhas

para o caule pode explicar, em parte, a aparente eficiência de utilização de S por plantas de pinhão-mansão. Todavia, deve-se ressaltar que não existe um padrão de remobilização de S entre as espécies, bem como pode haver variação intraespecífica, ou genotípica, quanto à redistribuição via floema (MARSCHNER, 2012). Por sua vez, os acúmulos de Mg foram maiores nas folhas. Assim o acúmulo de Mg pelas diferentes partes vegetais das plantas de pinhão-mansão não seguiu o mesmo padrão observado para N, P, e K, nutrientes também considerados altamente móveis no floema. Em condições de suprimento adequado de Mg, este macronutriente apresenta maior concentração nos cloroplastos (MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2012), explicando o maior acúmulo deste elemento nas folhas e a sua importância no processo fotossintético.

Lima et al. (2011b) relataram que os nutrientes N, P, K e S são intensamente redistribuídos das folhas mais velhas para outros tecidos da planta de pinhão-mansão, enquanto ocorre pouca redistribuição de Ca e Mg. No presente trabalho, o N, P, K e S foram redistribuídos, ou mais alocados, para formação do caule. Assim, o caule representou forte dreno no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão.

A ordem decrescente do acúmulo de macronutrientes verificada no desenvolvimento inicial de plantas de pinhão-mansão aos 119 DAT foi: $\text{Ca} \geq \text{N} > \text{K} > \text{Mg} > \text{S} > \text{P}$. Assim, as quantidades totais acumuladas por planta pinhão-mansão foram aproximadamente de 203, 30, 169, 211, 87 e 52 mg de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente. Fazendo-se uma estimativa, considerando uma população de 5000 plantas por hectare, a quantidade acumulada dos nutrientes pelas mudas de pinhão-mansão seria de 1,01; 0,15; 0,85; 1,06; 0,44 e 0,26 kg ha⁻¹ de N, P, K, Ca, Mg e S, respectivamente aos 119 DAT.

4.2 Omissão de macronutrientes no desenvolvimento de plantas de pinhão-mansão

4.2.1 Diagnose Visual

Os sintomas das deficiências nos tratamentos foram observados em épocas distintas. A primeira manifestação ocorreu em plantas mantidas em solução com omissão de Ca aos 40 DAT, seguida de N aos 50 DAT, Mg aos 60 DAT e K aos 80 DAT. Não foram observadas manifestações visuais de deficiências de P e S. Todavia, as plantas cultivadas em solução com a omissão nesses nutrientes apresentaram menor desenvolvimento em relação às plantas cultivadas em solução completa, ou seja, reduções na altura, diâmetro e produção de massa seca.

Os sintomas iniciais de deficiência de Ca (Apêndice A1) foram observados nas folhas em expansão, sendo caracterizados pela má formação dos limbos, apresentando clorose generalizada e posterior senescência. As plantas cultivadas com omissão de Ca apresentaram morte do meristema apical aos 80 DAT, bem como um escurecimento generalizado das raízes, seguido de podridão (Apêndice A2).

Os sintomas visuais de N (Apêndice B1) ocorreram de forma generalizada na planta, as quais apresentaram folhas maduras (mais velhas) e caule com coloração verde claro. Os sintomas acentuaram-se com o tempo de cultivo, sendo observado amarelecimento, senescência e queda precoce das folhas maduras. As plantas apresentavam porte baixo, com poucas folhas e sistema radicular pouco desenvolvido, bem como número reduzido de raízes secundárias (Apêndice B2).

No tratamento com omissão de Mg foram verificados sintomas nas folhas maduras, que apresentaram clareamento da tonalidade verde, formando linhas claras entre as nervuras secundárias (clorose internerval) das folhas maduras (Apêndice C1). Com a evolução dos sintomas, estas se tornaram amareladas, conferindo ao limbo aspecto de variação, verde amarelado, surgindo necrose a partir das margens, dirigindo-se para a região central do limbo (Apêndice C2). Observaram-se também pontuações de coloração verde translúcidas, que evoluíram para necrose entre as nervuras secundárias. Sintomas semelhantes da deficiência de N, Ca e Mg foram observados e relatados por Lavres Junior et al. (2009) em mamoneira, espécie pertencente à mesma família botânica do pinhão-mansão.

Os sintomas de deficiência de K ocorrem nas folhas maduras, observando-se clorose marginal, com posterior evolução para necrose, bem como murcha das folhas, notadamente as mais velhas (Apêndice D1). Observaram-se, também, pontuações escuras e pardas (Apêndice D2), indicando o acúmulo de putrescina (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997) e que foram confirmadas com a avaliação bioquímica aos 120 DAT.

4.2.2 Altura das plantas, diâmetro do caule, produção de massa seca e área foliar total

Os tratamentos com omissão em Ca, N e Mg foram o que mais limitaram o crescimento da parte aérea das plantas (Figuras 9 e 10), destacando-se o tratamento com omissão de Ca. Laviola e Dias (2008) relataram a alta exigência de Ca por esta oleaginosa, sendo importante que o substrato de cultivo apresente teores adequados desse nutriente. Neste sentido é muito questionável a assertiva de que a espécie é rústica, pouco exigente em fertilidade do solo e que o seu cultivo deve ser destinado somente a áreas marginais. Todavia, não foi observada diferença na altura das plantas e no diâmetro do caule entre os tratamentos completos e com as omissões de P e S, em todas as épocas de avaliação (Figuras 9 e 10).

As plantas cultivadas no tratamento completo apresentaram maior produção de massa seca de raiz, caule e de folhas em relação aos demais tratamentos (Figura 11). Da mesma forma que o observado para a altura e o diâmetro das plantas, o Ca foi o nutriente que mais limitou a produção de massa seca para todas as partes vegetais. Na condição de omissão de Ca, a produção de massa seca reduziu aproximadamente 81 % e 91 % para a parte aérea (folhas + caule) e para as raízes, respectivamente, em relação às plantas do tratamento controle. Deve-se considerar que o menor desenvolvimento das plantas na condição de omissão de Ca pode ser explicado pela redução no crescimento e pela morte celular em função da desorganização de funções metabólicas, como a permeabilidade seletiva da membrana e a não operação dos mecanismos de sinalização, pois o Ca opera como mensageiro secundário como reportaram (MENGEL; KIRKBY, 2001).

Figura 9 - Altura média das plantas de pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa (●) e com omissão de N (○), P (▼), K (▽) Ca (▲) Mg (△) e S (■), em função dos dias após o início dos tratamentos ** - significativo a 1 % de probabilidade

Figura 10 - Diâmetro médio do caule das plantas de pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa (●) e com omissão de N (○), P (▼), K (▽) Ca (▲) Mg (△) e S (■), em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

Figura 11 - Produção de massa de seca em plantas de pinhão-mansó desenvolvidas em solução nutritiva completa e com omissão de N, P, K, Ca, Mg e S, aos 130 dias após o início dos tratamentos

A maior limitação na produção de massa seca em pinhão-mansó pela carência de Ca também foi relatada por Silva et al. (2009). O cálcio está intimamente ligado à produção de massa seca, pois esse nutriente é importante para manter a integridade estrutural e funcional das membranas e da parede de celular. Ademais, é exigido para a divisão e expansão das células, bem como atua na ativação de algumas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, como a ATPase e alfa-amilase (MALAVOLTA, 2006). Cabe destacar também que, em trabalho realizado por Laviola e Dias (2008) foi constatado que o Ca é o segundo nutriente de maior extração pelas folhas de pinhão-mansó, enfatizando a alta necessidade do Ca por esta espécie.

Nos tratamentos com as omissões de N e Mg as produções de massa seca da parte aérea reduziram em 70 % em relação ao tratamento completo. Já as omissões de P e K limitaram a produção de massa seca em 43 % e 41 %, respectivamente. Os menores efeitos de deficiência na produção de massa seca foram observados no tratamento com a omissão de S, com redução de 9 % e 21 %, para as folhas e caule, respectivamente.

Em relação à produção de massa seca de raízes, as omissões de Mg, N, K, P e de S provocaram reduções de 75 %, 59 %, 49 % e 30 % e 13 %, respectivamente, em relação ao tratamento completo. A redução na produção de massa seca da parte aérea ocorreu na seguinte ordem: Ca>Mg=N>K>P>S. Para as raízes a ordem de limitação de acúmulo de massa seca foi: Ca>Mg>N>P>K>S.

As omissões de Mg, Ca, N, K, P e de S reduziram a área foliar avaliada ao final do experimento em 96 %, 94 %, 89 %, 72 %, 49 % e 12 %, respectivamente, em relação ao tratamento completo (Figura 12). A maior redução da área foliar total no tratamento com omissão de Mg ($49 \text{ cm}^2/\text{planta}$) de Ca ($78 \text{ cm}^2/\text{planta}$) e N ($152 \text{ cm}^2/\text{planta}$) ocorreu, provavelmente, pela senescência precoce imposta pela carência deste nutriente. A senescência foliar pode ocorrer prematuramente sob condições ambientais adversas, inclusive a limitação de nutrientes (LIM; KIM; NAM, 2007).

As menores reduções da área foliar das omissões de P ($702,03 \text{ cm}^2/\text{planta}$) e de S ($1105,70 \text{ cm}^2/\text{planta}$), em relação ao tratamento completo ($1364,32 \text{ cm}^2/\text{planta}$), podem ser explicadas pela ausência de sintomas destes elementos, bem como a adaptação do pinhão-mansó a condições de omissão de P e S. Deve-se acrescentar também que, as quantidades remobilizadas de P e de S das sementes para as plântulas, bem como o período de adaptação das plantas nas soluções diluídas (antes do início dos tratamentos) podem ter favorecido este fenômeno, o que pode indicar por um lado baixa exigência destes dois elementos nas fases iniciais e, por outro, alta eficiência de uso de P e S.

Figura 12 - Área foliar total das plantas de pinhão-mansó desenvolvidas em solução nutritiva completa e com omissão de N, P, K, Ca, Mg e de S, aos 130 dias após o início dos tratamentos

4.2.3 Acúmulo e eficiência de macronutrientes

O acúmulo de macronutrientes nos tecidos vegetais – partes das plantas - foi incrementado mediante a adição desses nutrientes na solução nutritiva (Tabela 3), indicando que os tratamentos utilizados resultaram em mudas de pinhão-manso com estado nutricional distinto, favorecendo o desenvolvimento de plantas deficientes e “sadias”, ou bem nutridas. Além disso, as concentrações foliares de macronutrientes foram positivamente correlacionadas com o crescimento das mudas de pinhão-manso, demonstrando, por um lado, maior desenvolvimento das plantas bem nutridas e por outro, a limitação imposta pela deficiência de macronutrientes às reduções de massa seca.

Tabela 3 - Acúmulo de N, P, K, Ca, Mg e S (g/planta) nos componentes da parte aérea e raízes das plantas de pinhão-manso desenvolvidas em solução completa e com omissão individual de cada elemento

Tratamento	Folha Superior	Folha Inferior	Caule	Raiz
Acúmulo de N, g/planta				
Completo	90,69Ac	108,92Ac	807,56Aa	267,71Ab
Omissão de N	7,54Bb	14,45Bb	64,72Ba	33,39Bb
CV(%)	5,76	3,72	14,87	19,58
Acúmulo de P, g/planta				
Completo	4,03Ac	7,31Ac	77,33Aa	27,96Ab
Omissão de P	1,35Bc	1,43Bc	24,58Ba	9,68Bb
CV(%)	27,03	8,07	11,95	11,82
Acúmulo de K, g/planta				
Completo	109,13Ac	121,39Ac	662,99Aa	521,99Ab
Omissão de K	0,42Bb	5,57Bb	17,54Bb	20,98Ba
CV(%)	2,01	3,3	9,89	11,84
Acúmulo de Ca, g/planta				
Completo	29,38Ac	115,12Aa	106,43Aab	62,30Ab
Omissão de Ca	0,45Bac	15,91Ba	4,52Bb	0,98Bb
CV(%)	29,61	29,7	12,74	14,99
Acúmulo de Mg, g/planta				
Completo	20,79Ab	39,31Aa	44,93Aa	21,12Ab
Omissão de Mg	0,32Bc	3,76Ba	2,49Bab	1,82Bb
CV(%)	39,01	25,78	4,69	16,28
Acúmulo de S, g/planta				
Completo	6,53Ab	8,87Ab	34,72Aa	26,53Aa
Omissão de S	4,92Aa	6,34Aa	10,68Ba	13,12Aa
CV(%)	43,76	37,68	14,88	29,52

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa a 5 % de probabilidade

Os maiores acúmulo de N e P ocorreram no caule em ambas às condições de disponibilidade de nutrientes (solução completa e omissão do nutriente analisado). As quantidades de N absorvidas pelo caule corresponderam a 63 % (807,56 µg/planta) e 53 % (64,72 µg/planta) do total absorvido pela planta para o tratamento completo e com omissão de N, respectivamente. Por sua vez o acúmulo de P no caule correspondeu a 66 % do total absorvido pelas plantas de pinhão-manso cultivadas tanto na solução completa, quanto naquela com omissão de P. Já para o K, os maiores acúmulos deste elemento ocorreram o caule das plantas cultivadas em solução completa e nas raízes das plantas cultivadas em solução com omissão de K.

Os maiores acúmulos de Ca ocorreram nas folhas inferiores das plantas de pinhão-manso. Contudo, em condição de omissão de Ca as folhas inferiores absorveram 71 % (15,91 µg/planta) do total absorvido reduzindo a absorção relativa para 37 % (115,12 µg/planta) quando cultivadas em solução nutritiva completa. Para o Mg, as partes que apresentaram as maiores absorções deste macronutrientes foram as folhas inferiores e o caule. O acúmulo do caule+folhas inferiores representaram 67 % do total absorvido pelas plantas cultivadas em solução nutritiva completa e 74 % do total absorvido pelas plantas cultivadas na condição omissão de Mg. As plantas de pinhão-manso cultivadas em solução nutritiva completa apresentaram o maior acúmulo de S no caule e na raiz. Ademais, não ocorreram diferenças entre as partes vegetais quanto aos acúmulos de S nas plantas cultivadas com omissão de S.

No desenvolvimento inicial das plantas de pinhão-manso a eficiência de absorção (EA) foi influenciada pela disponibilidade de macronutrientes na solução de cultivo, exceto para o Ca. Desta forma, a plantas cultivadas em solução nutritiva completa apresentaram maior EA do que as plantas cultivadas com omissão individual de macronutrientes (Tabela 4). O fornecimento de cada macronutriente influência na sua própria absorção pelo pinhão-manso, o que pode resultar em mudanças significativas na massa seca, no comprimento e na superfície das raízes desta espécie. Ademais, esse resultado pode ser atribuído a diversas características morfológicas das plantas, principalmente, a capacidade de desenvolver raízes secundárias quando bem nutridas (BALIGAR; FAGERIA; HE, 2001; LYNCH; HO, 2005; LIU et al., 2009), além de alterações na região da rizosfera estimuladas pela adequada quantidade de nutrientes na solução de cultivo (FAGERIA et al., 2010). Diferentemente, não foi observada interferência na EA de Capela disponibilidade de Ca em solução nutritiva.

Tabela 4—Eficiência de absorção (EA) e utilização (EU) de N, P, K, Ca, Mg e S em plantas de pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa e com omissão individual de cada elemento

Tratamento	EA	EU
	mg g ⁻¹	g ² mg
Completo	92,92A	1,35A
Omissão de N	21,64B	1,37A
CV(%)	8,03	15,07
Completo	8,50A	15,82A
Omissão de P	3,96B	16,25A
CV(%)	2,50	14,52
Completo	58,55A	1,52B
Omissão de K	29,43B	15,60A
CV(%)	5,41	31,58
Completo	22,89A	5,43A
Omissão de Ca	19,35A	2,43B
CV(%)	37,83	28,99
Completo	8,90A	13,39B
Omissão de Mg	2,51B	18,72A
CV(%)	11,71	26,27
Completo	5,52A	40,95A
Omissão de S	2,38B	27,21A
CV(%)	9,72	28,35

Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste da diferença mínima significativa, a 5 % de probabilidade

A capacidade de absorção de Ca similar encontrada nas plantas cultivadas em solução nutritiva completa e com omissão de Ca é explicada pela maior redução no desenvolvimento da parte aérea entre os tratamentos do presente trabalho (Figuras 9, 10, 11 e 12). O menor desenvolvimento das plantas cultivadas com omissão de Ca exigiu menor necessidade de absorção deste macronutriente para produção de biomassa, refletindo nos índices de absorção observados (Tabela 4). Ademais, as plantas deficientes apresentaram menor produção de massa seca e apodrecimento das raízes (Apêndice A), interferindo na dinâmica de absorção de Ca.

As plantas de pinhão-mansão apresentaram a mesma capacidade de utilização de N, P, e S quando cultivadas em solução nutritiva completa e com omissão individual (Tabela 4). Contudo, as omissões individuais destes elementos provocaram redução no desenvolvimento inicial das plantas de pinhão-mansão (Figuras 9, 10, 11 e 12). Vale destacar também que a omissão de N provocou redução de 70 % na produção de massa seca quando comparada às plantas cultivadas em solução nutritiva completa. Portanto, os resultados observados para a eficiência de utilização (EU) de N são explicados pelo menor desenvolvimento das plantas

deficientes em N, que por sua vez, exigiram uma menor utilização de N por g de massa seca produzida. Assim, a relação entre o acúmulo de N e a produção de massa seca da parte aérea foi similar nas plantas cultivadas em solução nutritiva completa e com omissão de N. Contudo, as plantas cultivadas com omissão de P e S apresentaram as menores reduções no desenvolvimento inicial e a mesma capacidade de utilização destes elementos, semelhante ao observado para a EU de N.

Os resultados observados para a EU de P e S pelas plantas de pinhão-mansó é explicado pela associação positiva entre a eficiência de utilização e a produção da massa seca da parte aérea (ZAMBROSI et al., 2012). A omissão individual destes elementos provocou as menores reduções no desenvolvimento inicial do pinhão-mansó (Figuras 9, 10, 11 e 12), destacando a mesma capacidade de utilização destes elementos em condições de omissão. Vale ressaltar que apenas as plantas cultivadas em solução nutritiva com omissão de P e S não apresentaram sintomas de carência destes macronutrientes. Desta forma, as plantas de pinhão-mansó produzem a mesma quantidade de massa seca por unidade de P e S absorvido, independente da disponibilidade destes elementos na solução de cultivo.

Para os valores de EU de K e Mg observa-se que as plantas de pinhão-mansó cultivadas com omissão individual destes macronutrientes apresentaram maior EU do que quando cultivadas em solução nutritiva completa (Tabela 4). A maior EU de K e Mg pelas plantas de pinhão-mansó em condições de omissão individual destes elementos indica a eficiência por esta espécie em utilizar K e Mg, ou seja, as plantas de pinhão-mansó produzem proporcionalmente mais massa seca por unidade de K e Mg absorvido quando estão deficientes. Entretanto, essa capacidade de utilização de K e Mg não foi suficiente para garantir o adequado desenvolvimento inicial das plantas de pinhão-mansó.

As plantas cultivadas em solução nutritiva completa apresentaram maior EU de Ca em relação às plantas cultivadas com omissão de macronutriente. A menor capacidade de utilização de Ca pelas plantas de pinhão-mansó em condições de carência deste elemento no cultivo foi refletida na altura (Figura 9), no diâmetro (Figura 10), na produção de massa seca (Figura 11) e na área foliar (Figura 12) das mudas de *Jatropha*, bem como no aparecimento dos primeiros sintomas de carência nas plantas.

4.2.4 Atividade da redutase do nitrato

As plantas de pinhão-manso cultivadas em solução nutritiva com omissão de N apresentaram menor atividade da redutase do nitrato nas primeiras datas de avaliação (20, 30 e 40 DAT) em relação aos outros tratamentos (Figura 13). A atividade dessa enzima tem sido frequentemente acompanhada, em diferentes espécies vegetais, como indicadora de mudanças associadas aos fatores moduladores na dinâmica da nutrição vegetal de N (JOHNSON; WHITTINGTON; BLACKWOOD, 1976; FIASCONARO; SANCHEZ-DÍAS; ANTOLÍN, 2013; KAWAKAMI; OOSTERHUIS; SNIDER, 2013). A redutase do nitrato está diretamente relacionada à absorção de N-NO_3^- pela planta, pois a mesma é a primeira enzima na via de redução do nitrato a nitrito, que por sua vez é convertido em amônia pela redutase do nitrito (MENGEL; KIRKBY, 2001), explicando as menores atividades dessa enzima das plantas cultivadas em omissão de N.

No tratamento com a omissão de P, a redutase do nitrato apresentou aumento inicial de atividade com posterior redução, de modo que aos 40 DAT, a atividade desta enzima foi aproximadamente 90 % maior que aquela observada no tratamento completo (Figura 13). A omissão de P estimulou o aumento da atividade da fosfatase ácida, que por sua vez aumenta a atividade da redutase do nitrato por meio da desfosforilação de vários resíduos serina da enzima (MARSCHNER, 2012). Outra possível explicação para tal fenômeno deve-se ao fato da menor concentração do íon H_2PO_4^- na solução nutritiva ter favorecido à maior absorção de NO_3^- pelas plantas, caracterizando o efeito iônico de inibição não-competitiva (MALAVOLTA, 2006).

Figura 13 - Determinação da atividade da redutase do nitrato em folhas recém-expandidas em plantas de pinhão-mansão desenvolvidas em solução completa e com a omissão de N, P, K e S, aos 20, 30, 40 e 120 dias após o início dos tratamentos

As plantas cultivadas em solução com omissão de K não apresentaram diferença da atividade da redutase do nitrato daquelas cultivadas em solução nutritiva completa (Figura 13). O potássio participa da ativação e da síntese da enzima redutase do nitrato (MARSCHNER, 2012). Todavia, o padrão de resposta da enzima a estes tratamentos é muito diferentemente dos resultados observados por Lavres Junior, Santos Junior e Monteiro (2010), os quais relataram aumento na atividade da enzima com o suprimento de K, em *Panicum maximum* cv. Mombaça. Os mesmos autores relataram que para quaisquer doses de N fornecidas na solução nutritiva combinadas com o nível mais baixo de K, não houve praticamente nenhuma variação da atividade da redutase do nitrato, indicando a importância do K na ativação enzimática do processo. Todavia, deve-se considerar que são espécies diferentes e com distintas exigências nutricionais. Deve-se acrescentar também que o K é o elemento mais extraído (acumulado) por gramíneas tropicais, da família Poaceae.

A maior atividade da redutase do nitrato observada no tratamento com omissão de K pode ser explicada pela utilização eficiente do nutriente contido nas reservas das plantas, oriundo da solução de adaptação e da própria semente. Além disso, a pronta incorporação do N-NH_4^+ aos esqueletos carbônicos da planta, em função da ausência efeito antiônico na absorção de N-NH_4^+ versus K^+ (inibição não-competitiva), possibilitou a menor utilização de K para ativação da redutase do nitrato e da redutase do nitrito (MALAVOLTA, 2006),

indicando alta eficiência de uso de K por estas plantas, como também relatado para o P e S (Tabela 4). Assim, a baixa quantidade K contida na planta (Tabela 3) foi suficiente para o uso eficiente da enzima no início do desenvolvimento das plantas de pinhão-mansão.

As plantas cultivadas em solução nutritiva com omissão de S apresentaram atividade da redutase do nitrato semelhante às plantas cultivadas em solução nutritiva completa (Figura 13). Este resultado é também explicado em parte pelo efeito iônico de inibição competitiva entre SO_4^{-2} x MoO_4^{-2} , no qual o S- SO_4^{-2} compete pela absorção do Mo- MoO_4^{-2} , interferindo assim na atividade da redutase do nitrato (MARSCHNER, 2012). Desta maneira, a ausência de S- SO_4^{-2} na solução de cultivo pode ter proporcionado aumento da atividade da enzima nas folhas de pinhão-mansão.

Essa enzima é a principal limitante de assimilação de N pela planta e essa atividade é dependente da forma de N e do contínuo transporte pelo xilema (JOHNSON; WHITTINGTON; BLACKWOOD, 1976; KAWACHI et al., 2002). Portanto, deve-se considerar a possibilidade de que as menores concentrações de SO_4^{-2} e H_2PO_4^- na solução nutritiva favoreceu a maior absorção de NO_3^- , o que pode ser confirmado pela correlação de N total nestes tecidos com a atividade da redutase do nitrato (Tabela 5), indicando alta concentração de N nessas plantas. A interferência das formas absorvidas de N na atividade da enzima redutase do nitrato foi demonstrada por Yang et al. (2012), que verificaram o incremento da atividade da enzima em folhas de arroz com o aumento da absorção de nitrato pela planta. Desta maneira, a omissão desses elementos provocou maior absorção de nitrato, promovendo atividade da redutase do nitrato nas plantas cultivadas em solução com omissão individual de P, K e de S similar à atividade observada nas plantas cultivadas em solução nutritiva completa.

Portanto, a atividade da redutase do nitrato não demonstrou ser um teste bioquímico efetivo para previsão de deficiência de P, K e S em plantas de pinhão-mansão, pois não foi correlacionada positivamente com a omissão desses elementos na solução de cultivo. Contudo, o teste bioquímico da redutase do nitrato foi eficiente para avaliar a quantidade de N em função das épocas de avaliação, pois a atividade dessa enzima demonstrou correlação positiva com a concentração de N nas plantas cultivadas com omissão de N (Tabela 5).

Tabela 5 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e respectivas significâncias estatísticas pelo teste t, obtidas entre as concentrações foliares de N nas omissões individuais de N, P, K e S (X) e a atividade da redutase do nitrato (Y) em folhas recém-expandidas de pinhão-mansão desenvolvido em solução completa e com omissão de N, P, K e S

Tratamento	Atividade da redutase no nitrato
Completo	0,99**
Omissão de N	0,99**
Omissão de P	0,91**
Omissão de K	0,92**
Omissão de S	0,96**

** - significativo a 1 % de probabilidade

Na última avaliação (120 DAT) as plantas de todos os tratamentos apresentaram baixa atividade da redutase do nitrato - inclusive aquelas do tratamento completo - indicando a baixa eficácia da utilização dessa enzima nessa época de avaliação, para a previsão de diagnose nutricional de N. A menor atividade da redutase do nitrato com o aumento do ciclo vegetal ocorre em função da maior senescência foliar do pinhão-mansão com o desenvolvimento vegetal. Conforme Matos et al. (2012), no período de senescência foliar do pinhão-mansão, grande parte do nitrato foi reduzido e alocado para a produção de pigmentos fotossintéticos, especialmente a clorofila a e b. Desta maneira a alta quantidade de nitrato já utilizada pelo metabolismo vegetal, corrobora para a maior alocação de nitrato apenas para os pontos de crescimento (folhas em expansão – forte dreno), explicando a baixa atividade da enzima na terceira e quarta folha recém-expandida em mudas de pinhão-mansão aos 120 DAT. Possivelmente, com o desenvolvimento do pinhão-mansão e o desenvolvimento de estruturas reprodutivas, as folhas próximas as inflorescências seriam as mais adequadas para previsão de carência de N pelo teste bioquímico da redutase do nitrato, bem como a previsão de desordens nutricionais de outros nutrientes, conforme sugerido por Laviola e Dias (2008).

Desta maneira, apenas as primeiras épocas de avaliação (20, 30, 40 DAT) foram efetivas para o diagnóstico prévio da deficiência de N em plantas de pinhão-mansão pelo teste bioquímico da redutase do nitrato na terceira ou na quarta folha recém-expandida das mudas. Vale ressaltar que os sintomas de deficiência de N apareceram aos 50 DAT, confirmando a atividade da redutase no nitrato como método bioquímico indicador do estado nutricional de N no desenvolvimento inicial de plantas de pinhão-mansão.

4.2.5 Atividade da fosfatase ácida

Em todas as épocas de avaliação, exceto ao final do experimento, as plantas cultivadas em solução com omissão de P apresentaram aumento na atividade da enzima em relação ao tratamento completo (Figura 14). Podem-se considerar as avaliações iniciais, aos 20 e 30 DAT, como as épocas mais adequadas para este tipo de monitoramento bioquímico, pois foi observada nessa época a maior diferença de atividade da fosfatase ácida entre os tratamentos.

Figura 14 - Determinação da atividade da fosfatase ácida em folhas recém-expandidas em plantas de pinhão-mansó desenvolvidas em solução completa e com a omissão de P, aos 20, 30, 40 e 120 dias após o início dos tratamentos

A alta atividade da enzima fosfatase ácida como resposta adaptativa à baixa disponibilidade de fósforo tem sido observada em diversas culturas (NUNES et al., 2008; GAUME et al., 2010; ZEBROWSKA; BUJNOWSKA; CIERESZKO, 2011). Em condições de baixa disponibilidade de fósforo, as plantas utilizam a fosfatase ácida para promover a desfosforilação de compostos orgânicos disponibilizando fósforo inorgânico para manutenção do metabolismo celular em regiões meristemáticas (TOMSCHA et al., 2004; TRAN; HURLEY; PLAXTON, 2010). Tem sido relatada que a deficiência de P em plantas de pinhão-mansó pouco interfere no desenvolvimento desta espécie (SILVA et al., 2009), indicando a capacidade eficiente no uso de P em condições de estresse deste elemento. Esse resultado é explicado parcialmente pela alta eficácia no uso da fosfatase ácida por plantas de pinhão-mansó no desenvolvimento inicial, verificada no presente trabalho.

A elevada atividade da fosfatase ácida nos tecidos vegetais pode ser utilizada como indicadora da deficiência de P (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994), observando-se relação negativa entre a atividade da enzima e a concentração do nutriente (NANAMORI et al., 2004). Contudo, observando as épocas de avaliação, verifica-se que ao final do experimento, as plantas de pinhão-mansó cultivadas em solução nutritiva completa apresentaram atividade da fosfatase ácida semelhantes à atividade das plantas cultivadas em solução com omissão de P, provavelmente pela maior redistribuição do P dos tecidos velhos para as folhas mais novas neste tratamento. Resultado semelhante foi observado para a redutase do nitrato (Figura 13). Assim, como para o nitrato, com o aumento da senescência foliar verificado durante o desenvolvimento das plantas, o fosfato orgânico provavelmente também foi alocado para o desenvolvimento de tecidos jovens das plantas de pinhão-mansó promovendo a menor atividade dessa enzima. Desta forma, com o desenvolvimento das mudas de pinhão-mansó foi verificada a redução na atividade da fosfatase ácida, indicando mais uma vez a precisão do teste bioquímico no início do desenvolvimento das plantas, antecipando assim, as manifestações visuais de deficiência, bem como antecipando-se à diagnose foliar.

4.2.6 Concentração de poliaminas e atividade da peroxidase

A concentração de poliaminas e da atividade da peroxidase sofreram variação em função da disponibilidade de K na solução de cultivo e do período de avaliação (Figuras 15 e 16). As variações entre as concentrações de putrescina observadas entre as plantas cultivadas em solução nutritiva completa e àquelas cultivadas com omissão de K foram semelhantes ao observado em várias espécies (ZAIDAN et al., 1999; FARIDUDDIN et al., 2013), ocorrendo aumento das concentrações de putrescina na omissão de K em todas as épocas de avaliação (Figura 15A). O aparecimento de manchas necróticas nas folhas das plantas deficientes em K foi resultado do acúmulo de putrescina em nível tóxico (Apêndice A).

Figura 15 - Determinação da concentração de putrescina [A], espermidina [B] espermina [C] e relação putrescina/espermidina + espermina [D] em folhas recém-expandidas em plantas de pinhão-mansô desenvolvidas em solução completa e com a omissão de K, aos 20, 30, 40 e 120 dias após o início dos tratamentos

O K é regulador (inibidor) da atividade de enzimas que convertem arginina, ornitina e citrulina em putrescina. Além disso, este macronutriente é responsável pela ativação da enzima que converte a putrescina em espermidina e espermina (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997), explicando os resultados observados no presente trabalho. Ademais a carência de K altera o balanço interno entre cátions e ânions inorgânicos, esperando-se com isso um aumento da acidez do suco celular, o que não ocorre (BASU; GOSH, 1991; ROSSI; LIMA; HAKVOOT, 1997). O acúmulo de putrescina operaria como um mecanismo de manutenção de pH para um valor fisiologicamente adequado (COLEMAN; RICHARDS, 1956).

As concentrações de espermidina e espermina foram menores nas plantas cultivadas com omissão de K, em todas as épocas de avaliação, diferentemente do observado para a

putrescina (Figura 15B e 15C). As concentrações de espermidina e espermina foram aproximadamente de 4 e 6 mmol g⁻¹, respectivamente, em todas as épocas de avaliação. Contudo a concentração de espermidina aumentou em função do desenvolvimento das mudas de pinhão-manso, variando as concentrações foliares de 5 para 61 mmol g⁻¹. Diferentemente do observado para espermina em que as concentrações foliares diminuíram a partir dos 40 DAT, com redução na concentração foliar de 54 mmol g⁻¹ aos 20 DAT para 19 mmol g⁻¹ aos 120 DAT, aproximadamente. Pode-se inferir que a espermidina possuiu maior correlação com o desenvolvimento das plantas de pinhão-manso ao final do ciclo de cultivo do presente trabalho (120 DAT), sendo o inverso para a espermina.

A relação putrescina/espermidina + espermina é geralmente correlacionada com o alongamento celular, sendo que a transformação de putrescina para espermidina/espermina é importante no controle de divisão celular (LIMA; BRASIL; OLIVEIRA, 1999). Dessa forma, a alta relação pode indicar menor crescimento da planta. No presente estudo foi observado que essa relação aumentou com a omissão de K (Figura 15D), a qual promoveu redução no crescimento das plantas de pinhão-manso (Figuras 9, 10, 11 e 12).

A concentração de poliaminas foi influenciada da época de avaliação. Por meio da comparação entre as plantas cultivadas em solução nutritiva completa e com omissão de K, em cada época de avaliação, foi verificada diferença da concentração em todas poliaminas – putrescina, espermidina e espermina - apenas aos 40 DAT (Figura 15). Vale destacar que os sintomas visuais de deficiência de K surgiram aos 80 DAT, e assim pode-se afirmar que o período correspondente aos 40 DAT melhor indica a época para a previsão de desordem nutricional de K utilizando-se o teste bioquímico das poliaminas. Entretanto, para as concentrações de putrescina e de espermina, considerando todas as épocas de avaliação, constataram-se diferenças para os valores referentes às plantas cultivadas em solução completa e com omissão de K (Figura 15A e 15C).

Nas folhas das plantas cultivadas em solução nutritiva completa observou-se aumento no acúmulo de putrescina, ao final do período experimental (120 DAT). Esse aumento de putrescina ocorre naturalmente, pois esta amina é precursora do etileno que, por sua vez, constitui em hormônio responsável pelo processo de senescência foliar (SHALABY, 1996; SILLA SANTOS, 1996), observado aos 120 DAT nas plantas de pinhão-manso.

Em relação à atividade da peroxidase, foi observada a maior atividade nas plantas cultivadas com omissão de K em todas as épocas de avaliação (Figura 16), com resultado semelhante ao observado para putrescina (Figura 15A). Analisando os resultados das

concentrações de putrescina e da atividade da peroxidase nas plantas cultivadas com omissão de K, observa-se o aumento da atividade da enzima em função do aumento da concentração dessa poliamina.

A putrescina em altas concentrações promove efeito tóxico no tecido vegetal, desta maneira o metabolismo vegetal tende a transformar o excesso de putrescina em espécies reativas de oxigênio (em inglês, *ROS*). A superprodução de *ROS*, indicada pela alta atividade da peroxidase nas plantas deficientes em K, pode ser citotóxicas podendo danificar componentes celulares importantes (KOVÁČIK; BACKOR, 2007; POSMYK; KONTEK; JANAS, 2009; MERLIN et al., 2012). A geração de *ROS* é considerada evento primário de uma série de estresses, e que no presente trabalho, a carência de potássio ocasionou na geração de espécies reativas de oxigênio, sendo refletida na alta atividade da peroxidase nas plantas deste tratamento (Figura 16). A peroxidase agiu como barreira contra o efeito deletério da quebra de substâncias tóxicas geradas pela carência de K, principalmente o aumento de putrescina.

O maior contraste da atividade dessa enzima entre as plantas cultivadas com e sem K ocorreu aos 30 DAT, indicando esse período como a melhor época para previsão de carência de K. Desta maneira, o K interferiu significativamente no metabolismo das poliaminas, bem como na atividade da peroxidase no pinhão-mansão.

Figura 16 - Determinação da atividade da peroxidase em folhas recém expandidas em plantas de pinhão-mansó desenvolvidas em solução completa e com omissão de K, aos 20, 30, 40 e 120 dias após o início dos tratamentos

4.2.7 Teor de clorofila em unidades SPAD

O teor de clorofila (expresso em unidades SPAD) nas folhas do pinhão-mansó foi influenciada pela época de avaliação nas plantas cultivadas em solução nutritiva completa e com omissão N, K, Mg (Figura 17), sendo que essas plantas apresentaram redução dos teores de clorofila (unidades SPAD) em função do tempo decorrido, notadamente para as plantas cultivadas com omissão de N e Mg. Uma possível explicação para a redução nos valores SPAD em função dos dias de avaliação seria o envelhecimento da folha no tratamento completo (HELLGREN; INGESTAD, 1996). Santos et al. (2013) também observaram redução do teores de clorofila (unidades SPAD) em plantas de pinhão-mansó cultivadas em solução nutritiva completa e com omissão de Cu, Fe, Mn e Zn, em função do envelhecimento da folha.

Figura 17 - Determinação indireta do teor de clorofila, em unidades SPAD em folhas recém expandidas em plantas de pinhão-mansó desenvolvidas em solução completa (●) e com omissão de N (○), K (▽) e Mg (▲), em função dos dias após o início dos tratamentos. ** - significativo a 1 % de probabilidade

As plantas dos tratamentos apresentaram concentrações distintas de clorofila ao final do período experimental (Figura 18). Vale destacar que as plantas do tratamento com a omissão de N e de Mg apresentaram maior redução, cerca de 42 %, nos teores de clorofila em relação às plantas cultivadas no tratamento completo.

A deficiência de N é caracterizada pela clorose generalizada das folhas mais velhas (tecidos vegetais mais velhos), seguida de necrose (MARSCHNER, 2012). Swiader e Moore (2002) relataram a alta eficiência na utilização do clorofilômetro SPAD-502 como ferramenta de estimativa de N na planta. Por sua vez, a deficiência de Mg ocasiona o aparecimento de manchas cloróticas entre as nervuras dos tecidos mais velhos que evoluem rapidamente para necrose (MENGEL; KIRKBY, 2001). O nitrogênio e o magnésio são componentes estruturais da clorofila fazendo parte do anel tetrapirrólico, assim a clorose típica da deficiência destes nutrientes foi verificada pelos menores teores de clorofila (unidades SPAD).

Figura 18 - Determinação indireta do teor de clorofila, em unidades SPAD, no terceiro e quarto limbo de folhas recém-expandidas, em plantas de pinhão-manso desenvolvidas em solução completa e com a omissão de N, P, K, Ca, Mg e de S, aos 130 dias após o início dos tratamentos

4.2.8 Trocas gasosas

A taxa fotossintética e a condutância estomática das plantas de pinhão-manso correlacionaram-se de forma distinta com a concentração foliar de macronutrientes, a área foliar, unidades SPAD e a produção de massa seca total (Tabela 6). Por meio dos altos

coeficientes de correlação observados, pode-se inferir que os parâmetros de trocas gasosas foram eficientes na avaliação do desenvolvimento inicial de plantas de pinhão-mansão. Os parâmetros de trocas gasosas das plantas cultivadas sob condições de omissão de macronutriente em solução nutritiva variaram em função das deficiências de macronutrientes (Figuras 19 e 20). As plantas cultivadas em solução com omissão de N, Ca e Mg apresentaram redução na assimilação de CO_2 e na condutância estomática em todas as épocas de avaliação (Figuras 19 e 20). Vale destacar que a omissão de Ca provocou a morte do meristema apical aos 80 DAT (Apêndice A), não podendo ser realizada a análise de trocas gasosas aos 120 DAT. Assim, foi considerada apenas as análises de taxa fotossintética e condutância estomática aos 20, 30 e 40 DAT para as plantas cultivadas em solução com omissão de Ca.

Tabela 6 - Coeficiente de correlação de Pearson (r) e respectivas significâncias estatísticas pelo teste t, obtidas entre os parâmetros de trocas gasosas (taxa fotossintética [A] e condutância estomática [Gs]) (X) e as concentrações foliares de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg e S), a área foliar, unidades SPAD e a massa seca total (Y) em plantas de pinhão-mansão desenvolvido em solução completa e com omissão de N, P, K e S

	A	Gs
N	0,89*	0,92*
P	0,75*	0,82*
K	0,78*	0,96**
Ca	0,78*	0,96**
Mg	0,99**	0,89*
S	0,91*	0,90*
Área foliar	0,75**	0,45*
Unidades SPAD	0,67**	Ns
Massa seca total	0,73**	0,79*

**, * e ^{ns} - significativo a 1 e 5 % de probabilidade e não significativo, respectivamente

Figura 19 - Determinação da assimilação de CO₂ no terceiro e quarto limbos defolhas recém expandidas nas plantas de pinhão-manso desenvolvidas em solução completa e com a omissão de N, P, K, Ca, Mg e de S, em função dos dias após o início dos tratamentos

Figura 20 - Determinação da condutância estomática no terceiro e quarto limbos de folhas recém-expandidas nas plantas de pinhão-manso desenvolvidas em solução completa e com a omissão de N, P, K, Ca, Mg e de S, em função dos dias após o início dos tratamentos

A omissão de N, Ca e Mg, na última avaliação, provocou redução de 95 %, 84 % e 64 % na taxa fotossintética e redução de 17 %, 42 % e 38 % na condutância estomática em relação ao tratamento completo, respectivamente. A menor capacidade fotossintética obtida pela omissão desses nutrientes foi refletida nos parâmetros avaliados no presente trabalho como a altura, o diâmetro, a produção de massa seca, a área foliar (Figuras 9, 10, 11 e 12), bem como no aparecimento dos sintomas de carência de N, Ca e Mg (Apêndices A, B, C).

As plantas deficientes em N possuem a taxa fotossintética reduzida pela redução na capacidade de utilização de energia luminosa e pela menor utilização de assimilados fotossintéticos (DE GROOT et al., 2003; PAPONOV; ENGELS, 2005). Já o Ca está envolvido na manutenção da integridade da membrana plasmática das células vegetais, especificamente para a seletividade do transporte de íons, sendo que sua carência provoca redução na taxa fotossintética em função da modificação da dinâmica fisiológica vegetal. Por sua vez o Mg participa de um grande número de funções no processo fotossintético, com constituinte da molécula de clorofila e na ativação de enzimas envolvidas nas transferências de energia via adenosina trifosfato (ATP) (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

As plantas cultivadas em solução com omissão de K apresentaram redução na taxa fotossintética e na condutância estomática partir dos 40 DAT (Figura 18), contudo apenas aos 80 DAT, as plantas cultivadas em solução com omissão de K demonstraram os primeiros sintomas de carência deste nutriente (Apêndice D). Analisando os resultados das plantas cultivadas em solução com omissão de K para a eficiência no uso de K e para taxa fotossintética, nota-se que no desenvolvimento inicial do pinhão-mansão as plantas possuem capacidade de adaptar-se a condição de estresse ao K. Contudo essa adaptação é parcial até o 40 DAT. A partir dessa época o desenvolvimento inicial do pinhão-mansão é prejudicado pela carência de K culminando no sintoma visual (Apêndice D), pelo maior acúmulo de putrescina (Figura 15A) e no menor desenvolvimento vegetal (Figuras 9, 10, 11 e 12).

A taxa fotossintética e a condutância estomática observadas nas plantas cultivadas com omissão de P na solução de cultivo (Figuras 19 e 20) foram semelhantes ao comportamento observado para a atividade da fosfatase ácida (Figura 14). Assim, as plantas apresentaram aumento inicial da taxa fotossintética com posterior redução ao final do experimento. Desta maneira, a atividade da fosfatase ácida serviu como ferramenta adaptativa ao estresse pela deficiência de P nas plantas de pinhão-mansão, explicando os altos índices encontrados no presente trabalho para eficiência no uso de P (Tabela 3) por esta espécie. Pode-se inferir que, a alta capacidade de mobilização (redistribuição) de P-orgânico pelo pinhão-mansão possibilitou a maior taxa fotossintética observada, na omissão de P.

Em condições de deficiência por P, a capacidade no uso de P é aumentada como resultado de alterações na atividade de enzimas na rota da glicólise, que passam a operar em vias alternativas no catabolismo de carboidratos durante a deficiência, contribuindo para uso mais eficiente do P por meio de reciclagem, redução de consumo e utilização de outras frações do nutriente, a fim de garantir o adequado processo fotossintético (THEODORU; PLAXTON, 1993; SHENOY; KALAGUDI, 2005). De maneira geral, a alta capacidade no uso da fosfatase ácida pelas plantas de pinhão-mansão foi refletida nos parâmetros de crescimento avaliados (Figuras 9, 10, 11 e 12). Além disso, os maiores valores SPAD ao final do experimento (Figura 17) indicam uma alta concentração de clorofila na folha utilizada para análise, corroborando para a alta capacidade fotossintética da planta. Vale destacar que ao final do experimento, não foram observados os sintomas visuais de carência de desse macronutrientes, mesmo constatando-se redução na produção de biomassa.

No tratamento com omissão de S, as plantas apresentaram comportamento fotossintético semelhante ao das plantas cultivadas em solução completa, reduzindo a taxa fotossintética e a condutância estomática apenas ao final do experimento (Figuras 19 e 20). Observando-se os resultados da atividade da redutase do nitrato nas plantas do tratamento com omissão de S (Figura 13), pode-se inferir que, no presente trabalho a ausência de S-SO_4^{2-} possibilitou a maior absorção de N-NO_3^- pelas plantas de pinhão-mansão. A maior absorção N pelo pinhão-mansão, neste tratamento, proporcionou uma maior produção de área foliar total (Figura 9), aumentando a capacidade fotossintética das plantas desse tratamento (YONG et al., 2010).

Em todos os tratamentos, a taxa fotossintética e a condutância estomática reduziram ao longo do experimento (Figuras 19 e 20). A diminuição da taxa fotossintética ao longo do ciclo de desenvolvimento do pinhão-mansão pode ser explicada pela senescência foliar, típica em pinhão-mansão (MATOS et al., 2012). Estimativas de trocas gasosas demonstram que a capacidade fotossintética diminui juntamente com o teor de clorofila e a senescência foliar (DANG; DIETRICH; THOMAS, 2000).

A senescência foliar provoca o declínio das reações do Ciclo de Calvin, principalmente devido à degradação da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase (RUBISCO). Neste processo, não há formação de componentes do aparato fotossintético, como clorofila e cloroplastos, resultando em uma baixa capacidade de converter a energia luminosa em compostos orgânicos (LU et al., 2002). Todavia, deve-se ressaltar que no tratamento completo as plantas apresentaram a menor redução da capacidade fotossintética (48 %), evidenciando o

efeito negativo das deficiências de macronutrientes nas plantas de pinhão-mansão para este atributo fisiológico.

As plantas cultivadas em solução nutritiva completa apresentaram as maiores taxas fotossintéticas em relação às plantas cultivadas com omissão individual apenas aos 120 DAT (Figuras 19 e 20). Deste modo, devem-se considerar as diferentes épocas de avaliação para a previsão de cada nutriente analisado. Deve-se destacar que aos 120 DAT, as plantas dos tratamentos com as omissões dos macronutrientes apresentavam menor desenvolvimento (Figuras 9, 10, 11 e 12), bem como exibiam nitidamente as manifestações sintomatológicas das carências de N, K, Ca e Mg (Apêndices A, B, C, D). Este fato suporta a avaliação precoce da taxa fotossintética como método sensível e adequado para a avaliação rápida e antecipada do estado nutricional de N, Ca e de Mg a partir dos 20 DAT e de K a partir dos 40 DAT. Vale destacar, que os resultados obtidos no presente trabalho, suportam a hipótese da utilização do teste fisiológico pelo IRGA como ferramenta eficaz para previsão de macronutrientes no desenvolvimento inicial das plantas de pinhão-mansão em trabalhos científicos, exceto para o P e o S, os quais merecem maiores detalhamentos.

A baixa disponibilidade de P e S limita o aparecimento das folhas e reduz a área foliar individual (FLETCHER; MOOT; STONE, 2008), bem como reduz a capacidade de fixação de carbono pelas plantas (DE GROOT et al., 2003). Assim, a redução da taxa fotossintética observada na omissão de P e S só foi possível de ser detectada por meio do produto entre os resultados obtidos da taxa fotossintética (assimilação de CO_2 e condutância estomática) e área foliar.

O produto entre a área foliar total e a taxa fotossintética representa a taxa fotossintética total de cada planta. A taxa fotossintética total de cada planta de pinhão-mansão cultivada em solução com omissão de P e S (Figura 21) limita a hipótese de eficiência de absorção de uso de P e S para apenas a fase inicial de desenvolvimento em plantas de pinhão-mansão, uma vez que, a baixa taxa fotossintética total, demonstrada na Figura 21, seria evidenciada com um maior tempo de condução experimental, por meio de maiores reduções de massa seca e do aparecimento de sintoma de carência destes elementos, principalmente em condições de maior demanda nutricional – no florescimento e frutificação.

Figura 21 - Determinação assimilação de CO₂ por planta [A] e condutância estomática por planta [B] no terceiro e quarto limbos de folhas recém-expandidas das plantas de pinhão-manso desenvolvidas em solução completa e com a omissão de N, P, K, Mg e de S, aos 120 dias após o início dos tratamentos

5 CONCLUSÕES

1. O acúmulo de nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre, possui comportamento semelhante ao acúmulo de massa seca no desenvolvimento inicial do pinhão-mansó, diferentemente do acúmulo de cálcio e magnésio.
2. O cálcio é o macronutriente que mais limita o desenvolvimento do pinhão-mansó, seguido do nitrogênio e magnésio.
3. As plantas cultivadas em solução com omissão de P e S apresentam desenvolvimento similar às plantas cultivadas em solução nutritiva completa.
4. Os testes bioquímicos e fisiológicos utilizados no presente trabalho apresentam correlação com as concentrações de macronutrientes, bem com o desenvolvimento das plantas de pinhão-mansó, indicando eficiência para previsão de macronutrientes na espécie. Contudo, cada macronutriente apresenta épocas de avaliação distintas de acordo com o teste estudado.
5. A taxa fotossintética e a condutância estomática por unidade de área do pinhão-mansó não apresenta modificação pela omissão de S, exceto aos 120 DAT. Contudo, a taxa fotossintética e a condutância estomática por planta é reduzida pelas omissões de todos os macronutrientes.

REFERENCIAS

- ALBUQUERQUE, F.A.; CASTRO, N.H.A.; BELTRÃO, N.E.M.; LUCENA, A.M.A.; SOUZA, S.L.; FREIRE, M.A.O.; SAMPAIO, L.R. Análise de crescimento inicial do *Jatropha curcas* em condições de sequeiro. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 13, p. 99-106, 2009.
- ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, Washington, v.120, p.470-475, 1974.
- ANTEN, N.P.R.; WERGER, J.A.M.; MEDINA, E. Nitrogen distribution and leaf area indices in relation to photosynthetic nitrogen use efficiency in savanna grasses. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 138, p. 63-75, 1998.
- ARRUDA, F.P.; BELTRÃO, N.E.M.; ANDRADE, A.P.; PEREIRA, W.E.; SEVERINO, L.S. Cultivo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, p. 789-799, 2004.
- ASCENCIO, J. Acid phosphatase as a diagnostic tool. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 25, p. 1553-1564, 1994.
- BALIGAR, V.C.; FAGERIA, N.K.; HE, Z.L. Nutrient use efficiency in plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, p. 921-950, 2001.
- BALOTA, E.L.; MACHINESKI, O.; SCHERER, A. Mycorrhizal effectiveness on physic nut as influenced by phosphate fertilization levels. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 23-32, 2012.
- BAR-AKIVA, A. Biochemical indications as a means of distinguishing between iron and manganese deficiency symptoms in citrus plants. **Nature**, London, v.190, p.647-648, 1961.
- BASU, R.; GOSH, B. Polyamines in various rice (*Oryza sativa*) genotypes with respect to sodium chloride salinity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, p.575-581, 1991.
- BECKMANN-CAVALCANTE, M.Z.; PIVETTA, K.F.L.; CAVALCANTE, I.H.L.; CAVALCANTE, L.F.; BELLINGIERI, P.A.; CAMPOS, M.C.C. Condutividade elétrica da solução nutritiva para o cultivo do crisântemo em vaso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 747-756, 2010.
- BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas**; noções básicas. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 41p.
- BRESSAN, E.A.; SEBBENN, A.M.; FERREIRA, R.R.; LEE, T.S.C.; FIGUEIRA, A. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. **Tree Genetics & Genomes**, Heidelberg, v. 10, p. 1-9, 2013.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 277- 303, 1999.

CAZETTA, J. O.; FONSECA, I. M.; PRADO, R. M. **Perspectivas de uso de métodos diagnósticos alternativos: testes bioquímicos.** In: PRADO, R.M.; CECILIO FILHO, A.B.; CORREIA, M.A.R.; PUGA, A.P. (Org.). *Nutrição de Plantas: diagnose foliar em hortaliças.* 1ed. Jaboticabal: FCAV/FAPESP/CAPES/FUNDUNESP, 2010, v. 1, p. 109-134.

CHEN, W.; YANG, X.; HE, Z.; FENG, Y.; HU, F. Differential changes in photosynthetic capacity, 77K chlorophyll fluorescence and chloroplast ultrastructure between Zn-efficient and Zn-inefficient rice genotypes (*Oryza sativa*) under low zinc stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 89-101, 2008.

CRAMER, M.D.; HAWKINS, H.J.; VERBOOM, G.A. The importance of nutritional regulation of plant water flux. **Oecologia**, New York, v. 161, p. 15-24, 2009.

CHAVES, L.H.G.; CUNHA, T.H.C.S.; BARROS JUNIOR, G. LACERDA, R.D.; DANTAS JUNIOR, E.E. Zinco e cobre em pinhão manso. I. Crescimento inicial da cultura. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, p. 94-99, 2009.

COLEMAN, R.G.; RICHARDS, F.J. Physiological studies in plant nutrition: 18 – some aspects of nitrogen metabolism in barley and other plants in relation to potassium deficiency. **Annals of Botany**, London, v. 20, p. 393-409, 1956.

DANG, J.L.; DIETRICH, R.A.; THOMAS, H. Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. pt. 4, chap. 20, p. 1044-1100.

DE GROOT, C.C.; VAN DEN BOOGARD, R.; MARCELIS, L.F.M. HARBINSON, J; LAMBERS, H. Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1957-1967, 2003.

DIAS, L.A.S.; LEME, L.P.; LAVIOLA, B.G.; PALLINI FILHO, A.; PEREIRA, O.L.; CARVALHO, M.; MANFIO, C.E.; SANTOS, A.S.; SOUSA, L.C.A.; OLIVEIRA, T.S.; DIAS, D.C.F.S. **Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível.** Viçosa: UFV, 2007. 40p.

DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, p.791-800, 1994.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas.** 2. ed. Londrina: Editora Planta, 2006. 399p.

FAGERIA, N.K.; BALIGAR, V.C.; MOREIRA, A.; PORTES, T.A. Dry bean genotypes evaluation for growth yield components and phosphorus use efficiency. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 33, p. 2167-2181, 2010.

FAIRLESS, D. The little shrub that could—maybe. **Nature**, London, v. 449, p. 652–655, 2007.

FARIDUDDIN, Q.; VARSHNEY, P.; YUSUF, M.; AHMAD, A. Polyamines: potent modulators of plant response to stress. **Journal of Plant Interactions**, Oxon, v. 8, p. 1-16, 2013.

FIASCONARO, M.L.; SANCHEZ-DÍAS, M.; ANTOLÍN, M.C. Nitrogen metabolism is related to improved water-used efficiency of nodulated alfalfa grown with sewage sludge under drought. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 176, p. 110-117, 2013.

FLETCHER, A.L.; MOOT, D.L.; STONE, P.L. Solar radiation interception and canopy expansion of sweet corn in response to phosphorus. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v.29, p. 80-87, 2008.

FLORES, H.E.; GALSTON, A.W. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 701-706, 1982.

GARCIA, M.; ASCENCIO, J. Root morphology and acid phosphatase activity in tomato plants during development of and recovery from phosphorus stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.15, p.2491-2503, 1992.

GAUME, A.E.L.; RAO, I.M.; GAUME, A.J.; FROSSARD, E.A. A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 38, p. 155-164, 2010.

GROPPIA, M.D.; BENAVIDES, M.P. Polyamines and abiotic stress: recent advances. **Amino Acids**, Amsterdam, v. 34, p. 35-45, 2008.

HELLGREN, O.; INGESTAD, T. A comparison between methods used to control nutrient supply. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 117-122, 1996.

JOHNSON, C.B.; WHITTINGTON, W.J.; BLACKWOOD, G.C. Nitrate reductase as a possible predictive test of crop yield. **Nature**, London, v. 262, p. 133-134, 1976.

JOHNSON, C.M.; STOUTS, P.R.; BROYER, T.C.; CARTON, A.B. Comparative ehlorine of different plants species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 8, p. 337-353, 1957.

KAWACHI, T.; SHOJI, Y.; SUGIMOTO, T.; KLEINHOF, G.C. WARNER, R.L.; OHTAKE, N.; OHYAMA, T.; SUEIOSHI, K. Role of xylem sap nitrate in regulation of nitrate reductase gene expression in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 48, p. 79-85, 2002.

KAWAKAMI, E.M.; OOSTERHUIS, D.M.; SNIDER, J.L. Nitrogen assimilation and growth of cotton seedlings under NaCl salinity and in Response to urea applications with NBPT and DCD. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 199, p. 106-117, 2013.

KERTON, M.; NEWBURY, J.H.; HAND, D.; PRICHARD, J. Accumulation of calcium in the centre of leaves of coriander (*Coriandrum sativum* L.) is due to an uncoupling of water and ion transport. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 227–235, 2009.

KIM, T.E.; HAWNKINS, B.J.; MITCHELL, A.K. Douglas-fir seedling response to a range of ammonium:nitrate ratios in aeroponic culture. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 33, p. 1638-1657, 2010.

KING, A.J.; HE, W.; CUEVAS, J.A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I.A. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, p. 2897-2905, 2009.

KOVÁČIK, J.; BACKOR, M. Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 185, p. 185-193, 2007.

LAUER, M.J.; PALLARDY, S.G.; BLEVINS, D.G.; RANDALL, D.D. Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate deficient soybeans (*Glycine max* L.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 848-854, 1989.

LAVIOLA, B.G.; DIAS, L.A.S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão manso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1969-1975, 2008.

LAVON, R.; GOLDSCHMIDT, E.E. Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves: a mini-review. **Journal Plant Nutrition**, New York, v.22, p.139-150, 1999.

LAVRES JUNIOR, J.; BOARETTO, R.M.; SILVA, M.L.S.; CORREIA, D.; CABRAL, C.P.; MALAVOLTA, E. Deficiências de macronutrientes no estado nutricional da mamoneira cultivar Iris. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 145-151, 2005.

LAVRES JUNIOR, J.; NOGUEIRA, T.A.R.; CABRAL, C.P.; MALAVOLTA, E. Deficiências de macronutrientes no crescimento e na produção da mamoneira cultivar Iris. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 4, p. 405-413, 2009.

LAVRES JUNIOR, L.; SANTOS JUNIOR, J.D.G.; MONTEIRO, F.A. Nitrate reductase activity and spad readings in leaf tissues of guinea grass submitted to nitrogen and potassium rates. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 801-809, 2010.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 21-26, 1999.

LIMA, R.L.S.; SEVERINO, L.S.; GHEYI, H.R.; SOFIATTI, V.; ARRIEL, N.H.C. Efeito da adubação fosfatada sobre o crescimento e teor de macronutrientes de mudas de pinhão manso. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, p. 950-956, 2011a.

LIMA, R.L.S.; SEVERINO, L.S.; CAZETTA, J.O.; AZEVEDO, C.A.V.; SOFIATTI, V.; ARRIEL, N.H.C. Redistribuição de nutrientes em folhas de pinhão-manso entre estádios fenológicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, p. 1175-1179, 2011b.

LIM, P.O.; KIM, H.J.; NAN, H.G. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 115-136, 2007.

LIU, J.; CHEN, F.; OLOKHNUUD, C.; GLASS, A.D.M.; TONG, Y.; ZHANG, F.; MI, G. Root size and nitrogen-uptake activity in two maize (*Zea mays*) inbred lines differing in nitrogen-use efficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 172, p. 230-236, 2009.

LU, Q.; LU, C.; ZHANG, J.; KUANG, T. Photosynthesis and chlorophyll a fluorescence during flag leaf senescence of field-grown wheat plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 159, p. 1173-1178, 2002.

LYNCH J. P.; HO, M.D. Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 269, p. 45-56, 2005.

MAIA, J.T.L.S.; GUILHERME, D.O.; PAULINO, M.A.O.; SILVEIRA, H.R.O.; FERNANDES, L.A. Efeito da omissão de macro e micronutrientes no crescimento de pinhão-mansão. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 24, p. 174-179, 2011.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. London: Academic Press, 2012. 651p.

MATOS, F.S.; OLIVEIRA, L.R.; FREITAS, R.G.; EVARISTO, A.B.; MISSIO, R.F.; CANO, M.A.O.; DIAS, L.A.S. Physiological characterization of leaf senescence of *Jatropha curcas* L. populations. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 45, p. 57-64, 2012.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.T.; SANTONI, V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 595-624, 2008.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition**. 5.ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.

MERLIN, T.A.; LIMA, G.P.P.; LEONEL, S.; VIANELLO, F. Peroxidase activity and total phenol content in citrus cutting treated with different copper sources. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 83, p.159-164, 2012.

MINOLTA CAMERA Co. **Manual for chlorophyll meter Spad- 502**. Osaka: Minolta, Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22p.

MULDER, E.G.; BOXMA, R.; VAN VENN, W.L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissue. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 10, p. 335-355, 1959.

NANAMORI, J.L.; SHIMANO, T.; WASAKI, J.; YAMAMURA, T.; RAO, I.M.; OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthesis partitioning

in tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p. 460-469, 2004.

NASCIMENTO, M.S.; CRUSCIOL, C.A.C.; FERNANDES, A.M.; ZANOTTO, M.D. Nutrient extraction and exportation by castor bean hybrid Lyra. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 113-124, 2012.

NUNES, F.N.; CANTARUTTI, R.B.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; TÓTOLA, M.R.; RIBEIRO, B.N. Atividade de fosfatases em gramíneas forrageiras em respostas à disponibilidade de fósforo no solo e à altura de corte das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1899-1909, 2008.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: anoilplant of unfulfilled promise. – **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, p. 1-15, 2000.

PAPONOV, I.A.; ENGELS, C. Effect of nitrogen supply on leaf traits related to photosynthesis during grain filling in two maize genotypes with different N efficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 166, p. 756-763, 2005.

PARAWIRA, W. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. **Scientific Research and Essays**, Lagos, v. 5, p. 1796-1808, 2010.

PIETERS, A.J.; PAUL, M.J.; LAWLOR, D.W. Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1083-1091, 2001.

POSMYK, M.M.; KONTEK, R.; JANAS, K.M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 72, p. 596–602, 2009.

PRADO, R.M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008, v.1. p.407.

RAPOSO, R.W.C.; MURAOKA, T.; BASSO, L.C.; LAVRES JUNIOR, J.; FRANZINI, V.I. Acid phosphatase activity and leaf phosphorus content in soybean cultivars. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 439-445, 2004.

REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; MALAVOLTA, E.; LAVRES JUNIOR, J.; MORAES, M.F. Photosynthesis, Chlorophylls, and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 40, p. 1512-1528, 2009.

REIS, A.R.; FURLANI JÚNIOR, E.; HAGA, K.I. Atividade da redutase do nitrato em folhas de cafeeiro em função da adubação nitrogenada. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 29, p. 269-276, 2007.

ROCHA, B.R.; RAMALHO, A.R.; TEIXEIRA, A.L.; LAVIOLA, B.G.; SILVA, F.C.G.; MILITÃO, J.S.L.T. Eficiência da seleção para incremento do teor de óleo do pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, p. 44-50, 2012.

RODRIGUES, C.R.F.; SILVEIRA, J.A.G.; SILVA, E.N.; DUTRA, A.T.B.; VIÉGAS, R.A. Transporte e distribuição de potássio atenuam os efeitos tóxicos do sódio em plantas jovens de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 223-232, 2012.

ROSADO, T.B.; LAVIOLA, B.G.; FARIA, D.A.; PAPPAS, M.R.; BHERING, L.L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuelcrop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, p. 2372–2382, 2010.

ROSSI, C.; LIMA, G.P.P.; HAKVOOT, D.M.R. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.54, p.123-127, 1997.

RUIZ, J.M.; LÓPEZ-CANTARERO, I.; ROMERO, L. Relationship between calcium and piruvate kinase. *Biologia Plantarum*, Dordrecht, v.43,p.359-362, 2000.

SANTOS, E.F.; ZANCHIM, B.J.; CAMPOS, A.G.; GARRONE, R.F.; LAVRES JUNIOR, J. Photosynthesis rate, chlorophyll content and initial development of physic nut without micronutrient fertilization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 1334-1342, 2013.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, p. 44-78, 2005.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT**. User's Guide, version 8.0. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2000.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, Amsterdam, v. 29, p. 675-690, 1996.

SHENOY, V.V.; KALAGUDI, G.M. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 23, p. 501-513, 2005.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.4, p.289-302, 1981.

SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 29, p. 213-231, 1996.

SILVA, E.B.; TANURE, L.P.P.; SANTOS, S.R.; RESENDE JÚNIOR, P.S. Sintomas visuais de deficiências nutricionais em pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, p.392-397, 2009.

SOUZA, P.T.; SILVA, E.B.; GRAZZIOTTI, P.H.; FERNANDES, L.A. NPK fertilization on initial growth of physic nut seedlings in quartzarenic neossol. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 559-566, 2011.

SRIVASTAVA, A.K.; SINGH, S.; HUCHCHE, A.D.; RAM, L. Yield based leaf and soil test interpretations for Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in central India. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.32, p.585–599, 2000.

SURIHARN, B.; SANITCHON, J.; SONGSRI, P.; KESMALA, T. Effects of pruning levels and fertilizer rates on yield of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Asian Journal of Plant Sciences**, Toronto, v. 13, p. 52-59, 2011.

SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal Plant Nutrition**, New York, v.17, p.1687-1699, 1994.

SWIADER, J.M.; MOORE, A. Spad-chlorophyll response to nitrogen fertilization and evaluation of nitrogen status in dryland and irrigated pumpkins. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 1089-1100, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TIBURCIO, A.F.; GENDY, C.A.; TRAN THANH-VAN, K. Morphogenesis in tobacco subepidermal cells: putrescine as marker of root differentiation. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 19, p. 43-54, 1989.

THEODORU, M.E.; PLAXTON, W.C. Metabolic adaptation of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 339-344, 1993.

TOMSCHA, J.L.; TRULL, M.C.; DEIKMAN, J.; LYNCH, J.P.; GUILTINAN, M.J. Phosphatase under-producer mutants have altered phosphorus relations. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, p. 334–345, 2004.

TRAN, H.T.; HURLEY, B.A.; PLAXTON, W.C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. **Plant Science**, Limerick, v. 179, p. 14–27, 2010.

WATSON, M.B.; MALMBERG, R.L. Regulation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh arginine decarboxylase by potassium deficiency stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, p. 1007-1083, 1996.

WENG, X.Y.; ZHENG, C.J.; XU, H.X.; SUN, J.Y. Characteristics of photosynthesis and functions of the water-water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, p. 614-621, 2007.

WILKINSON, S.; BACON, M.A.Z.; DAVIES, W.J. Nitrate signaling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1705-1716, 2007.

XU, G.; WANG, R. Sulfur and boron-magnesium-zinc compound fertilizer contribute to the reproductive growth of *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 34, p. 1843-1852, 2011.

YANG, Y.; ZHANG, M.; LI, Y.C.; FAN, X.; GENG, Y. Controlled release urea improved nitrogen use efficiency, activities of leaf enzymes, and rice yield. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 76, p. 2307-2317, 2012.

YONG, J.W.H.; NG, Y.F.; TAN, S.N.; CHEW, A.Y.L. Effect of fertilizer application on photosynthesis and oil yield of *Jatropha curcas* L. **Photosynthetica**, Berlin, v. 48, p. 208-218, 2010.

ZAIDAN, H.A.; BROETTO, F.; OLIVEIRA, E.T.; GALLO, L.A.; CROCOMO, O.J. Influence of potassium nutrition and the nitrate/ammonium ratio on the putrescine and spermidine contents in banana vitro plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 22, p. 1123-1140, 1999.

ZAMBROSI, F.C.B.; MATTOS JUNIOR, D.; FURLANI, P.R.; QUAGGIO, J.A.; BOARETTO, R. M. Eficiência de absorção e utilização de fósforo em porta-enxertos cítricos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 485-496, 2012.

ZEBROWSKA, E.; BUJNOWSKA, E.; CIERESZKO, I. Differential responses of oat cultivars to phosphate deprivation: plant growth and acid phosphatase activities. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 34, p. 1251-126, 2011.

ZOBIOLE, L.H.S.; CASTRO, C.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Marcha de absorção de macronutrientes na cultura do girassol. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.425-434, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A - Sintomatologia da deficiência de Ca na parte aérea [1] e nas raízes [2] de plantas de pinhão-mansinho cultivadas em solução nutritiva

Apêndice B - Sintomatologia da deficiência de N na parte aérea [1] e nas raízes [2] de plantas de pinhão-mansinho cultivadas em solução nutritiva

Apêndice C - Sintomatologia da deficiência de Mg [1, 2] em folhas de plantas de pinhão-mansó cultivadas em solução nutritiva

Apêndice D - Sintomatologia da deficiência de K [1, 2] em folhas de plantas de pinhão-mansó cultivadas em solução nutritiva