UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

JOSÉ LAVRES JUNIOR

Influência genotípica na absorção, utilização e na toxidez de manganês na soja

Piracicaba

2007

JOSÉ LAVRES JUNIOR

Influência genotípica na absorção, utilização e na toxidez de manganês na soja

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Malavolta

Piracicaba

2007

DEDICO

A Deus por conceber tantas graças.

Aos meus queridos pais, Lavres e Ádria,
que com muito amor, incentivo e zelo
sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus amados irmãos Hayanna, Iago e Hannah

À Carolina Conde

A todos os meus familiares, presentes no convívio,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao estimado Professor Dr. Eurípedes Malavolta, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, paciência e apoio em todas as etapas deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Ref. Proc. 04/09411-4, Auxílio Pesquisa) pelo apoio financeiro e institucional prestado para a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Antonio Enedi Boaretto, Dr. Cássio Hamilton Abreu Junior, Dr. Takashi Muraoka e Dr. Virgílio Franco do Nascimento Filho pela atenção, apoio e colaboração no trabalho de pesquisa.

À Bióloga Cleusa Pereira Cabral pela grande amizade desenvolvida, apoio, incentivo e auxílio na condução dos experimentos e análises laboratoriais.

À Suzi Manesco pela grande amizade desenvolvida, colaboração e convívio salutar.

À Professora Dra. Neusa de Lima Nogueira e à Bióloga Mônica Lanzoni Rossi, do Laboratório de Histopatologia Vegetal, pela análise e auxílio nos estudos de microscopia eletrônica.

À Bióloga Henriqueta Maria Gimenes Fernandes pelo auxílio e ajuda nas análises laboratoriais.

Aos Professores do CENA/USP pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Aos pesquisadores da Embrapa/Soja Dr. Leones Alves de Almeida e Dr. Fábio Alvares de Oliveira e aos pesquisadores Dr. Hipólito Assunção Antonio Mascarenhas e Dr. Roberto Tetsuo Tanaka, do Instituto Agrônomo de Campinas, pelo fornecimento das sementes de soja.

Aos grandes amigos Gildemberg Amorim Leal Júnior, João de Deus Gomes dos Santos Júnior, Roberto Wagner Cavalcanti Raposo, Mateus Figueiredo dos Santos, Milton Ferreira de Moraes, Luís Fernando Batista Pinto, Álvaro de Almeida Bicudo e Alessandro Riffel pela união fraterna, convívio diário e auxílio mútuo.

Aos amigos do CENA e da ESALQ, em especial a Cristiane Prezotto Silveira, Jorge Henrique da Silva Santos, Diva Correia, Suzana Pereira de Melo, Paulo Albuquerque, Rodrigo Boaretto, Karina Batista, Anderson Trevizam, Maria Ligia de S. Silva, Simão Lindoso, Edna Bomfim, Denis Herisson, Maria Cláudia Mendes Sorreano, Alfredo José Ferraz de Mello, Luís Ramalho, Marcelo Malavolta, Raul Sartori, Raul Santin, Edson Cabral da Silva, Pedro Sarmento, Carlos Santana Filho, Dário Santos Júnior, Anderson Lange, Alexandre Martines, Gustavo Vitti Moro, Herica Zaia, e Alexandre de Campos Gonçalves.

À Biblioteca do CENA, em especial a Marilia Ribeiro Garcia Henyei pela revisão das normas técnicas, a Raquel Cristina de Carvalho, Renata Fini Mazzero e Celsinho Aguiar pelo pronto atendimento e orientação no uso dos recursos informacionais da biblioteca.

Aos funcionários do CENA.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram com a execução deste trabalho.

“Não somos nós que temos tudo a esperar do futuro; mas o futuro que tem tudo a esperar de nós”.

Tobias Barreto de Menezes

RESUMO

LAVRES JUNIOR, J. **Influência genotípica na absorção, utilização e na toxidez de manganês na soja**. 2007. 88f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

Enquanto a toxidez de manganês (Mn) pode ser um problema comum nas regiões tropicais com predominância de solos ácidos, a deficiência deste nutriente, relatada em diversas espécies vegetais, tem sido atribuída principalmente ao uso excessivo de calcário. O estudo foi desenvolvido em casa-de-vegetação e teve como objetivo avaliar as causas de maior tolerância à toxidez de manganês e susceptibilidade à deficiência. Os cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 foram desenvolvidos em solução nutritiva (pH 4,97) com cinco níveis de Mn (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), nos experimentos de eficiência de absorção e de uso (experimento 1), enquanto que para o estudo de tolerância ao excesso (experimento 2), as doses foram de 2,0; 100,0; 150,0; 200,0 e 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para as observações de anatomia e ultraestrutura (experimento 3), foram utilizadas três concentrações de Mn na solução nutritiva: 0,5; 2,0 (controle) e 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O delineamento estatístico foi o de blocos completos ao acaso em esquema fatorial 5x3 (cinco doses de Mn e três cultivares), com três repetições. No experimento 1, os sintomas visuais de deficiência manifestaram-se, nos três cultivares, a partir do décimo dia após o início dos tratamentos, no estágio V3. Na condição do fornecimento das duas mais baixas doses, tanto as folhas inferiores quanto as superiores exibiram os sintomas de carência. As faixas de valores de concentração de Mn no tecido associadas à deficiência variaram entre 9 a 16 mg kg^{-1} nas folhas superiores e entre 15 a 26 mg kg^{-1} nas folhas inferiores. Ocorreu interação significativa entre as doses de Mn e os cultivares de soja para as produções de massa seca da parte aérea, de raízes e total. Para a produção de grãos e pericarpos constatou-se significância para as doses de Mn somente para IAC-15 e Santa Rosa. O cultivar IAC-Foscarin 31 não apresentou resposta às doses de Mn fornecidas, porém, mostrou-se eficiente na utilização de Mn para a produção de grãos. Os índices de eficiência de produção de grãos (IEP) calculados para IAC-Foscarin 31 (Mn-eficiente $\text{IEP} > 1,0$), IAC-15 e Santa Rosa (Mn-pouco eficiente $0,5 < \text{IEP} < 1,0$) foram, respectivamente, de 1,41; 0,78 e 0,66. Apesar do menor comprimento e superfície total de raízes produzidos pelo cultivar IAC-Foscarin 31, na condição de baixo suprimento de Mn, o acúmulo de Mn nas raízes, nos grãos e nas plantas foi superior ao dos demais cultivares. Os cultivares apresentaram comportamentos distintos na absorção de Mn, sendo o IAC-Foscarin 31 o mais eficiente na absorção (maior V_{max} e menores valores de K_m e C_{min}) e o Santa Rosa o

menos eficiente (menor valor de $V_{\max}$ e maiores valores de K_m e $C_{\min}$). No experimento 2, os cultivares IAC-15 e Santa Rosa exibiram sintomas visuais de toxidez de Mn. Os teores de Mn nas folhas associados ao excesso foram de $1.000,0 \text{ mg kg}^{-1}$. Entretanto, o IAC-15 apresentou maior produção de grãos e de massa seca da parte aérea, acompanhado pelo IAC-Foscarin 31 (intermediário) e o Santa Rosa (menor produção). O maior comprimento total de raízes, as maiores produções de massa seca de raízes e acúmulo de Mn neste tecido conferiram ao IAC-Foscarin 31 maior tolerância ao excesso de Mn na solução. A taxa de crescimento absoluto do sistema radicular, no início do desenvolvimento das plantas, pode conferir maior eficiência de absorção e maior tolerância ao excesso do elemento. As quantidades de Mn absorvidas no simplasto e apoplasto variaram entre os cultivares. A organização das células do mesófilo foliar (células parenquimáticas), do córtex radicular e das ultraestruturas celulares, como os cloroplastos, grãos de amido e glóbulos de lipídios é afetada pelas desordens nutricionais em Mn, principalmente, no cultivar IAC-15 e Santa Rosa. Há evidências nas diferenças genotípicas entre os cultivares e que vários mecanismos atuam conjuntamente tanto na eficiência de absorção do Mn, em condição de baixa disponibilidade no substrato, quanto na capacidade de tolerar níveis excessivos do metal.

Palavras-chave: Comprimento total de raízes. Índice de eficiência de produção de grãos. Eficiência de absorção. Ultraestrutura.

ABSTRACT

LAVRES JUNIOR, J. **Genotypic influence on the absorption, use and toxicity of manganese by soybean**. 2007. 88f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

Manganese (Mn) toxicity may be a major constraint for crop production in acid soils of tropical countries. Nevertheless, deficiency has been recognized as a worldwide nutritional disorder frequently related to excessive lime. A greenhouse experiment was carried out with the objective of evaluating the efficiency of uptake of manganese and use in three-soybean cultivars [*Glycine max* (L.) Merrill] as well as their tolerance to manganese excess. Cultivars (Santa Rosa, IAC-15 and IAC-Foscarin 31) were evaluated under five rates of Mn (0.5; 1.0; 2.0; 4.0 and 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in the nutrient solution (pH = 4.97) with respect to efficiency of uptake and of use. Other experiment was carried out with the objective of evaluating tolerance to manganese in the same cultivars when grown at five doses (2.0; 100.0; 150.0; 200.0 and 250.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). For anatomical and ultrastructures studies the Mn doses tested were 0.5; 2.0 (control) and 200.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The experimental design was a 5x3 factorial of five Mn doses and three cultivars, set in a randomized block, with three replications. In experiment 1, visual symptoms of Mn deficiency (in both upper and lower leaves at the two lowest rates), started at the 10th day after transplanting of the three cultivars, at the V3 vegetative growth stage. The average of Mn concentration in the deficient upper leaves was close to 9 to 16 mg kg^{-1} , ranging from 15 to 26 mg kg^{-1} in the lower ones. Results showed significant interaction of Mn rates and cultivars with the dry matter of the tops, roots and total. Mn rates promoted increase in grain and pericarps yield only on IAC-15 and Santa Rosa cultivars. IAC-Foscarin 31 did not show grain yield responses to Mn supply. However, the indices (grain yield efficiency index) calculated for IAC-Foscarin 31, IAC-15 and Santa Rosa were, respectively, of 1.41; 0.78 and 0.66. They were therefore classified as Mn-Efficient ($\text{IEP} > 1.0$) and of Mn-intermediate efficiency use ($0.5 < \text{IEP} < 1.0$). Although IAC-Foscarin 31 presented the lowest total root length and total root surface of the three cultivars even at low Mn doses, it had higher amount of Mn in roots, grains and whole plant than the other cultivars. The cultivars had distinct behavior in absorption of Mn. IAC-Foscarin 31 was more efficient. It showed higher V_{max} and lower K_m and C_{min} than Santa Rosa and IAC-15. In experiment 2, IAC-15 and Santa Rosa leaves showed visual symptoms of Mn toxicity. The average Mn concentration in these leaf blades was close to 1,000.0 mg kg^{-1} . Nevertheless, IAC-15 had grain and dry matter in tops higher than IAC-Foscarin 31 (intermediate yield) and Santa Rosa.

The highest total root length and root dry matter yield as well as root Mn content in IAC-Foscarin 31 contributes to explain differences in tolerance to Mn excess. The root absolute growth rate, at beginning of vegetative growth, may confer Mn uptake efficiency and tolerance as well. Total, symplastic and apoplastic Mn absorption varied among the three soybean genotypes. The effects of manganese deficiency and toxicity on the morphology of the roots (cortex, stele and vascular cylinder) and leaves (mesophyll tissues) and ultrastructure, like chloroplasts and its starch grains and lipid globules showed distinct degrees for the cultivars, being IAC-15 and Santa Rosa more affected. There are clear evidences of genotypics differences among the cultivars and that joint mechanisms are involved in the efficiency of absorption of low Mn, in the substrate, as well as in the tolerance to high levels.

Keywords: Grain yield efficiency index. Total root length. Ultrastructure. Uptake efficiency.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local, período e espécie vegetal	19
3.2 Instalação, condução do experimento e delineamento estatístico	19
3.2.1 Experimento 1 - eficiência de absorção: produção de massa seca das plantas, transporte à longa distância e cinética de absorção	20
3.2.2 Experimento 2 - tolerância ao excesso de Mn: transporte à longa distância, produção de massa seca e compartimentalização do Mn nas raízes	22
3.2.3 Experimento 3: estudos anatômicos e ultraestruturais de lâminas foliares e de raízes	23
3.2.3.1 Preparo de espécimes para microscopia eletrônica de transmissão	23
3.2.3.2 Preparo de espécimes para microscopia eletrônica de varredura	24
3.2.3.3 Preparo de espécimes para microscopia óptica	24
3.3 Análise dos resultados	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Experimento 1 - eficiência de absorção: produção de massa seca das plantas, transporte à longa distância e cinética de absorção	26
4.1.1 Estimativa das espécies de Mn na solução nutritiva	26
4.1.2 Concentração de macro e micronutrientes nas sementes de soja e sintomas de deficiência de Mn	27
4.1.3 Concentração e quantidade acumulada de Mn nas partes das plantas de soja	29
4.1.4 Comprimento e superfície total de raízes	36
4.1.5 Produção de massa seca da parte aérea, de raízes, massa seca total, relação parte aérea : raiz e produção de grãos e de pericarpos	38
4.1.6 Índice de eficiência de produção de grãos (IEP)	41
4.1.7 Cinética de absorção do Mn – K_m , C_{min} e $V_{máx}$	44

4.2 Experimento 2 - tolerância ao excesso de Mn: transporte à longa distância e compartimentalização do Mn nas raízes	47
4.2.1 Sintomatologia de toxidez, concentrações e quantidades acumuladas de Mn nos cultivares de soja	47
4.2.2 Concentrações de N, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn nas folhas superiores e inferiores dos cultivares de soja	51
4.2.3 Comprimento e superfície total de raízes	55
4.2.4 Produção de massa seca da parte aérea, de raízes, massa seca total, relação parte aérea : raiz e produção de grãos e de pericarpos	57
4.2.5 Compartimentalização do Mn nas raízes dos cultivares de soja	60
4.3 Experimento 3: estudos anatômicos e ultraestruturais de lâminas foliares e de raízes	61
4.3.1 Anatomia de lâminas foliares – microscopia eletrônica de varredura	61
4.3.2 Anatomia de lâminas foliares e de raízes – microscopia óptica	64
4.3.3 Ultraestrutura de lâminas foliares – microscopia eletrônica de transmissão	70
5 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja sempre apresentou destaque no agronegócio brasileiro tornando-se uma das principais oleaginosas cultivadas, pela importância sócio-econômica por responder por uma receita cambial direta para o Brasil de mais de sete bilhões de dólares anuais, bem como pelo recente programa de geração de biocombustível. A produção mundial de soja, no período de 1998, esteve em torno de 154 milhões de toneladas de grãos produzidas numa área de 69 milhões de hectares. A soja caracteriza-se pelo fato de ser um dos produtos agrícolas mais comercializados no mundo. Atualmente, os maiores produtores mundiais da oleaginosa são os Estados Unidos, Brasil, Argentina, China, Índia e Paraguai. Destes, os três principais produtores, Estados Unidos, Brasil e Argentina são também os principais exportadores. No Brasil, a produção no ano agrícola de 2006 foi de 52.595.812 toneladas e em área colhida de 22.023.447 ha (IBGE, 2006), sendo os Estados do MT, PR, RS, GO, MS e BA, os principais produtores.

O Cerrado constitui um ecossistema que abrange, aproximadamente, 2 milhões de km², correspondendo a cerca de 25% da área do Brasil. A região do Cerrado destaca-se no contexto produtivo no país, notadamente pelo crescimento da produtividade de soja (em torno de 2.779 kg/ha), pois, o acréscimo de área situou-se na faixa dos 2,1% ao ano, enquanto a produção apresentou taxa de 8,6% (CONAB, 2006; IBGE, 2006). No entanto, os solos desta região caracterizam-se por apresentarem acentuada acidez, devido aos altos teores de alumínio (Al) e manganês (Mn) e baixos teores de cálcio (Ca), magnésio (Mg) e fósforo (P), conferindo certa limitação à exploração agrícola. Assim, os manejos da fertilidade do solo e da adubação enquadram-se como necessidade.

Com relação ao Mn, a literatura tem apresentado resultados controversos. Sintomas de toxidez de Mn são relatados em diversas espécies vegetais. Entretanto, as variações das concentrações de Mn nas plantas têm sido atribuídas às diferenças inter e intraespecíficas, além das condições edafoclimáticas, as quais favorecem aos elevados teores de Mn trocável no solo, muitas vezes até níveis tóxicos. Por outro lado, o cultivo de variedades de soja altamente produtivas, na região dos Cerrados, em solos inicialmente ácidos, de baixa fertilidade natural e que foram posteriormente corrigidos mediante elevadas doses de calcário, tem sido a principal causa da deficiência de Mn. A aplicação superficial de calcário nos solos, sob sistema plantio direto, bem como a má distribuição do corretivo também concorrem para esta desordem nutricional.

Portanto, avaliações dos atributos nutricionais como a eficiência de absorção e tolerância ao excesso de Mn são ferramentas essenciais nos programas de seleção e melhoramento genético, disponibilizando no mercado cultivares tolerantes ao excesso de Mn no solo, reduzindo, deste modo, a aplicação excessiva de calcário, e por outro lado, liberando ao produtor cultivares altamente responsivos à adubação com o respectivo micronutriente.

Procurou-se verificar, no presente trabalho, as causas de maior tolerância à toxidez de manganês e susceptibilidade à deficiência: à menor eficiência de absorção; ao menor transporte à longa distância, ou ambos os fatores.

Os objetivos do estudo foram avaliar: a produção de massa seca das plantas (parte aérea, raízes e grãos); a cinética de absorção do Mn em plantas inteiras de soja e o transporte à longa distância; verificar as concentrações e quantidades acumuladas de Mn nas partes das plantas de soja, bem como as concentrações de N, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn nas folhas superiores e inferiores (experimento de tolerância ao excesso de Mn); observar o transporte à longa distância e a compartimentalização do Mn nas raízes dos três cultivares; verificar as possíveis alterações ultraestruturais (microscopia eletrônica de varredura e de transmissão) tanto em condição de deficiência, quanto em condição de toxidez; avaliar nos três cultivares os atributos radiculares: comprimento e superfície total.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Aproximadamente 40% das terras cultivadas no mundo e acima de 70% das áreas potencialmente destinadas à agricultura são compostas de solos ácidos (HAUG, 1984; MIYASAKA et al., 1989). A acidificação de solos agrícolas apresenta a maior ameaça para a produção agrícola sustentada e pastagens em diversas partes do mundo (CLUNE; COPELAND, 1999). Ocorrências de desordens nutricionais em plantas cultivadas na região dos Cerrados no Brasil, geralmente estão associadas à acentuada acidez destes solos, devido aos altos teores de Al e Mn e baixos teores de Ca, Mg e P (MALAVOLTA; SARRUGE; BITTENCOURT, 1977; MALAVOLTA; KLIEMANN, 1985).

O manganês (Mn) é o micronutriente mais abundante no solo depois do Fe. Encontra-se em concentração que varia de 20 a 3000 mg kg⁻¹ e o seu teor aumenta com a diminuição do pH do solo (ADRIANO, 2001; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; MALAVOLTA, 2006). Entretanto, atualmente, desordens nutricionais causadas pela deficiência de Mn têm sido amplamente relatadas em diversas espécies vegetais, e em vários países, o que também tem reduzido a produção agrícola.

O cultivo de variedades de soja altamente produtivas, na região dos Cerrados, em solos inicialmente ácidos, de baixa fertilidade natural e que foram posteriormente corrigidos mediante elevadas doses de calcário, tem sido considerada a principal causa da deficiência (OLIVEIRA JUNIOR; MALAVOLTA; CABRAL, 2000; TANAKA; MASCARENHAS; BULISANI, 1992). Nestas situações, o manejo da adubação e nutrição das plantas é dificultado em função da pouca eficiência do fornecimento deste nutriente às raízes (via solo) devido à formação de compostos insolúveis (Mn₂O₃·nH₂O, MnO₂·nH₂O) em condição de pH elevado. A aplicação foliar com Mn torna-se um manejo imediatamente efetivo na eliminação da deficiência neste nutriente pela soja, porém, há a necessidade de outras aplicações durante o ciclo da cultura, pois o elemento é pouco móvel quanto à redistribuição (MARSCHNER, 1995; MENGEL; KIRKBY, 2001).

O manganês é absorvido na forma de Mn⁺² pelas raízes e é acumulado nos compartimentos do apoplasto e simplasto, em três frações distintas. A forma trocável, referente ao apoplasto, está adsorvida às cargas negativas na matriz pectica da parede celular. A forma lábil está associada ao Mn localizado no citoplasma, enquanto o não-lábil refere-se ao Mn depositado nos vacúolos (MUNNS; JACOBSON; JOHNSON, 1963; PAGE; DAINY, 1963; QUIQUAMPOIX; LOUGHMAN; RATCLIFFE, 1993; SATTELMACHER, 2001; WANG, 2003). É transportado das raízes para a parte aérea, via xilema, por meio da

corrente transpiratória, e segundo Ramani e Kannan (1975) a taxa de transporte do ^{54}Mn , em *Oryza sativa* (L.), foi idêntica ao do K. É considerado como elemento de baixa mobilidade no floema, e conseqüentemente, os sintomas de deficiência são manifestados nos órgãos mais novos.

Munns, Jacobson e Johnson (1963) relataram grande movimento de ^{54}Mn das raízes para as folhas, e baixa mobilização do ^{54}Mn da parte aérea para as raízes de plantas de *Avena sativa* (L.) cultivadas inicialmente em condição de suficiência, e posterior de deficiência do elemento na solução nutritiva. Loneragan (1988) também destacou que não houve remobilização do Mn das folhas para outros órgãos, em plantas de *Lupinus albus* (L.) que cresceram inicialmente com suprimento de Mn e, posteriormente em condição de ausência neste nutriente no substrato. Entretanto, grande quantidade do Mn das raízes e caules foi remobilizado para os órgãos vegetais em desenvolvimento. Tsukamoto et al. (2006) constataram elevada redistribuição de ^{52}Mn das raízes para as folhas de cevada (*Hordeum vulgare* L. cv. Ehimehadaka) deficientes em Mn, quando comparadas com aquelas bem nutridas, demonstrando que a deficiência promove aumento na absorção e enchimento de Mn nos vasos condutores. Concluíram também que, a redistribuição do ^{52}Mn das raízes para as folhas foi suprimida quando as plantas foram mantidas em condição de excesso do nutriente no substrato.

Mauk e Noodén (1992), estudando a redistribuição de nutrientes em plantas de *Glycine max* (L.) Merrill cv. Anoka, constataram que as concentrações de Mn das folhas reduziram, concomitantemente ao aumento da concentração deste nutriente nas sementes. Sugeriram que a presença do Mn na seiva do floema, bem como a de outros nutrientes considerados imóveis, indica certa mobilidade em determinadas circunstâncias.

Shinonaga et al. (1999) também constataram relativa mobilidade do ^{54}Mn , bem como do ^{73}As e do ^{85}Sr , das folhas para as sementes de *Glycine max* (L.) Merrill cv. Okuharawase, todavia, em menor proporção daquela apresentada pelo ^{86}Rb , ^{75}Se e ^{58}Co . A seiva de algumas plantas pode apresentar determinadas concentrações de Mn, e deste modo suprir adequadamente as sementes em desenvolvimento, sendo porém, incapaz de suprir nutricionalmente as raízes (LONERAGAN, 1988).

O sintoma típico de deficiência de Mn é a clorose internerval, com posterior amarelecimento das folhas novas e pequena redução no tamanho do limbo foliar. Tanaka, Mascarenhas e Bulisani (1992) relataram concentrações de Mn em folhas de *Glycine max* (L.) Merrill cv. Garimpo de 13 e 31 mg kg^{-1} , respectivamente, em plantas com e sem sintoma de deficiência. Komatuda et al. (1993), estudando o comportamento de cultivares de soja

associados a doses de Mn em solução nutritiva, constataram que houve comportamento diferencial entre as plantas. O cultivar Doko mostrou-se mais sensível à deficiência, apresentando concentrações de Mn de 23; 28; 25 e 28 mg kg⁻¹, respectivamente, nas folhas superiores, folhas inferiores, caules e raízes, na ausência de Mn na solução. Para o cultivar Cristalina, que se mostrou tolerante quanto à deficiência, as concentrações de Mn, nos respectivos órgãos foram de 18; 28; 18 e 43 mg kg⁻¹. Com o fornecimento da dose de Mn de 4,5 µmol L⁻¹ as concentrações de Mn nas folhas superiores, folhas inferiores, caules e raízes foram, respectivamente, de 130; 233; 63 e 230 mg kg⁻¹ para Doko e de 103; 195; 50 e 158 mg kg⁻¹ para o cultivar Cristalina. Abreu, Raij e Tanaka (1995) verificaram que em condição de deficiência de Mn no solo os cultivares de soja IAC-5, IAC-4 e IAC-8 apresentaram maior produção de massa seca, quando comparados aos cultivares Santa Rosa, Iguaçu e Cristalina.

Melhor utilização interna ou menor exigência, incremento na redistribuição do Mn, aumento na taxa de absorção (baixo K_m e alto V_{max}), exsudação de ácidos orgânicos, acidificação da rizosfera e geometria do sistema radicular têm sido relatados como mecanismos responsáveis pela menor suscetibilidade à deficiência de Mn, principalmente em plantas de trigo (LEIDI; GOMEZ; LA GUARDIA, 1987; SADANA; LATA; CLAASSEN, 2002). Com relação à influência da rizosfera na aquisição do Mn, Timonin (1946) subdividiu, de modo geral, três grandes fatores envolvidos na variação da disponibilidade de Mn para as plantas: 1) fatores/aspectos físicos e químicos do solo; 2) variação genotípica e 3) atividade microbiana.

Os sintomas de toxidez de Mn também são amplamente relatados na literatura em diversas espécies vegetais, entretanto, as variações das concentrações de Mn nas plantas têm sido atribuídas às diferenças inter e intraespecíficas, além das condições edafoclimáticas. Os sintomas de toxidez são caracterizados pela clorose generalizada das folhas novas, aparecimento de pontuações necróticas no limbo e enrugamento das folhas novas (KOMATUDA et al., 1993; OLIVEIRA JUNIOR; MALAVOLTA; CABRAL, 2000; REDDY; RONAGHI; BRYANT, 1991). Oliveira Junior, Malavolta e Cabral (2000) consideraram teores nas folhas de soja entre 1.155 e 2.380 mg kg⁻¹ como sendo prejudiciais à produção de massa seca. Fageria (2001) relatou concentrações no tecido vegetal, respectivamente, de 67 e 720 mg kg⁻¹ como teores adequado e tóxico para plantas de soja.

As espécies vegetais e genótipos dentro das espécies diferem amplamente na tolerância ao Mn em condição de toxidez (BROWN; DEVINE, 1980; FOY; SCOTT; FISHER, 1988; MARSCHNER, 1995; MORONI; SCOTT; WRATTEN, 2003), bem como na suscetibilidade à deficiência quando crescem em solos ou substratos com baixos teores (GRAHAM, 1988;

SADANA; LATA; CLAASSEN, 2002), sendo muitas dessas diferenças hereditárias (GRAHAM; NICKELL; HOEFT, 1995; REDDY, 1990; DELHAIZE et al., 2003; PITTMAN, 2005). Os mecanismos de tolerância ao excesso de Mn, têm sido associados, à oxidação do Mn nas raízes; restrição na taxa de absorção pelas raízes e translocação do excesso de Mn para as folhas, bem como distribuição homogênea entre os tecidos vegetais; maior tolerância interna; e interação com outros nutrientes (principalmente, K, Ca, Mg, Fe). Williams e Vlamis (1957) relataram o efeito do silício (Si) na absorção e distribuição do Mn nas folhas de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Estes autores verificaram ausência de sintomas de toxidez de Mn nas plantas cultivadas na presença de Si, na concentração de 10 ppm na solução nutritiva, bem como menor concentração de Mn em relação às plantas cultivadas sem a adição de Si na solução.

Wang (2003), estudando a absorção de Mn e a compartimentalização do nutriente em raízes destacadas de *Nicotiana tabacum* (L.), constatou que para o genótipo sensível o padrão de absorção foi o mesmo durante o período experimental, enquanto que, para o genótipo tolerante houve decréscimo do Mn absorvido após 180 minutos de exposição. Esta redução na absorção foi associada à exclusão do Mn localizado no apoplasto, apesar da contínua absorção via simplástica, concluindo que a diferença de absorção apresentada pelos genótipos foi caracterizada pelo apoplasto. Em outro estudo, Wang, Evangelou e Ashraf (2003) atribuíram as diferenças de absorção às características das paredes celulares dos genótipos, destacando que houve diferenças quanto ao conteúdo de polissacarídeos e proteínas no genótipo sensível e tolerante, e entre a condição de deficiência e excesso de Mn na solução nutritiva. Tanto em condição de deficiência como de toxidez, houve decréscimo na concentração de ácido urônico em ambos os genótipos, porém foi observado menor decréscimo para o genótipo tolerante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, período e espécie vegetal

Os experimentos foram desenvolvidos em casa-de-vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba – SP. Os cultivares Santa Rosa (sensível à deficiência), IAC-15 (intermediário) e IAC-Foscarin 31 (tolerante à toxidez) da espécie *Glycine max* (L.) Merrill foram cultivados em solução nutritiva e submetidos a doses de manganês. O primeiro experimento de eficiência de absorção: I) produção de massa seca e absorção de Mn foi instalado em outubro de 2004 e avaliado até março de 2005. II) cinética de absorção foi instalado em outubro de 2005. III) os estudos de microscopia eletrônica microscopia eletrônica (varredura e transmissão) foram instalados e desenvolvidos entre os meses de maio a junho de 2006. O experimento de tolerância ao excesso/toxidez foi instalado em março/abril e conduzido até agosto de 2006.

3.2 Instalação, condução do experimento e delineamento estatístico

As sementes foram colocadas para germinar em bandeja rasa com vermiculita, umedecida com solução de sulfato de cálcio (CaSO_4 , 10^{-4} mol L^{-1}). Quando as plantas atingiram cerca de 5 cm de altura (estádio fenológico V1), foram transferidas para bandeja plástica com capacidade de 40 L contendo solução nutritiva (JOHNSON et al., 1957), adaptada por Epstein e Bloom (2005), diluída a 1/5 da concentração usual, e com o pH de $4,97 \pm 0,03$ (período de adaptação). Após o terceiro dia do transplante das mudas, empregou-se a solução nutritiva com as concentrações efetivas de Mn. As estimativas das possíveis espécies químicas de Mn presentes na solução (experimento de eficiência de absorção) foram elaboradas por meio do “software” GEOCHEM-PC (PARKER; NORVELL; CHANEY, 1995b), em função dos valores de pH e das doses de Mn (Tabela 1).

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o de blocos completos ao acaso com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 5 x 3 (cinco doses de Mn x três cultivares de soja), com três repetições.

3.2.1 Experimento 1 - eficiência de absorção: produção de massa seca das plantas, transporte à longa distância e cinética de absorção

O experimento teve como objetivo, verificar qual o cultivar mais eficiente na absorção de Mn e se este completa o ciclo com menos Mn.

Após permanência das plantas em solução nutritiva, como descrito no item 3.2 (período de adaptação), e quando estavam no estágio V1 (primeiro par de folhas) foram transplantadas duas plantas por vaso de 2,5 L (diâmetro de 15 cm) contendo 2,0 L de solução nutritiva. As soluções foram preparadas a partir da solução recomendada por Johnson et al. (1957), adaptada por Epstein e Bloom (2005), e modificadas para atender as doses de Mn (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Durante a realização do experimento, as soluções nutritivas, sob constante aeração, foram renovadas a cada 15 dias, completando-se o volume com água desmineralizada, quando necessário. O pH foi mantido em torno de 5,0. Colheram-se as plantas no final do ciclo reprodutivo (R7) e, posteriormente, foram separadas em caule, folhas inferiores e superiores (limbo e pecíolo), pericarpos e grãos. As folhas utilizadas para diagnose (terceira ou quarta folha a partir do ápice da haste principal) foram colhidas no estágio R1. O material devidamente identificado foi acondicionado em sacos de papel, seco em estufa a 65°C durante 72 horas e pesado em balança de precisão.

Na ocasião da colheita e separação das plantas, as raízes foram imediatamente lavadas em água corrente utilizando-se duas peneiras com diâmetro de malha de 0,25 e 1,00 mm. Posteriormente, foram separadas em raiz pivotante e radículas. A raiz pivotante não foi utilizada para as avaliações dos atributos radiculares (comprimento e superfície total de raízes), embora se constitua em elevada proporção da massa radicular (ARAÚJO et al., 2004). Para a quantificação do comprimento e da superfície, foi retirada uma sub-amostra para cada unidade experimental, cortando-se vertical e horizontalmente um volume de raízes com cerca de 20% de massa fresca total (BOHM, 1979; HABIB, 1988; BOX JUNIOR., 1996; COSTA et al., 2002; LAVRES JUNIOR; MONTEIRO, 2003). Em seguida, essas sub-amostras foram colocadas em copos plásticos contendo água e corante para que as partes mais novas e claras fossem tingidas, e armazenadas em geladeira $\pm 10^\circ\text{C}$ (NOORDWIJK; FLORIS, 1979) evitando-se, portanto, a desidratação e perda de massa seca por respiração durante a manipulação (separação das raízes em lâminas transparentes). Em seguida, as imagens das raízes foram obtidas com o auxílio de *scanner* e analisadas por meio do aplicativo SIARCS (Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo) versão 3,0. Os valores totais

de comprimento e superfície foram obtidos por regra de três direta entre os valores da sub-amostra e sua massa seca com a massa seca total de raízes de cada unidade experimental.

O Índice de Eficiência de Produção de Grãos (IEP) foi calculado pela seguinte fórmula: (IEP) – (produção no mais baixo nível/média experimental no mais baixo nível) / (produção no mais alto nível/média experimental no mais alto nível) (GRAHAM, 1984).

As concentrações de Mn, nos diferentes órgãos, foram determinadas conforme metodologia apresentada por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) e as quantidades acumuladas de Mn nos tecidos, foram calculadas pela multiplicação do teor com o valor da massa seca. O transporte à longa distância foi determinado em função do conteúdo de Mn na parte aérea dividido pelo Mn total absorvido, e multiplicando-se por 100.

Para o estudo de cinética de absorção, adotaram-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.2. Quando as plantas estavam no estágio V5 foram transferidas, em número de duas, para vasos de 1,5 L, contendo a solução de absorção (doses de Mn de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O Mn foi excluído da solução até antes do início do experimento de cinética, visando aumentar a capacidade das plantas de absorver este elemento. Após a introdução das plantas na solução de absorção, foram retiradas alíquotas de 5 mL da solução de cada vaso, inicialmente, em intervalos de 30 minutos, até que não houvesse mudança significativa na concentração de Mn na solução nutritiva. O volume de solução nutritiva foi mantido constante durante todo o período experimental. O período de absorção foi de 50 horas. Ao final do ensaio, as plantas foram separadas em parte aérea e raízes para determinação da massa seca e das concentrações de Mn. Em um outro experimento paralelo, as plantas dos três cultivares, cuidadas exatamente conforme anteriormente descrito, foram supridas com Mn na concentração de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ durante 2, 4, 6, 8 e 10 dias. Neste caso, as soluções foram trocadas a cada dois dias, a fim de manter aproximadamente constante a concentração de Mn. No décimo dia, o material foi colhido e lavado com água. Após a determinação da massa fresca, o material foi secado em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C, durante 72 horas. As taxas de crescimento absoluto foram calculadas, conforme equação proposta por Hunt (1978).

As concentrações de Mn nas alíquotas foram, então, determinadas por espectrometria de absorção atômica, sendo os dados obtidos utilizados para estimar as constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$), por uma aproximação gráfico-matemática, conforme sugerido por Ruiz (1985).

3.2.2 Experimento 2 - tolerância ao excesso de Mn: transporte à longa distância, produção de massa seca e compartimentalização do Mn nas raízes

Adotaram-se os mesmos procedimentos como descrito no item 3.2. As soluções foram preparadas a partir da solução recomendada por Johnson et al. (1957), adaptada por Epstein e Bloom (2005), e modificadas para atender as doses de Mn (2,0; 100,0; 150,0; 200,0 e 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Durante a condução do experimento, as soluções nutritivas, sob constante aeração, foram renovadas a cada 15 dias, completando-se o volume com água desmineralizada, quando necessário. O pH foi mantido em torno de 5,0. Na primeira troca de solução nutritiva as doses corresponderam à 50% das concentrações efetivas. Colheram-se as plantas no final do ciclo reprodutivo (R7), ocasião em que foram separadas em caule, folhas inferiores e superiores (limbo e pecíolo), raízes, pericarpos e grãos. O material devidamente identificado foi acondicionado em sacos de papel, seco em estufa a 65°C durante 72 horas e pesado em balança de precisão.

No mesmo dia do corte das plantas e após a lavagem das raízes, as mesmas foram divididas em diferentes porções para as determinações do comprimento e da superfície total. Para a quantificação do comprimento e da superfície foi adotado o mesmo procedimento como descrito no item 3.2.1.

Para o estudo da compartimentalização do Mn nas raízes, após o período de adaptação das plantas, foram transplantadas duas plantas por vaso de 2,5 L (diâmetro de 15 cm) com 2,0 L de solução nutritiva, contendo o Mn nas concentrações de 2,0 e 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, onde permaneceram por 48 horas. Após esse período, as plantas foram removidas da solução nutritiva e separadas em raízes e parte aérea. Posteriormente, efetuou-se a determinação do Mn trocável e não-trocável logo em seguida ao corte das plantas, conforme metodologias descritas por Munns, Jacobson e Johnson (1963) e Wang (2003). Para tanto, foram coletadas duas amostras das raízes, por tratamento, as quais foram previamente lavadas com água desionizada. Em seguida, adicionou-se uma porção (amostra) em recipiente contendo solução de “dessorção” (2,0 mmol de CuCl_2 , 0,5 mmol de CaCl_2 e 100 mmol de HCl) e conservando-se em geladeira ($\pm 5^\circ\text{C}$) por cerca de 30 minutos. Após o processo de dessorção, as raízes foram lavadas em água desionizada, secadas (65°C durante 72 horas), pesadas e analisadas. Utilizou-se o CaCl_2 (0,5 mmol) para manter a integridade da parede celular durante a dessorção do Mn, e o Cu (CuCl_2 , 2,0 mmol) por se ligar fortemente à parede celular, liberando o Mn^{2+} ligado aos sítios de troca do apoplasto radicular (WANG, 2003).

Para ambas as amostras (raízes não imersas e imersas na solução de dessorção), a determinação das concentrações de Mn, foi efetuada conforme metodologia proposta por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Foi empregada a digestão nítrico-perclórica e o método analítico de espectrofotometria de absorção atômica. O total de Mn absorvido foi determinado na amostra de raízes que não foi colocada na solução de dessorção. A absorção “simplástica” de Mn foi atribuída à determinação do Mn remanescente nas raízes imersas na solução de dessorção. Portanto, o Mn total absorvido refere-se ao Mn transportado via simplasto e apoplasto, e a diferença entre o total de Mn absorvido e Mn absorvido no simplasto, representou a fração do Mn retido no apoplasto (WANG, 2003).

3.2.3 Experimento 3: estudos anatômicos e ultraestruturais de lâminas foliares e de raízes

Conduziu-se outro experimento em casa-de-vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, em Piracicaba – SP. Os cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 foram cultivados em solução nutritiva, no período de 17 de maio a 27 de junho de 2006. Utilizou-se a solução de Johnson et al. (1957), adaptada por Epstein e Bloom (2005), diluída a 1/5 da concentração usual, e com o pH inicial de $4,97 \pm 0,03$. Após o terceiro dia do transplante das mudas, empregaram-se as soluções nutritivas com as concentrações efetivas de Mn. (0,5; 2,0 e 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando-se duas repetições. Escolheram-se, na ocasião da coleta dos tecidos, as plantas que apresentavam sintomas mais visíveis de deficiência (mantidas na solução com 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Mn), de toxidez (200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e plantas "sadias" (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Para tanto, foram coletadas as folhas superiores e a extremidade das raízes secundárias com pêlos absorventes, a cerca de 10 mm da coifa. Os diâmetros médios das seções radiculares foram obtidos por meio da microscopia óptica e calculados com uso do aplicativo SIARCS versão 3,0.

3.2.3.1 Preparo de espécimes para microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de folhas e de raízes (medindo 1x2 mm) foram fixadas em solução de Karnovsky modificado: glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mmol L^{-1} em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 7,2 por 48 horas a 4°C, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L^{-1} (3x 15 min.) e pós fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2 mol L^{-1} . Após rápidas lavagens em solução salina 0,9%, foram coradas “em bloco” com acetato de uranila 2,5% em água *overnight* a 4°C.

Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de acetona em água (25, 50, 75, 90 e 100%). As amostras foram incluídas em resina Epon 812 ou Spurr, segundo Luft (1961).

Os cortes ultrafinos (60-90 nm) foram depositados sobre telas de cobre recobertas com colódio, contrastados com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo conforme Reynolds (1963) e, em seguida, examinados ao microscópio eletrônico Zeiss EM-900 operando a 50kV e ampliação de 3.000 e 4.400 X.

3.2.3.2 Preparo de espécimes para microscopia eletrônica de varredura

Amostras de limbo foliares foram fixadas em solução de Glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ por duas horas. Em seguida, foram lavadas três vezes, por 10 minutos, em tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A desidratação foi feita em séries crescentes de etanol em água nas concentrações de 35%; 50%; 60%, 70%; 80% e 90%, uma vez de 15 minutos; e 100%, três vezes de 20 minutos. Em seguida, as amostras foram secadas no aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030) do NAP/MEPA ESALQ, montadas em “stubs” e metalizadas com ouro durante 260 segundos ao evaporador (MED 010 Balzers). As amostras foram observadas no microscópio eletrônico Zeiss LEO 435 VP. Posteriormente, obtiveram-se as imagens digitalizadas.

3.2.3.3 Preparo de espécimes para microscopia óptica

A metodologia de inclusão, para os cortes semi-finos, foi a mesma utilizada para a microscopia eletrônica de transmissão: os cortes semifinos (150 nm) foram depositados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina 1% em solução de borax 1%. Em seguida as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando entelan e observadas ao microscópio óptico Zeiss Axioscop 40 HBO 50 A/C.

3.3 Análise dos resultados

Submeteram-se os resultados às análises estatísticas, utilizando-se o programa estatístico SAS - System for Windows 6.11 (SAS Inst., 1996). Efetuou-se a análise de variância e, de acordo com o nível de significância no teste F para as doses de Mn, procedeu-se ao estudo de regressão para os componentes de primeiro e segundo grau, pelo procedimento GLM. O modelo de regressão foi escolhido com base no coeficiente de determinação (R^2) e na significância da regressão e de seus coeficientes (PIMENTEL-GOMES, 2000). As médias relativas ao índice de eficiência de produção de grãos, ao acúmulo

de Mn e sua distribuição percentual nos componentes da parte aérea e raízes foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1 - eficiência de absorção: produção de massa seca das plantas, transporte à longa distância e cinética de absorção

4.1.1 Estimativa das espécies de Mn na solução nutritiva

Pela Tabela 1, observa-se que tanto no pH inicial da solução nutritiva (4,97), quanto nas possíveis mudanças de pH e em todas as doses empregadas no estudo, mais de 98% do Mn (forma livre como Mn^{+2} e complexado com EDTA) estaria disponível para as plantas de soja. Fazendo-se uma estimativa com os valores de pH de 4,00; 4,97; 6,00 e de 7,00 o quelante EDTA complexaria grande parte do Mn (mais de 92% em média) e, deste modo, contribuindo para a disponibilidade e, posteriormente, absorção do elemento pelas plantas, o que é confirmado pela maior constante de estabilidade do EDTA para Mn, quando comparado a outros como HEEDTA, DTPA, 1,2 DCTA, EDDHA e NTA (PRIMO-YÚFERA; CARRASCO-DORRIÉN, 1973). Para o menor valor de pH (3,00), apenas 28% do Mn estaria complexado e cerca de 67% na forma livre (Mn^{+2}). Entretanto, apenas uma pequena quantidade do nutriente (menos de 0,53%) poderia estar ligada a outros íons como SO_4^{-2} e Cl^- , não reduzindo, portanto, a disponibilidade das quantidades efetivas de Mn fornecidas na solução nutritiva (doses). Também não foi verificada possível ligação entre Mn^{+2} e PO_4^{-3} , com possível formação de complexo insolúvel – indisponível, o que poderia resultar em menor absorção de Mn pelas plantas e, conseqüentemente, maior manifestação de deficiência nos tecidos. Constatou-se que aproximadamente 98% do Fe estava complexado com EDTA, sendo que 76% do total do quelante associou-se ao Fe e, apenas, 1,7% ao Mn.

Em trabalho recente, Lombnaes e Singh (2003a) utilizaram o “software” GEOCHEM-PC para avaliar o efeito da atividade do Mn^{+2} , em solução nutritiva, na absorção de micronutrientes e na produção de massa seca de plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) e aveia (*Avena sativa* L.). Modelos de equilíbrio químico podem ser usados em estudos de nutrição de plantas cultivadas em soluções nutritivas. Com o advento do uso de agentes quelantes, as pesquisas tornaram-se mais fáceis de serem executadas, pois a precipitação do ferro pela ligação com o íon fosfato foi contornada pelo uso do agente quelante EDTA (PARKER; CHANEY; NORVELL, 1995a).

Tabela 1 - Especificação do $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ das soluções nutritivas pelo “software” GEOCHEM (PARKER; NORVELL; CHANEY, 1995b), em função dos valores de pH e das doses de Mn.

	Doses de Mn				
	$\mu\text{mol L}^{-1}$				
pH = 3,00	0,5	1,0	2,0	4,0	10,0
Mn livre (Mn^{+2})	67,65%	67,68%	67,73%	67,84%	68,13%
Complex. Com SO_4^{-2}	3,68%	3,69%	3,69%	3,69%	3,71%
Complex. Com Cl^-	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%	0,31%
Complex. Com EDTA	28,35%	28,32%	28,27%	28,16%	27,85%
pH = 4,00					
Mn livre (Mn^{+2})	12,13%	12,25%	12,49%	13,00%	14,71%
Complex. Com SO_4^{-2}	0,69%	0,70%	0,71%	0,74%	0,84%
Complex. Com Cl^-	0,06%	0,06%	0,06%	0,06%	0,07%
Complex. Com EDTA	87,13%	87,00%	86,74%	86,20%	84,39%
pH = 4,97					
<i>Mn livre (Mn^{+2})</i>	<i>6,23%</i>	<i>6,32%</i>	<i>6,50%</i>	<i>6,91%</i>	<i>8,37%</i>
<i>Complex. Com SO_4^{-2}</i>	<i>0,36%</i>	<i>0,36%</i>	<i>0,37%</i>	<i>0,40%</i>	<i>0,48%</i>
<i>Complex. Com Cl^-</i>	<i>0,03%</i>	<i>0,03%</i>	<i>0,03%</i>	<i>0,03%</i>	<i>0,04%</i>
<i>Complex. Com EDTA</i>	<i>93,39%</i>	<i>93,29%</i>	<i>93,09%</i>	<i>92,67%</i>	<i>91,11%</i>
pH = 6,00					
Mn livre (Mn^{+2})	5,98%	6,07%	6,25%	6,63%	8,05%
Complex. Com SO_4^{-2}	0,35%	0,35%	0,36%	0,38%	0,46%
Complex. Com Cl^-	0,03%	0,03%	0,03%	0,03%	0,04%
Complex. Com EDTA	93,65%	93,55%	93,36%	92,92%	91,45%
pH = 7,00					
Mn livre (Mn^{+2})	1,65%	1,68%	1,75%	1,91%	2,61%
Complex. Com SO_4^{-2}	0,12%	0,12%	0,13%	0,14%	0,19%
Complex. Com Cl^-	--	--	--	--	0,01%
Complex. Com EDTA	98,22%	98,18%	98,11%	97,93%	97,19%

4.1.2 Concentração de macro e micronutrientes nas sementes de soja e sintomas de deficiência de Mn

Os teores dos macros e micronutrientes nas sementes dos três cultivares de soja, que foram postas para germinar, utilizadas no experimento são apresentados na Tabela 2, sendo as concentrações de Mn na massa seca, respectivamente, de 26,9; 22,6 e 25,4 mg kg^{-1} para os cultivares Santa-Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31. A análise de variância revelou que não ocorreu diferença significativa na concentração de Mn nas sementes dos três cultivares. Estes valores estão condizentes com aqueles relatados por Ohki, Wilson e Anderson (1980) e por Moreira (1999).

Tabela 2 - Composição mineral dos grãos dos três cultivares de soja Santa-Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31.

Nutrientes	Cultivares			
	Santa-Rosa	IAC-15	IAC-31	Outras*
	g kg ⁻¹			
N	60,13	58,66	64,96	57,9 ± 12,9
P	5,90	6,19	3,85	4,75 ± 1,05
K	19,71	18,83	15,50	18,0 ± 4,0
Ca	2,91	2,81	2,17	4,05 ± 2,45
Mg	2,22	2,40	2,39	2,65 ± 0,55
S	-	-	-	3,30 ± 0,90
	mg kg ⁻¹			
B	31,71	25,52	30,44	11,58 ± 5,90
Co	0,08	0,03	0,29	-
Cu	9,94	6,35	9,20	27,0 ± 14,0
Fe	80,35	100,83	126,20	202,5 ± 133,5
Mn	26,94	22,59	25,43	31,5 ± 10,5
Mo	1,91	3,12	0,42	1,98 ± 1,93
Ni	0,47	0,37	3,96	-
Zn	51,47	46,43	39,28	62,5 ± 29,5

*Concentrações médias encontradas nos grãos de soja, adaptado de Ohki, Wilson e Anderson (1980) e de Moreira (1999)

A partir do décimo dia de crescimento das plantas, após o início dos tratamentos (estádio fisiológico V3), observaram-se, nos três cultivares, sintomas de deficiência de Mn nas doses de 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 1). Os sintomas acentuaram-se com o tempo de cultivo, sendo mais drásticos nas plantas crescendo na mais baixa dose do nutriente. Observou-se, nessas condições, menor crescimento das plantas (apesar do estiolamento em condições de casa-de-vegetação), trifólios pequenos e levemente estreitos, bem como limbos foliares, notadamente os mais novos, exibindo sintomas característicos de deficiência de Mn (clorose internerval com áreas delgadas de coloração mais escura próximas às nervuras – reticulado grosso) e que posteriormente evoluíram para amarelecimento generalizado, folhas albinas e necrose. Estes sintomas visuais concordam com as observações descritas na literatura. Não foram verificados, em todo o ciclo das plantas, sintomas visuais de toxidez de

Mn nas plantas (dos três cultivares) mantidas nas mais elevadas doses (4,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Mn), as quais correspondem, respectivamente, ao aumento em duas e cinco vezes da concentração usual da solução nutritiva empregada no estudo.

Figura 1. Deficiência de Mn manifestada a partir do décimo dia após início dos tratamentos (a) e em fase mais avançada (b), no cultivar IAC-15, considerando a dose de Mn de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e trifólio sem sintoma (c) – sadio, dose de Mn de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para Campbell e Nable (1988) a clorose interveinal das folhas novas inicialmente é consequência da mobilidade geralmente baixa do Mn; pela diminuição na atividade de dismutase de superóxido, o que deixa os cloroplastos sem proteção contra radicais livres; o desarranjo nas membranas dos tilacóides liberta e ativa a polifenoloxidase que oxida vários compostos os quais causam danos metabólicos, inclusive a destruição da clorofila (MALAVOLTA, 2006).

4.1.3 Concentração e quantidade acumulada de Mn nas partes das plantas de soja

Constatou-se interação significativa ($P < 0,01$) entre os cultivares de soja e as doses de Mn para os resultados de concentração de manganês nas folhas usadas para diagnose, nas folhas superiores e nas folhas inferiores, bem como interação significativa ($P < 0,05$) para a concentração de Mn nas raízes (Figura 2). Entretanto, para as concentrações de Mn no caule, no pericarpo e nos grãos não foi verificada interação entre as doses de Mn e os cultivares, como também efeito dos cultivares (Figura 3). Constatou-se apenas significância para as doses de manganês.

Figura 2. Concentração de Mn na folha utilizada para diagnose (A), nas folhas superiores (B), nas folhas inferiores (C) e nas raízes (D) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

Figura 3. Concentração de Mn no caule (A), nos pericarpos (B) e nos grãos (C), na média dos três cultivares, e em função das doses de Mn na solução nutritiva.

A concentração de Mn nas folhas usadas para diagnose variou em média na cultivar Santa Rosa de 9 a 41 mg kg⁻¹, no cultivar IAC-15 de 14 a 53 mg kg⁻¹ e de 10 a 60 mg kg⁻¹ no IAC-Foscarin 31, para as doses de Mn de 0,5 a 10,0 µmol L⁻¹, respectivamente. Para as folhas superiores dos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 as concentrações variaram em média, de 12 a 87 mg kg⁻¹, de 9 a 97 mg kg⁻¹ e de 11 a 98 mg kg⁻¹, respectivamente. Para as folhas inferiores e raízes variaram, respectivamente, na Santa Rosa de 15 a 113 mg kg⁻¹ e de 5 a 43 mg kg⁻¹; na IAC-15 de 19 a 141 e 13 a 29 mg kg⁻¹. Quanto ao cultivar IAC-Foscarin 31, esta variação nas folhas inferiores foi de 19 a 160 mg kg⁻¹ e de 15 a 59 mg kg⁻¹ nas raízes. Na mais baixa dose, a concentração de Mn nas raízes do cultivar IAC-15 correspondeu a 87% em relação àquela obtida no IAC-Foscarin 31, enquanto que para Santa Rosa esse valor correspondeu a 31%. Portanto, em condição de baixo suprimento de Mn na solução, as raízes do cultivar IAC-Foscarin 31 apresentaram a maior concentração de Mn, seguidas pelo IAC-15 e Santa Rosa.

Em todos os cultivares, observou-se que a concentração do nutriente nas folhas inferiores foi superior às demais partes da planta, notadamente na mais elevada dose, como também no cultivar IAC-Foscarin 31, o que caracteriza a baixa redistribuição (MARSCHNER, 1995).

As concentrações de Mn nas demais partes das plantas (caule, grãos e pericarpo) foram significativamente influenciadas somente pelo suprimento de manganês na solução, na média dos três cultivares, e foram representadas pelo modelo linear (caules e pericarpo) e pelo modelo quadrático de regressão (grãos) Figura 3. Para o caule, pericarpos e grãos os teores variaram, respectivamente, de 6 a 47 mg kg⁻¹, de 8 a 63 mg kg⁻¹ e de 18 a 38 mg kg⁻¹, da mais baixa para mais elevada dose de Mn.

A relação entre a concentração de Mn nas folhas usadas para diagnose das plantas de soja e a produção de massa de grãos foi significativa somente para o cultivar Santa Rosa. Esta relação foi representada pelo modelo quadrático de regressão, o que permitiu calcular a concentração crítica de 28 mg kg⁻¹ [$Y_{\text{Santa Rosa}} = 5,1794 + 0,6989X - 0,0112X^2$ ($R^2=0,64^{**}$)]. Adotou-se o critério estabelecido por Ulrich e Hill (1973), os quais definiram o nível crítico como a concentração do nutriente que corresponde a 90% da produção máxima da cultura. Ohki (1981) relatou que a concentração crítica de Mn nas folhas recém-expandidas no cultivar de soja “Bragg” foi de 10 mg kg⁻¹, o qual também está abaixo daqueles relatados por Moreira (1999) nos cultivares IAC 15-1, IAC-17, FT-Estrela e DM Nobre. Segundo Mengel, Segars e Rehm (1987), para a obtenção de alta produção de grãos de soja as concentrações adequadas de Mn nos trifólios totalmente desenvolvidos, colhidos antes da formação das vagens, devem

estar na faixa de 15 a 200 mg kg⁻¹. Verifica-se, portanto, uma variação dos valores considerados adequados para a soja. O Mn, logo após ferro (Fe), é o nutriente com maior amplitude de concentração (FAGERIA, 2001). Esta larga faixa de variação pode estar associada às diferenças genótípicas quanto ao uso do manganês pelas plantas de soja. Entretanto, de acordo com alguns relatos na literatura, verifica-se que a concentração crítica interna de Mn para a soja situa-se entre 10 a 20 mg kg⁻¹ (OHLROGGE, 1963; OHKI, 1976;1981; REUTER; EDWARDS; WILHELM, 1997).

Na menor dose de Mn na solução nutritiva, as raízes do cultivar IAC-Foscarin 31 acumularam 0,081 mg/vaso, enquanto que para IAC-15 e Santa Rosa estes valores foram de 0,057 e 0,042 mg/vaso, respectivamente (Figura 4). Na mesma condição e para a parte aérea, estes valores foram de 0,665; de 0,510 e de 0,531 mg/vaso, respectivamente, para IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa e corresponderam a 89; 90 e 93% do total absorvido pelas plantas. Deste total, 0,245; 0,159 e 0,122 mg/vaso acumularam-se nos grãos dos três cultivares, respectivamente. Este efeito repetiu-se na condição de suprimento adequado (dose de Mn de 2,0 μmol L⁻¹). Portanto, pode-se constatar que, mesmo apresentando menor produção de massa seca de raízes (Figura 7B), o cultivar IAC-Foscarin 31 acumulou maior quantidade de Mn nas raízes e nos grãos (Figuras 4 e 5), o que pode indicar maior transporte à longa distância ou maior redistribuição. Outro possível mecanismo envolvido na eficiência de utilização de Mn pelo cultivar IAC-Foscarin 31, pode ser a maior redistribuição do nutriente das raízes para os grãos, que são considerados drenos fortes. Do total acumulado na parte aérea (transporte à longa distância) cerca de 51% do Mn distribuiu-se nas folhas superiores e nos grãos, enquanto que para o IAC-15 e Santa Rosa estes valores corresponderam, respectivamente, a 40 e 39% (Figura 5). As folhas superiores caracterizam-se por serem mais ativas, fotossinteticamente.

Os mecanismos responsáveis pelas diferenças varietais na eficiência de uso do Mn não são claramente conhecidos (GRAHAM, 1988), e provavelmente envolvam muitos fatores. Em estudo com genótipos de cevada, Huang, Webb e Graham (1993) sugeriram que a maior concentração de Mn nas raízes das plantas eficientes na absorção poderia estar associada a maior imobilização nesta parte, e que este fenômeno poderia ser um dos fatores envolvidos.

Figura 4. Acúmulo de Mn na parte aérea (A), nos grãos (B), nas raízes (C) e nas plantas (D) dos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, em condição de deficiência e suficiência de manganês na solução nutritiva. ⁽¹⁾Médias seguidas por letras minúsculas entre os cultivares, dentro de cada dose, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 5. Acúmulo relativo de Mn (A e C) e distribuição percentual de massa seca (B e D) nos cultivares de soja Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, em condição de deficiência e suficiência de Mn na solução nutritiva.

Portanto, evidencia-se que na condição de baixo suprimento de Mn na solução nutritiva o cultivar IAC-Foscarin 31 apresentou maior eficiência de absorção e maior acúmulo. Jiang (2006) relatou que a eficiência de absorção de Mn deve-se à grande habilidade em adquirir maior quantidade do nutriente em condição de escassez e conseqüentemente, obter maior acúmulo no tecido. Destacou também, que a eficiência relativa do cultivar de trigo “Maris Butler” está relacionada à maior absorção radicular que causa maior acúmulo, o que está de acordo com as evidências encontradas no presente estudo.

4.1.4 Comprimento e superfície total de raízes

A análise de variância revelou diferenças significativas ($P<0,01$) entre os cultivares, bem como interação significativa entre as doses de Mn e os cultivares de soja para o comprimento total de raízes ($P<0,01$) e superfície total de raízes ($P<0,05$) (Figura 6). Mais uma vez, estes resultados demonstram existir diferenças genotípicas significativas entre os três cultivares de soja.

Para o comprimento total de raízes, na menor dose de Mn o cultivar IAC-Foscarin 31 apresentou o menor valor (94,57 m/vaso), quando comparado com o cultivar IAC-15 (118,49 m/vaso) e Santa Rosa (148,97 m/vaso). Estes resultados correspondem a 31%, 31% e 37% do comprimento radicular máximo obtido como fornecimento da mais elevada dose de Mn, respectivamente, para IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa. Com o fornecimento da dose de Mn de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, os comprimentos totais de raízes dos cultivares IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa corresponderam, respectivamente, a 46%, 44% e 64% do mais elevado comprimento total radicular obtido com o fornecimento da dose de Mn de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para a superfície total de raízes os efeitos foram semelhantes, ou seja, a menor superfície radicular foi obtida pelo cultivar IAC-Foscarin 31 e na condição do mais baixo fornecimento de Mn na solução. Entretanto, a maior quantidade absorvida de Mn pelas plantas foi constatada no cultivar IAC-Foscarin 31 (0,749 mg/vaso) em relação aos cultivares IAC-15 (0,567 mg/vaso) e Santa Rosa (0,574 mg/vaso).

Figura 6. Comprimento total de raízes (A) e superfície total de raízes (B) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

Samal, Sadana e Gill (2003) constataram que as superfícies de raízes das plantas de *Triticum aestivum* (L.) e de *Brassica juncea* (L.) foram incrementadas mediante aumento das doses de Mn (0; 50 e 100 mg kg⁻¹ de terra). Verificaram também que a superfície radicular, aos 51 dias de cultivo e na dose mais baixa, correspondeu a 17 e 44% daquela produzida, respectivamente, por *T. aestivum* (L.) e *B. juncea* (L.) na mais elevada dose. O comprimento radicular destas plantas, também sofreu efeito significativo e positivo com a adição das doses de Mn, variando de 1.276 cm (testemunha) para 7.059 cm (dose de Mn de 100 mg kg⁻¹ de terra) em plantas de *T. aestivum* e de 3.645 cm (testemunha) para 7.821 cm (mais elevada dose de Mn) em plantas de *B. juncea* (SADANA; SAMAL; CLAASSEN, 2003).

Em parte, a área e o comprimento radicular podem indicar maior ou menor eficiência de aquisição de nutrientes. Porém, deve-se observar que as espécies vegetais diferem quanto ao tipo de sistema radicular, forma de aquisição de nutrientes (por exemplo: Fe – produção de fitosideróforos ou acidificação do meio) e adaptação ao ambiente. Deve-se atentar que, grande parte dos estudos envolvendo eficiência de uso de Mn foram desenvolvidos com gramíneas (monocotiledôneas), as quais apresentam algumas diferenças quanto aos atributos radiculares de dicotiledôneas. Muito da eficiência de absorção de Mn apresentada pelos cultivares

eficientes, tem sido atribuída principalmente à maior superfície e comprimento radicular. Este fato também é observado para o zinco em monocotiledôneas. Para o arroz, a variação na absorção de Zn foi explicada em parte (32%) pela superfície radicular e a variação na absorção e na translocação explicaram cerca de 53% da eficiência nutricional (GAO et al., 2005).

Embora, esses atributos morfológicos radiculares estejam relacionados à maior absorção de água e nutrientes, não são necessariamente determinantes para maior eficiência de absorção e conseqüente maior produção de grãos ou de massa seca. Portanto, a morfologia, geometria e a arquitetura de raízes, bem como o influxo de nutriente, baixo K_m e alto V_{max} , além de outros mecanismos como melhor utilização interna na folha (translocação - incremento na redistribuição do Mn) ou menor exigência, transporte à longa distância (da raiz para a parte aérea) podem conferir maior tolerância à deficiência. Entretanto, Sadana, Lata e Claassen (2002) e Sadana et al. (2005) atribuíram que a deficiência de Mn causa redução do crescimento radicular, sendo este efeito mais drásticos em cultivares de trigo ineficientes quanto ao uso do manganês, em relação aos cultivares mais eficientes, o que não foi confirmado no presente estudo (Figura 9).

4.1.5 Produção de massa seca da parte aérea, de raízes, massa seca total, relação parte aérea : raiz e produção de grãos e de pericarpos

A produção de massa seca da parte aérea, de raízes, e a de massa seca total, e a relação parte aérea : raiz dos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 foram influenciadas pelas doses de Mn fornecidas na solução nutritiva, exceto a relação parte aérea: raiz do cultivar Santa Rosa, a qual não apresentou significância para as doses do nutriente (Figura 7). A produção de massa seca de grãos e de pericarpos também foram influenciadas pelas doses de Mn, exceto, em ambas as variáveis-resposta, para o cultivar IAC-Foscarin 31 (Figura 8). Portanto, a análise de variância para a produção de massa seca da parte aérea, de raízes e para a produção de massa seca total, evidenciou-se diferenças significativas ($P<0,01$) entre os cultivares, bem como interação significativa ($P<0,05$) entre as doses de Mn e os cultivares de soja. Estes resultados demonstram que existem diferenças genotípicas significativas nos três cultivares.

No tratamento com a mais baixa dose de Mn, todos os cultivares apresentaram sintomas visuais de deficiência e o cultivar IAC-Foscarin 31 produziu 87% da maior produção de massa seca da parte aérea obtida com a dose de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que os cultivares IAC-15 e Santa Rosa produziram, respectivamente, 78% e 84% das mais elevadas produções,

também atingidas com o fornecimento da dose mais alta de Mn na solução (Figura 7A). As doses de Mn necessárias para atingir o ponto de produção máxima de massa seca da parte aérea para IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa foram, respectivamente, de 7,4; 8,2 e 11,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A produção de massa seca de raízes dos três cultivares de soja também foi influenciada pelas doses de Mn na solução, porém, na dose de Mn de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ os cultivares Santa Rosa e IAC-15 apresentaram incremento de produção, respectivamente, de 28 e 46% superior daquela apresentada pelo IAC-Foscarin 31, o que contribuiu para a redução da relação parte aérea : raiz (Figura 7D).

Na dose mais baixa de Mn, a produção média de massa seca de raízes dos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 correspondeu, respectivamente, à 68%, 51% e 75% da produção máxima obtida com o suprimento da dose de Mn de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Vale destacar que na condição de baixo fornecimento de Mn na solução nutritiva, o cultivar IAC-Foscarin 31 sofreu menor redução na produção de massa seca de raízes em relação aos demais cultivares. O efeito negativo da baixa disponibilidade de Mn na solução e, conseqüentemente, a menor produção de raízes das plantas indicou prioridade para a formação da parte aérea, podendo-se aventar como estratégia de aumento da aérea foliar e, assim, alocar fotoassimilados para o suprimento do sistema radicular.

Lima et al. (2005) constataram que os clones de eucalipto mais eficientes na absorção de K (alta taxa de absorção do nutriente por unidade de massa seca de raiz) apresentaram, também, alta relação parte aérea : raiz. Este fato pode ser comprovado, no presente estudo, comparando-se o comportamento da relação no cultivar IAC-Foscarin 31 aos demais cultivares (Figura 7D), como também, por meio dos resultados do experimento de cinética de absorção de Mn (Figura 11).

Figura 7. Produção de massa seca da parte aérea (A), de raízes (B), produção de massa seca total (C) e relação parte aérea : raiz (D) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31(△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

Em condição de baixa disponibilidade de Mn no substrato, a produção de massa seca e o comprimento do sistema radicular são reduzidos e podem estar associados à redução da alongação celular, além da paralização da formação de raízes laterais (SADANA; SAMAL; CLAASSEN, 2003). Lombnaes e Singh (2003a) constataram que em condição de baixa disponibilidade de Mn na solução nutritiva, a relação parte aérea : raiz de *Hordeum vulgare* (L.) e de *Avena sativa* (L.) sofreu incremento. Em contraste com a deficiência de Mn, a deficiência de Zn tem efeito contrário no comportamento desta relação. Em condição de deficiência de Zn as plantas de aveia e trigo apresentaram decréscimo na relação parte aérea : raiz (LOMBNAES; SINGH, 2003b). O comportamento desta relação é dependente tanto da espécie vegetal, quanto da deficiência mineral (MARSCHNER, 1995).

Na dose mais baixa de Mn, constatou-se diferença na produção de grãos do cultivar IAC-Foscarin 31, superior em 36 e 20%, respectivamente, ao IAC-15 e Santa Rosa (Figuras 8A e 9). O mesmo efeito foi observado para a produção de massa seca de pericarpos. Para a produção de grãos e de pericarpos dos cultivares IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa, os pontos de máxima produção foram obtidos com o Mn na solução, respectivamente, em 1,7; 7,3; 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 4,7; 6,7; 6,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Embora, não tenha sido observado efeito significativo das doses do nutriente para a produção de grãos da IAC-Foscarin 31, deve-se destacar a menor dose de Mn necessária para a máxima produção de grãos, em relação aos demais cultivares. Na dose de Mn de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a produção máxima de grãos do cultivar IAC-15 foi 10% superior daquela apresentada pelo cultivar Santa Rosa.

Mann et al. (2002), estudando os cultivares de soja Conquista e Garimpo submetidas à aplicação de Mn via solo e via foliar, observaram que a produção de sementes aumentou com o incremento do fornecimento do elemento, independente do cultivar e da forma de aplicação.

4.1.6 Índice de eficiência de produção de grãos (IEP)

O IAC-Foscarin 31 apresentou diferença no índice de eficiência de produção de grãos (IEP) em relação aos demais cultivares (Figura 9). Os índices calculados para IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa foram, respectivamente, de 1,41; 0,78 e 0,66, de modo que foram classificados com Mn-eficiente ($\text{IEP} > 1,0$) e Mn-pouco eficiente ($0,5 < \text{IEP} < 1,0$). O cultivar IAC-Foscarin 31 não apresentou resposta às doses de Mn fornecidas (somente diferença na produção média de grãos entre a mais baixa e a mais alta dose), porém, mostrou-se eficiente na utilização de Mn para a produção de grãos. Embora, existam diferenças quantos os valores de IEP entre os cultivares IAC-15 e Santa Rosa, estas diferenças não foram significativas.

Apesar de serem constatados menores valores absolutos para as produções de massa seca da parte aérea, de raízes, de massa seca total, de área e comprimento total de raízes do cultivar IAC-Foscarin 31 em relação aos demais cultivares, a produção de grãos pode ser a variável-resposta mais indicada para se estabelecer os critérios de eficiência de uso do nutriente (Mn) e, portanto, identificar o genótipo mais eficiente em condição de deficiência (baixa disponibilidade no substrato).

Jiang e Ireland (2005) relataram que, embora o cultivar de trigo “Maris Butler” apresentasse menor produção de massa seca em relação aos demais cultivares avaliados, em condição de suprimento adequado de Mn, apresentou maior produção em condição de baixa disponibilidade de Mn no solo. Em outro estudo conduzido em campo, cultivando-se *Hordeum vulgare* (L.) e em solo com baixo teor de Mn, Hebborn et al. (2005) verificaram diferenças genótípicas em alguns cultivares quanto à eficiência de uso de manganês para a produção de massa fresca e para a produção de grãos. Relataram que esta eficiência de uso (índice), baseada na produção de grãos, pode não estar associada à concentração de Mn nas folhas, na biomassa ou na absorção de Mn nos diferentes estágios de crescimento das plantas. Possivelmente, a eficiência nutricional esteja relacionada às eficiências de absorção e de uso do nutriente.

Moreira (1999), avaliando o índice de eficiência para a produção de massa seca das plantas de soja dos cultivares IAC 15-1, IAC-17, FT Estrela e DM Nobre em relação às doses de Mn, constatou que o cultivar DM Nobre (tolerante em solos parcialmente corrigidos e ou média fertilidade) apresentou o menor índice, necessitando de doses mais elevadas para obtenção do máximo de resposta na produção. Verificou, também, que os cultivares IAC-17 (exigente em fertilidade do solo) e IAC 15-1 (tolerante em solos parcialmente corrigidos e ou média fertilidade) mostraram ser mais eficientes no uso de Mn. Levando-se em consideração a eficiência de absorção de Mn, Moreira et al. (2003) constataram que o IAC 15-1 apresentou maior eficiência de absorção de Mn (menor K_m). Neste caso, pode-se confirmar que a eficiência nutricional deste genótipo deveu-se à eficiência de absorção, bem como à eficiência de uso do Mn.

Figura 8. Produção de massa seca de grãos (A) e de pericarpos (B) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

Figura 9. Produção média de massa seca de grãos dos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, crescidos em soluções nutritivas na mais baixa e mais elevada dose de Mn (A) e índice de eficiência de produção de grãos (IEP) (B).⁽¹⁾

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras distintas, maiúscula entre as doses e minúscula entre os cultivares, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O termo eficiência de absorção de manganês é utilizado para descrever o fenótipo que exibe acentuada tolerância à baixa disponibilidade de Mn no substrato/solo (GRAHAM, 1988). O genótipo eficiente é aquele que é capaz de crescer e produzir sem a adição de Mn (fertilizante) em solo com baixa disponibilidade do nutriente. O genótipo eficiente, não necessariamente, apresenta igual ou maior potencial de produção em relação aos genótipos ineficientes quando o Mn não é limitante. Porém, os programas de melhoramento genético e seleção de plantas buscam materiais eficientes e responsivos à aplicação de Mn (GRAHAM, 1988). Por outro lado, a eficiência de uso ou de utilização de Mn é definida como a capacidade de converter o nutriente absorvido em produto agrícola (folha, fruto, raiz, caule). A eficiência de utilização deve ser o resultado da interação positiva entre absorção, transporte, redistribuição e metabolismo (MALAVOLTA, 2006).

4.1.7 Cinética de absorção do Mn – K_m , C_{min} e $V_{máx}$

As plantas do cultivar IAC-Foscarin 31 absorveram uma quantidade de Mn significativamente maior em relação aos demais cultivares, sendo que esta diferença foi ampliada a partir das 10 horas de exposição das plantas nas soluções nutritivas (após o início dos tratamentos). Ao final do período de avaliação, constatou-se que a concentração de Mn na solução de exaustão do IAC-Foscarin 31 foi 74,5 e 45,5% menor quando comparada a aquelas dos cultivares Santa Rosa e IAC-15, respectivamente (Figura 10A), o que pode ser confirmado pela maior taxa de crescimento absoluto das raízes (Figura 10B). Observa-se na Figura 10B, que até, aproximadamente, 48 horas após o início dos tratamentos, a maior taxa de crescimento absoluto radicular foi obtida pelo IAC-Foscarin 31, seguido pelo IAC-15 e Santa Rosa. Sabe-se que, quanto maior a idade das plantas, menor é o influxo com base na massa seca, visto que o número de sítios de absorção por unidade de massa é menor (NYE; TINKER, 1977; JUNGK, 1996; REID, 1999).

Quanto ao influxo de Mn nas raízes dos três cultivares, constatou-se interação entre os cultivares de soja e as doses de Mn na solução, sugerindo que há diferenças genotípicas significativas entre os cultivares (Figura 11). Os valores médios de $V_{máx}$ para o IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa foram, respectivamente, de 0,67, 0,50 e 0,42 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$; enquanto que os respectivos valores de K_m foram de 0,45, 0,87 e de 1,02 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O parâmetro K_m do IAC-Foscarin 31 foi 56% e 48% menor, respectivamente, a aqueles apresentados pelos cultivares Santa Rosa e IAC-15, indicando maior afinidade pelo carregador do IAC-Foscarin 31 ao Mn. Esse comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 11, onde o influxo de Mn, em baixas concentrações, é maior.

Quanto à concentração mínima ($C_{\min}$), correspondente à concentração de Mn na solução, onde o influxo iguala-se ao efluxo (CLAASSEN; BARBER, 1974), ou seja o influxo líquido é igual à zero, os valores para os cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 foram, respectivamente, de 0,98; 0,55 e de 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, evidenciando a eficiência de absorção de Mn na seguinte seqüência: IAC-Foscarin 31 > IAC-15 > Santa Rosa. Estes resultados confirmam aqueles apresentados nas Figuras 7A e 9, em que as doses de Mn necessárias para atingir os pontos de produção máxima de massa seca da parte aérea e de grãos, do cultivar IAC-Foscarin 31 foram menores em relação às dos demais genótipos.

Na seleção e melhoramento genético de cultivares eficientes na absorção de nutrientes, tem-se procurado genótipos com baixos valores de K_m e altos valores de $V_{\max}$ (NIELSEN; BARBER, 1978). Os valores dos parâmetros cinéticos do presente estudo, entretanto, são menores quando comparados a aqueles relatados por Moreira et al. (2003) com plantas de soja e por Pedas et al. (2005), com plantas de *Hordeum vulgare* (L.).

Figura 10. Curvas de depleção de Mn pelos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△) (A), em função dos tempos de exposição das plantas a uma solução de cultivo contendo Mn na concentração de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e taxa de crescimento absoluto de raízes (mm/dia), em função do tempo de cultivo (B).

Figura 11. Influxos estimados de Mn nos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

4.2 Experimento 2 - tolerância ao excesso de Mn: transporte à longa distância, produção de massa seca e compartimentalização do Mn nas raízes

4.2.1 Sintomatologia de toxidez, concentrações e quantidades acumuladas de Mn nos cultivares de soja

A primeira manifestação de toxidez de Mn ocorreu nas folhas novas do cultivar IAC-15 mantidas em solução com a concentração de Mn de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ aos oito dias após o início dos tratamentos, seguida pelo cultivar Santa Rosa, também na mesma dose, em folhas novas e aos nove dias. Não foram constatadas anomalias visuais associadas à toxidez de Mn no cultivar IAC-Foscarin 31 durante todo o ciclo das plantas, o que indica tolerância ao excesso de Mn. Os sintomas visuais, no cultivar IAC-15, são apresentados na Figura 12 e correspondem ao início da manifestação e à fase mais severa (na dose de Mn de $250,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os sintomas, em ambos os cultivares, foram caracterizados pelo aparecimento de pontuações necróticas entre as nervuras das folhas novas, pela clorose foliar, aspecto de murcha, tamanho reduzido e má formação dos limbos foliares (retorcimento do limbo e das nervuras) com o avanço da toxicidade, o que estão de acordo com os relatos da literatura.

Figura 12. Toxidez de Mn manifestada a partir do oitavo dia após início do tratamento, considerando a dose de Mn de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (a) e em fase mais avançada ($250,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) (b), no cultivar IAC-15, e trifólio sem sintoma (c) – sadio, dose de Mn de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Os valores médios das concentrações de Mn nestas folhas do IAC-15 e Santa Rosa, ao final do experimento, foram de 1.000,0 mg kg⁻¹ e de 33,0 mg kg⁻¹, respectivamente, para as doses de Mn de 200,0 e 2,0 µmol L⁻¹. Estes valores estão próximos a aqueles relatados por Fageria (2001), o qual atribuiu concentrações no tecido vegetal, respectivamente, de 67 e 720 mg kg⁻¹, como teores adequado e tóxico para plantas de soja. Lima et al. (2004) relataram valores de concentrações de Mn de até 1.800,0 mg kg⁻¹, na parte aérea de plantas de soja (Emgopa 316) cultivadas em solos com altos teores do elemento. Portanto, pode-se associar esta variação, entre os valores relatados com os do presente estudo, às diferenças genótípicas quanto à absorção e ao uso do manganês pelas plantas de soja.

A análise de variância das concentrações de Mn nas partes das plantas, revelou significância ($P < 0,01$) para a interação entre os cultivares de soja e as doses de Mn, sendo este efeito representado pelo modelo quadrático de regressão (Figura 13). Somente, as concentrações de Mn nas folhas inferiores do cultivar IAC-15 apresentaram significância para o componente linear da regressão.

Na avaliação dos teores de Mn nos tecidos vegetais, considerando as doses de Mn na solução nutritiva, evidencia-se, portanto, comportamento diferenciado entre os cultivares. No IAC-15, com o aumento da concentração de Mn na solução nutritiva de 100,0 para 250,0 µmol L⁻¹, foram constatados maiores teores de Mn nos pericarpos (exceto na dose mais elevada), nos grãos, nas folhas superiores e inferiores, apresentando-se com relação de elevada sensibilidade ao excesso (sintomas visuais de toxidez mais acentuados), embora, não ter se traduzido em menor produção de massa seca de grãos e de plantas (Figuras 17A e E). Por outro lado, IAC-Foscarin 31, que não manifestou sintoma visual de toxidez, de modo geral, exibiu menor concentração de Mn nos grãos, pericarpos, folhas e caules. Pode-se observar, entretanto, maior absorção nas raízes. Dessa forma, o IAC-Foscarin 31 parece ter um mecanismo de regulação que limita a redistribuição de Mn para a parte aérea, quando o nutriente encontra-se em níveis excessivos ou tóxicos.

Constatou-se incremento no acúmulo de Mn na parte aérea do IAC-15, com o aumento do nível de Mn na solução. Para os demais cultivares, esses valores permaneceram constantes. Na maior dose de Mn na solução nutritiva, as raízes do cultivar IAC-Foscarin 31 acumularam 2,70 mg/vaso, enquanto que para IAC-15 e Santa Rosa estes valores foram de 2,33 e 2,02 mg/vaso, respectivamente. Entretanto, não diferiram significativamente ($P > 0,05$). Na mesma condição e para a parte aérea, estes valores foram de 21; de 43 e de 14 mg/vaso, respectivamente, para IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa e corresponderam a 91; 95 e 87% do total absorvido pelas plantas. O menor acúmulo de Mn observado na parte aérea do

cultivar Santa Rosa é explicado pelo menor crescimento e produção de massa seca, em relação aos demais cultivares (Figura 17C).

Edwards e Asher (1982) observaram que há mecanismos de tolerância ao Mn em plantas de soja. No primeiro, a planta absorve bastante Mn, porém, sem prejuízos ao crescimento e sendo atribuído à tolerância interna ao elemento. No segundo, a planta controla a absorção radicular, não permitindo o transporte à longa distância. No presente estudo, o cultivar IAC-Foscarin 31 foi bastante tolerante, sugerindo que o segundo mecanismo de tolerância esteja envolvido, o que está de acordo com os relatos de Mascarenhas et al. (1990).

Figura 13. Concentração de Mn nos grãos (A), nos pericarpos (B), nas folhas superiores (C), nas folhas inferiores (D), nos caules (E) e nas raízes (F) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

4.2.2 Concentrações de N, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn nas folhas superiores e inferiores dos cultivares de soja

As concentrações de N, K, Ca, Mg, Cu, Fe e Zn e as relações Fe : Mn nas folhas superiores e inferiores dos três cultivares de soja, desenvolvidos em solução nutritiva com doses de Mn, são observadas nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

As concentrações de N nas folhas superiores aumentaram conforme o incremento das concentrações de Mn na solução nutritiva. Considerando-se a mais baixa dose de Mn (tratamento controle), a concentração de N no tecido da soja IAC-Foscarin 31 foi 40% e 33% superior em relação a aquelas dos cultivares Santa Rosa e IAC-15, respectivamente. Entretanto, a partir da dose de Mn de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, as concentrações de N nestas folhas do cultivar Santa Rosa foram superiores em relação às dos demais cultivares. Pode-se associar este fenômeno ao efeito de concentração do nitrogênio, considerando-se a menor produção de massa seca das plantas. Por outro lado, as menores concentrações de N observadas no IAC-15 devem-se ao efeito de diluição, em função da maior produção de massa seca da parte aérea (Figura 17C). Com relação às concentrações nas folhas inferiores, o comportamento foi diferenciado, exceto para o cultivar Santa Rosa. Para o IAC-Foscarin 31, constatou-se redução nos valores de concentração, mais acentuadamente, a partir da dose de Mn de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que para o IAC-15 na dose de $150,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. De modo geral, as concentrações de N das folhas inferiores foram menores em relação às das folhas superiores, o que indica a alta mobilidade do N quanto à redistribuição.

As concentrações de potássio nas folhas superiores e inferiores dos três cultivares de soja sofreram comportamento semelhante às concentrações de nitrogênio nos tecidos. Os efeitos de diluição, no cultivar IAC-15, e de concentração, no cultivar Santa Rosa, também são explicados pela maior e menor produção de massa seca, respectivamente. Os menores valores das concentrações de K nas folhas inferiores, quando comparados aos das folhas superiores, são atribuídos à alta mobilidade do íon K^+ quanto à redistribuição na planta (MARSCHNER, 1995; MENGEL; KIRKBY, 2001; MALAVOLTA, 2006). De modo geral, as concentrações de K e Ca nas folhas inferiores do cultivar IAC-Foscarin 31 (Figuras 15B e C) foram superiores às daquelas dos demais cultivares, o que pode estar associado à maior tolerância interna ao excesso de Mn. Constatou-se interação entre as doses de Mn e os cultivares de soja para a concentração de cálcio nas folhas inferiores. As concentração de Ca nas folhas superiores foram significativamente ($P < 0,05$) influenciadas pelas doses de Mn, somente para o cultivar Santa Rosa. Para os cultivares IAC-15 e IAC-Foscarin 31, manteve-se

constante com as doses de Mn, variando, respectivamente, de 11,38 a 11,51 g kg⁻¹ e de 12,25 a 13,20 g kg⁻¹. Para as concentrações de Mg nas folhas superiores e inferiores, verificou-se efeito negativo das doses de Mn nos cultivares Santa Rosa e IAC-Foscarin 31. Nas folhas superiores do cultivar IAC-15, os valores das concentrações variaram de 16,39 a 14,06 g kg⁻¹ e de 20,08 a 14,43 g kg⁻¹ nas folhas inferiores, com o aumento das doses de Mn. Estes resultados estão em concordância com aqueles relatados por Mascarenhas, Camargo e Falivene (1984) e por Mascarenhas et al. (1982,1990).

As concentrações de cobre e de zinco nas folhas superiores dos três cultivares aumentaram em função das doses de Mn na solução, diferentemente do que ocorreu nas folhas inferiores. Nestas últimas, os menores teores de Cu foram observados a partir da dose de Mn de 100,0 µmol L⁻¹, particularmente no IAC-Foscarin 31, ocorrendo o mesmo efeito para as concentrações de Zn, a partir da dose de Mn de 150,0 µmol L⁻¹. Não foi constatado efeito das doses de Mn na concentração de Zn nas folhas inferiores do cultivar IAC-15. Moreira (1999) relatou redução nos teores de Zn, nas folhas utilizadas para a diagnose em plantas de soja, com o aumento do fornecimento do Mn na solução nutritiva, como causa da inibição na absorção. O efeito interiônico entre Mn e Cu é relatado por Malavolta (1994), Kabata-Pendias e Pendias (2001) e por Lombnaes e Singh (2003a).

Constatou-se interação entre as doses de Mn e os cultivares de soja para as concentrações de ferro nas folhas superiores. Entretanto, os teores de Fe nas folhas inferiores foram influenciados ($P < 0,01$) pelo incremento das doses de Mn, somente, para os cultivares IAC-15 e IAC-Foscarin 31. Não foram observados sintomas visuais de deficiência de Fe induzida pelo excesso de Mn na solução, durante todo o ciclo de crescimento das plantas. A relação Fe : Mn, tanto nas folhas superiores quanto nas folhas inferiores, decresceu com o aumento das doses de Mn, variando, nas folhas superiores e inferiores, respectivamente, de 1,80 a 0,11 e de 1,77 a 0,11, da mais baixa para a mais alta dose de Mn, evidenciando a inibição competitiva pelos mesmos sítios de absorção (MORONI; SCOTT; WRATTEN, 2003). Porém, não foi observada diferença significativa entre os cultivares.

Figura 14. Concentração de N (A), de K (B), de Ca (C), de Mg (D), de Cu (E), de Fe (F), de Zn (G) e relação Fe :Mn – média dos cultivares - (H), nas folhas superiores dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

Figura 15. Concentração de N (A), de K (B), de Ca (C), de Mg (D), de Cu (E), de Fe (F), de Zn (G) e relação Fe : Mn – média dos cultivares - (H), nas folhas inferiores dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

4.2.3 Comprimento e superfície total de raízes

Na análise de variância para a superfície e comprimento total de raízes por vaso das plantas de soja, observou-se significância ($P < 0,01$) para a interação entre as doses de Mn e os cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31 (Figura 16). Estes resultados evidenciam a existência de diferenças genotípicas significativas entre os três cultivares de soja.

As raízes dos cultivares IAC-15 e IAC-Foscarin 31, a partir da dose de Mn de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentaram coloração escura, enquanto aquelas da Santa Rosa, eram claras. As raízes eram muito finas e a raiz pivotante não era bem identificada. Alam, Kamei e Kawai (2001) relatam que as plantas de *Hordeum vulgare* (L.) cultivadas em solução nutritiva, com excesso de Mn, apresentaram raízes com coloração escura (marrom), atribuindo possível deposição de óxido de Mn e compostos fenólicos como causa do escurecimento. No estudo da superfície total de raízes verificou-se, por meio das equações polinomiais de regressão, que as doses de Mn necessárias para as mínimas superfícies de raízes seriam de $268 \mu\text{mol L}^{-1}$, $204 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $437 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para os cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31. Este fato realça a maior tolerância do IAC-Foscarin 31 ao excesso de Mn na solução nutritiva.

Figura 16. Superfície total (A) e comprimento total de raízes (B) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

O comprimento total de raízes das plantas sofreu efeito semelhante ao da superfície radicular com o aumento das doses de Mn. As doses de Mn correspondentes aos menores comprimentos foram de $266 \mu\text{mol L}^{-1}$, $201 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $424 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, para os cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31. Com o aumento do suprimento de Mn na solução, da mais baixa para a mais alta dose, nos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, constatou-se redução no comprimento total de raízes, respectivamente, de 81, 69 e 64%.

Observando estes resultados e comparando com aqueles do Experimento 1, pode-se atribuir ao sistema radicular do IAC-Foscarin 31 maior capacidade de absorver Mn em condição de baixa disponibilidade no substrato (maior eficiência de absorção), bem como a maior capacidade de acúmulo do Mn em excesso, evitando a redistribuição para a parte aérea. Rout, Samantaray e Das (2001) relataram que os genótipos de *Vigna radiata* e de *Oryza sativa*, tolerantes ao excesso de Mn na solução nutritiva, exibiram raízes mais desenvolvidas quando comparadas às plantas menos tolerantes. Estes autores também constataram maior acúmulo de Mn nas raízes dos genótipos tolerantes, concluindo que a ligação do metal às matrizes pécticas das paredes celulares; a ativação de ATP-ases nas membranas “carregando” o metal para os vacúolos; a complexação com ácidos orgânicos e possível ligação com proteínas específicas, bem como alterações nas estruturas das membranas podem conferir estratégias eficientes para a tolerância ao metal. A afinidade de transportadores, localizados nas membranas dos vacúolos, aos elementos como Fe, Mn e Zn e o seu efeito na manutenção do metabolismo no citosol tem sido discutida recentemente (KORSHUNOVA et al., 1999; EGUEZ et al., 2004; MARTINOIA; MAESHINA; NEUHAUS, 2007).

A tolerância ao Mn, bem como de outros metais pesados em diversas espécies vegetais, tem sido atribuída ao poder de retenção da quantidade excessiva nas raízes. Esta capacidade depende, em parte, da formação de complexos no sistema radicular. Por sua vez, estes complexos (quelados) podem apresentar diferenças quanto à mobilidade das raízes para a parte aérea. Metais com elevada eletronegatividade, como o Cu e Co, formam complexos estáveis nas raízes e são acumulados nesta parte das plantas. Por outro lado, elementos com baixa eletronegatividade, como o Mn e Zn, são facilmente transportados à longa distância (HORIGUCHI, 1987).

4.2.4 Produção de massa seca da parte aérea, de raízes, massa seca total, relação parte aérea : raiz e produção de grãos e de pericarpos

Os dados das produções de massa seca e da relação parte aérea:raiz (relação entre a massa seca de parte aérea e massa seca de raízes) são apresentados na Figura 17. Constataram-se interações significativas ($P < 0,01$) entre as doses de Mn e os cultivares de soja para a produção de massa seca de grãos e de pericarpos, massa seca da parte aérea (folhas superiores, folhas inferiores e caule) e de raízes, bem como para a produção de massa seca total. Entretanto, ocorreu efeito significativo ($P < 0,01$) das doses de Mn para a relação parte aérea:raiz, somente, nos cultivares Santa Rosa e IAC-15.

Verifica-se, de modo geral, que o cultivar IAC-15 e em todas as doses de Mn, apresentou as maiores produções de massa seca quando comparado aos demais cultivares, exceto para a produção de massa seca de raízes, na qual o IAC-Foscarin 31 foi superior. Na dose mais alta de Mn, constatou-se diferença na produção de grãos do cultivar IAC-15, superior em 64 e 54%, respectivamente, ao Santa Rosa e IAC-Foscarin 31. O mesmo efeito foi observado para a produção de massa seca de pericarpos, da parte aérea e total. Quanto à produção de massa seca de raízes, o cultivar IAC-Foscarin 31 apresentou os maiores valores em todos os níveis de suprimento de Mn na solução, exceto na dose de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para todas as plantas, a partir da dose de Mn de $100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, ocorreu uma diminuição na contribuição de massa seca da raiz pivotante para a massa seca total de raízes. Nesta condição, todas as raízes eram finas e frágeis e não foram diferenciadas, como discutidas em 4.2.3.

Com o aumento do suprimento de Mn na solução nutritiva, da mais baixa para a mais alta dose, constatou-se redução na produção de massa seca do sistema radicular dos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, respectivamente, de 65, 54 e 50%, realçando a maior tolerância do IAC-Foscarin 31 ao excesso de Mn, para este atributo produtivo. Para a parte aérea estas reduções foram de 41, 40 e 51%, o que promoveu efeito diferenciado na relação parte aérea:raiz entre os cultivares (Figura 17F). Verifica-se, portanto, maior equilíbrio funcional entre a relação parte aérea : raiz no IAC-Foscarin 31, em todas as doses de Mn empregadas no estudo, o que pode indicar maior estratégia de adaptação ao estresse nutricional – excesso de Mn. Pode-se inferir, portanto, que este equilíbrio de alocação e partição de carbono entre parte aérea e raízes exerça papel determinante no transporte de água e nutrientes à longa distância e de compostos orgânicos (como hormônios e carboidratos) da parte aérea para as raízes.

Figura 17. Produção de massa seca de grãos (A), de pericarpos (B), produção de massa seca da parte aérea(C), de raízes (D), produção de massa seca total (E) e relação parte aérea : raiz (F) dos cultivares Santa Rosa (●), IAC-15 (○) e IAC-Foscarin 31 (△), em função das doses de Mn na solução nutritiva.

Rout, Samantaray e Das (2001) constaram aumento da relação parte aérea : raiz nas plantas de *Vigna radiata* e *Oryza sativa*, com o incremento da concentração de Mn na solução de 2,0 para 284,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O crescimento radicular é reduzido, ou afetado, em condição de excesso de Mn no substrato, devido, possivelmente, ao efeito do metal na redução do conteúdo de proteínas (ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2001). Wang, Evangelou e Ashraf (2003) atribuíram as diferenças de absorção de Mn e às características das paredes celulares dos genótipos de *Nicotiana tabaccum*, destacando que houve diferenças quanto ao conteúdo de polissacarídeos e proteínas no genótipo sensível e tolerante, e entre a condição de deficiência e excesso de Mn na solução nutritiva. Tanto em condição de deficiência quanto de toxidez, houve decréscimo na concentração de ácido urônico em ambos os genótipos. Entretanto, foi observado menor decréscimo para o genótipo tolerante.

A toxidez de manganês em plantas é uma desordem nutricional e que muitas vezes não é, claramente, identificada. Por sua vez, pode ser resultado de complexas interações do Mn com outros elementos (nutrientes como o K, Ca e Fe; elemento benéfico, como o Si) e com alguns fatores ambientais. Os mecanismos de tolerância vegetal ao excesso do metal dependem da taxa de crescimento das plantas (taxa de crescimento absoluto de raízes, por exemplo), tamanho das células e, particularmente, do vacúolo, o qual é o principal local de acúmulo do Mn. Estes mecanismos, por sua vez, envolvem rotas bioquímicas as quais diferem tanto entre as espécies quanto entre as variedades/cultivares. A toxidez de Mn está associada ao aumento da absorção pelas raízes, rápido transporte para a parte aérea e, posteriormente, acúmulo localizado na forma de óxido de Mn, resultando em pontuações marrons nas folhas, como observadas nos cultivares Santa Rosa e IAC-15. Esta anomalia também é atribuída ao acúmulo de compostos fenólicos no tecido (coloração resultante do contato da peroxidase com substratos facilmente oxidados, como o ácido clorogênico e caféico), como causa da menor atividade de enzimas antioxidativas, como a catalase, superóxido dismutase e peroxidase, por exemplo, sabidamente, nos genótipos suscetíveis. Por outro lado, os genótipos mais tolerantes ao excesso ou toxidez, apresentam restrição na absorção ou transporte à longa distância, ou ainda, têm a habilidade de tolerar elevadas concentrações de Mn nos tecidos. Esta tolerância interna está diretamente relacionada à nutrição em P, K, Ca, Mg ou Fe, bem como a distribuição mais homogênea do Mn na parte aérea. A retenção do excesso de Mn e a compartimentalização deste metal nas raízes, como verificada no IAC-Foscarin 31, impedindo o transporte e a redistribuição, também são fenômenos determinantes na tolerância. O escurecimento das raízes, principalmente, naqueles genótipos mais tolerantes ao excesso de Mn, tem sido atribuído ao acúmulo de óxido de Mn, sendo considerado como outro mecanismo de tolerância (BAKER, 1981; DEMIREVSKA-KEPOVA et al., 2004; EL-JAOUAL; COX, 1998; Horiguchi, 1987; Horst, 1983; Marschner, 1991).

A identificação de mecanismos de controle genético para a tolerância ao Mn deve ser combinada com outras características desejáveis (mecanismos bioquímicos) produzindo plantas melhores adaptadas aos elevados teores de Mn no substrato, contribuindo, deste modo, para a melhoria das práticas agrícolas como a: fertilização, calagem, manejo da matéria orgânica e drenagem de áreas alagadas.

4.2.5 Compartimentalização do Mn nas raízes dos cultivares de soja

As absorções totais de Mn, simplasto e apoplasto são apresentadas na Tabela 3. Comparando-se os cultivares de soja na dose de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, constata-se que o IAC-15 apresentou a maior absorção total de Mn com significativa contribuição da absorção no simplasto. A fração adsorvida de Mn no apoplasto do IAC-15 foi significativamente maior em relação ao Santa Rosa e IAC-Foscarin, os quais não diferiram entre si. Com a elevação da concentração de Mn na solução nutritiva, a quantidade total de Mn absorvida pelo IAC-Foscarin 31 aumentou em 49%, enquanto que no cultivar Santa Rosa este incremento correspondeu a 60%, diferentemente do IAC-15, no qual ocorreu redução na absorção total e no apoplasto. Possivelmente, este efeito possa ser explicado pela menor taxa de crescimento absoluto de raízes, como observado na Figura 10B. Observou-se na mais alta dose de Mn, que a absorção do nutriente no simplasto correspondeu a cerca de 63% nos cultivares IAC-Foscarin 31 e Santa Rosa e em torno de 98% no IAC-15. Pode-se inferir, portanto, que este efeito represente uma das causas para a manifestação inicial dos sintomas de toxidez, em relação aos demais cultivares.

Tabela 3 – Absorção total de Mn, no simplasto e apoplasto pelos cultivares de soja Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, expostas em duas concentrações de Mn na solução nutritiva, após 48 horas.

Mn $\mu\text{mol L}^{-1}$	Mn total			Mn simplasto			Mn apoplasto		
	Santa	IAC-15	IAC-31	Santa	IAC-15	IAC-31	Santa	IAC-15	IAC-31
	mg kg ⁻¹								
2,0	36,5 bC	77, 6aA	68,2 bB	28,9 bB	61,9 bA	60,3 bA	7,6 bB	15,7 aA	7,9 bB
250,0	91,3 aB	67,3 bB	134,8 aA	58,5 aB	66,2 aB	83,5 aA	32,8 aA	1,1 bB	51,3 aA
CV (%)	1,02	0,70	15,59	2,26	1,46	5,34	7,70	5,47	41,63
DMS	1,99	1,74	55,58	3,48	3,29	13,50	5,46	1,62	43,24

⁽¹⁾Médias seguidas por letras distintas, minúscula entre as doses e maiúscula entre os cultivares, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Experimento 3: estudos anatômicos e ultraestruturais de lâminas foliares e de raízes

4.3.1 Anatomia de lâminas foliares – microscopia eletrônica de varredura

Os cultivares Santa Rosa e IAC-15 exibiram sintomas visuais de deficiência de Mn aos doze dias após o início dos tratamentos, enquanto que o cultivar IAC-Foscarin 31 manifestou-os três dias após daqueles apresentados pelos demais cultivares. Para a condição de excesso de Mn na solução nutritiva, os sintomas visuais de toxidez foram constatados, somente, nos cultivares Santa Rosa e IAC-15, seis dias após a adição do nutriente na solução ($200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$).

As observações efetuadas por meio da microscopia eletrônica de varredura, nas seções das folhas que apresentaram manifestação de deficiência de Mn, revelaram que nos cultivares IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa ocorreram certo grau de desorganização e pouca alteração na epiderme (face abaxial e adaxial), evidenciando porém, estômatos mais fechados (orifício estomático) e oblongos em relação àqueles observados em condição de suprimento adequado ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Na condição de fornecimento mais elevado de Mn ($200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), verificaram-se alterações na epiderme e aglomeração do tecido foliar, bem como hipertrofia epidérmica nos três cultivares. Para os três cultivares e independente das doses de Mn, não foram verificadas reduções no tamanho, bem como no número de estômatos localizados, tanto na face adaxial quanto na abaxial (Figura 18), o que está de acordo com as observações de Weiland; Noble e Crang (1975) e de Baldisserotto et al. (2004). Entretanto, Lidon (2002) constatou, em plantas de *Oryza sativa* (L.) cv. Safari e mantidas em solução nutritiva com as doses de Mn de 2,4; 145,0 e 582,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que o tamanho dos estômatos se reduziu em 50% com o fornecimento das duas mais altas doses. O autor concluiu que a redução foi associada ao controle fisiológico das plantas de arroz, como mecanismo responsável pelo menor transporte do Mn à longa distância.

Pode-se sugerir neste estudo que, na condição de excesso de Mn os três cultivares, não necessariamente, desenvolveram certa tolerância interna (simplasto) preservando a atividade fotossintética das folhas, os estômatos, bem como teriam ativado mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo – ativação de enzimas como a catalase, Mn-superóxido dismutase, glutathione peroxidase (LIDON; TEIXEIRA, 2000). Entretanto, as observações efetuadas por meio da microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 21, 22 e 23) revelaram alterações ultraestruturais nas células do mesófilo dos limbos foliares da soja Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31. Embora, as coletas das folhas tenham sido realizadas no momento inicial das

manifestações dos sintomas (deficiência e toxidez), estas anomalias não se traduziram em completa desorganização da epiderme (face abaxial e adaxial), como nos Experimentos 1 e 2, nos quais as plantas foram mantidas até o final do ciclo.

Segundo Malavolta (1994) e Malavolta, Vitti e Oliveira (1997) a manifestação externa de anormalidade provocada pela toxidez de qualquer elemento, essencial ou não, é o resultado de uma cadeia de acontecimentos que começa com uma alteração ao nível molecular, continua com modificação subcelular que, por sua vez, conduz a uma alteração celular a qual, finalmente, resulta em modificação no tecido, o sintoma. A deficiência de qualquer nutriente também pode desencadear esta série de eventos, até o surgimento do sintoma visual.

Figura 18. Microscopia eletrônica de varredura (x 500) de lâminas foliares dos cultivares Santa Rosa (1), IAC-15 (2) e IAC-Foscarin 31 (3), em função das doses de Mn de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A), $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B) e de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (C) na solução nutritiva, exibindo os estômatos indicados pelas setas (a escala das fotografias tem valor de $20 \mu\text{m}$).

4.3.2 Anatomia de lâminas foliares e de raízes – microscopia óptica

As observações efetuadas por meio da microscopia de luz (óptica) permitiram identificar diferenças estruturais nos mesófilos foliares dos três cultivares de soja, considerando as doses de Mn (Figura 19). Na mais baixa dose de Mn, as seções transversais das lâminas foliares dos cultivares Santa Rosa e IAC-Foscarin 31 exibiram várias camadas de células do mesófilo, não sendo fácil a distinção entre parênquima paliçádico e lacunoso (Figuras 19 1A e 3A). Ambas as células apresentavam-se de forma larga e arredondada. Entretanto, estas camadas foram claramente distintas no cultivar IAC-15, uma vez que as células do parênquima paliçádico se apresentaram delgadas (Figura 19 2A). Notou-se, também, que na condição de deficiência de Mn houve redução no número de cloroplastos, particularmente no tecido paliçádico, quando comparado ao tratamento controle (dose de Mn de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Este efeito foi mais drástico no cultivar IAC-15. Weiland, Noble e Crang (1975) relataram diferenças significativas no número de cloroplastos por células do parênquima paliçádico de plantas de soja, variando de seis, na condição de deficiência, para nove cloroplastos por célula em plantas bem supridas. Esta redução também foi verificada nas células do parênquima lacunoso. O efeito primário da deficiência de Mn em folhas de pecan (*Carya illinoensis* C. Koch.) foi a redução do número de cloroplastos nas células do mesófilo, entretanto, o conteúdo de Mn dos cloroplastos permaneceu igual em relação daquele do tratamento controle, sem dano ao fotossistema II (PSII) (HENRIQUES, 2004).

Os parênquimas paliçádico e lacunoso, dos três cultivares de soja desenvolvidos na solução com a concentração de Mn de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, distribuíram-se no mesófilo, sendo possível a identificação de duas camadas de células no parênquima paliçádico, na face superior da lâmina, e uma camada de células no lacunoso, na face inferior. As células do mesófilo apresentaram tamanhos e conformações normais, com os cloroplastos evidentes e distribuídos por toda a célula.

Na dose de Mn de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, os cloroplastos dos cultivares Santa Rosa e IAC-15 concentraram-se na parte inferior da célula parenquimática (notadamente no tecido paliçádico), resultando em grande área de citoplasma e de vacúolo. A presença de maior número de grãos de amido, bem como o maior tamanho dos plastoglóbulos no cultivar IAC-Foscarin 31 (Figura 23), pode ter contribuído para a menor expansão dos vacúolos e citoplasma, em função do aumento do tamanho dos cloroplastos. Aparentemente, não houve redução do número de cloroplastos nos três cultivares, diferentemente do que foi relatado por Santandrea, Schiff e Bennici (1998), que observaram menor número de cloroplastos nas

células do mesófilo de *Nicotiana tabacum* (L.) mantidas em solução com Mn em 2.000 e 5.000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Doses estas bem superiores a aquelas do presente estudo.

Diante desses resultados, pode-se fazer a seguinte indagação: a menor extensão dos vacúolos no IAC-Foscarin 31 poderá influenciar no acúmulo do Mn em excesso, ou ainda, se as células do parênquima paliçádico (maior número de cloroplastos) têm a capacidade de “armazenar” o Mn em excesso? Em estudo com quatro espécies florestais e hiperacumuladoras de Mn, *Gossia bidwillii*, *Virotia neurophylla*, *Macadamia integrifolia* e *Macadamia tetraphylla*, Fernando et al. (2006a,b) sugeriram que o acúmulo foliar do excesso de Mn ocorre pela residência do nutriente nas células do mesófilo do parênquima paliçádico (tecido fotossinteticamente ativo), como um padrão de comportamento nestas plantas acumuladoras, diferentemente de como ocorre com o Cu e o Ni, os quais são acumulados nos tecidos da epiderme (tricomas) e no vacúolo (ARRU et al., 2004; BROADHURST et al., 2004) e com o Zn e Cd, acumulados nos vacúolos das células do mesófilo lacunoso e apoplasto (KÜPPER; ZHAO; McGRATH, 1999; DI TOPPI et al., 2005). O acúmulo do Mn na forma de cristais de oxalato é discutido (GONZÁLEZ; LYNCH, 1999).

As observações nas seções transversais das raízes permitiram quantificar o diâmetro médio radicular dos três cultivares de soja (Tabela 4). Verificaram-se incrementos no diâmetro radicular do cultivar IAC-15 de 63 e de 116%, com o aumento do suprimento de Mn na solução, da mais baixa para a mais alta dose, respectivamente. Este efeito não foi tão evidente para os demais cultivares. Marcar e Graham (1987) relataram não haver variação no diâmetro médio radicular entre os genótipos de trigo, cevada, tritcale e azevém, bem como para as doses de Mn de 0 e de 40 mg kg^{-1} de solo. Abbott (1967) relatou que a deficiência de Mn nas plantas provocou paralisação do crescimento de raízes laterais, como também incrementou o número de pequenas células sem vacúolos nestas raízes. O aumento do diâmetro radicular, ou seja, o espessamento das raízes pode ter como causa a suberização e lignificação das células do córtex, reduzindo, portanto, a absorção de água e nutrientes.

Tabela 4 – Diâmetro médio radicular (mm) dos cultivares de soja Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, considerando as doses de Mn de 0,5; 2,0 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva.

Doses de Mn ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Cultivares		
	Santa Rosa	IAC-15	IAC-Foscarin 31
	----- mm -----		
0,5	0,30	0,32	0,30
2,0	0,29	0,52	0,32
200,0	0,35	0,69	0,35

No tratamento com a dose de Mn de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, constatou-se certa desorganização dos vasos do xilema (metaxilema e protoxilema) nos cultivares Santa Rosa e IAC-15, indicando incompleta diferenciação destes vasos, bem como das células do cilindro vascular (Figuras 20 1A e 2A), quando comparados ao IAC-Foscarin 31 (Figura 20 3A) e ao tratamento controle, 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figuras 20 1B e 2B). Nos cultivares Santa Rosa e IAC-15, cultivados com a mais baixa dose, o número de vasos de xilema foi maior em relação ao IAC-Foscarin 31, o que pode ser explicado como possível compensação à condição de baixa disponibilidade do nutriente no substrato. Aparentemente, não ocorreu nenhuma alteração na diferenciação das células do córtex (parênquima cortical), da epiderme, exoderme e endoderme. Entretanto, as plantas do IAC-Foscarin 31, no tratamento controle, apresentaram elevado número de vasos de xilema, notadamente os metaxilemas, em relação daqueles dos cultivares IAC-15 e Santa Rosa.

Quando o Mn foi suprido na dose de 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se desorganização dos vasos de xilema, principalmente no cultivar Santa Rosa. Foi verificado, também, maior número de elementos de metaxilema. No IAC-Foscarin 31, não ocorreu esta predominância de metaxilema, sendo observado, apenas, elementos de protoxilema dispostos de maneira ordenada e transversalmente ao longo do cilindro central – medula (Figura 20 3C). Para o IAC-15, observou-se tanto a presença de metaxilema (três vasos) quanto a de protoxilema (três feixes com quatro vasos, em média). A organização e ordenação dos vasos condutores, bem como a integridade das células corticais exercem papel fundamental nos processos de absorção e transporte do nutriente. Se por um lado o arranjo organizado dos vasos condutores pode influenciar na eficiência de absorção, na condição de baixa disponibilidade, por outro lado, na condição de excesso de Mn no substrato, a manutenção da integridade das células da

epiderme, exoderme, endoderme e córtex pode conferir maior compartimentalização do Mn na raiz, e assim, reduzir o transporte de Mn à longa distância.

Os efeitos deletérios da toxidez de Mn em muitas espécies têm sido estudados, principalmente, considerando-se os aspectos: morfológicos e anatômicos, de ultraestrutura e bioquímicos da parte aérea das plantas, particularmente, onde os sintomas de toxidez são manifestados: as folhas. Entretanto, há escassez de trabalhos abordando os efeitos tóxicos do Mn nas células de raízes (SANTANDREA; TANI; BENNICI, 1998; SANTANDREA; SCHIFF; BENNICI, 1998; DUCIC et al., 2006).

Santandrea, Tani e Bennici (1998) relataram que as plantas tolerantes ao excesso de Mn ($5.000,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) exibiram maior número de elementos de xilema (protoxilema e metaxilema), com paredes lignificadas, em relação às plantas do tratamento controle ($100,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Concluíram, também, que no tratamento controle, as raízes exibiram apenas os elementos de protoxilema. Segundo Costa et al. (2003), durante o desenvolvimento do vegetal, distinguem-se duas categorias de xilema primário: o protoxilema e o metaxilema. O protoxilema é constituído de células condutoras que se diferenciam primeiro, ou seja, adquirem paredes secundárias lignificadas precocemente, e, normalmente, apresentam menor diâmetro. O metaxilema é composto de células condutoras que se diferenciam tardiamente e, em geral apresentam diâmetro maior, isto é, a deposição de paredes secundárias ocorre mais tarde, permitindo que as células aumentem de tamanho antes de atingir a maturidade (COSTA et al., 2003). Os elementos de protoxilema estão voltados para a periferia do órgão e os elementos de metaxilema, para o interior. Se o xilema não se diferencia no centro da raiz, este é ocupado por medula constituída de parênquima ou esclerênquima; neste caso, o cilindro vascular é oco (APPEZZATO-da-GLÓRIA; HAYASHI, 2003).

Figura 19. Seções transversais das lâminas foliares dos cultivares Santa Rosa (1); IAC-15 (2) e IAC-Foscarin 31 (3), em função das doses de Mn de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A), $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B) e de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (C), na solução nutritiva. Características anatômicas dos tecidos: células do mesófilo dos parênquimas paliçádico (primeira e segunda camadas – verificadas apenas nas duas últimas doses de Mn empregadas) e lacunoso.

Figura 20. Seções transversais das raízes dos cultivares Santa Rosa (1); IAC-15 (2) e IAC-Foscarin 31 (3), em função das doses de Mn de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (A), $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (B) e de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (C), na solução nutritiva. Características anatômicas dos tecidos primários: córtex e feixes vasculares (xilema). Detalhe (seta) dos vasos de xilema – protoxilema (Px) e metaxilema (Mx).

4.3.3 Ultraestrutura de lâminas foliares – microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu identificar as alterações nas ultraestruturas das células do mesófilo foliar dos três cultivares de soja, considerando as concentrações de Mn na solução nutritiva (0,5; 2,0 e 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Diversos trabalhos, mais especificamente abordando a deficiência de Mn em plantas, evidenciaram o papel deste nutriente na manutenção da estrutura dos cloroplastos (TEICHLER-ZÄLLEN, 1969; WEILAND; NOBLE; CRANG, 1975; LERER; BAR-AKIVA, 1979), visto que, são as organelas mais sensíveis de todos os componentes da célula na deficiência de Mn (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Entretanto, podem-se observar, também, alterações significativas no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (IZAGUIRRE-MAYORAL; SINCLAIR, 2005), bem como nas mitocôndrias (organela envolvida na respiração celular) em situação de excesso de Mn (SANTANDREA; TANI; BENNICI, 1998), as quais não foram verificadas no presente estudo.

Constatou-se, na condição de baixa disponibilidade de Mn na solução nos cultivares Santa Rosa, IAC-15 e IAC-Foscarin 31, ausência de plastoglôbulos nos cloroplastos; cloroplastos de tamanho reduzido; tilacóides dispostos em feixes bem agrupados (*granum*) e reunidos muito próximos uns aos outros no estroma; como também elevado número de vesículas no citoplasma. Entretanto, constatou-se no cultivar IAC-15, citoplasma desorganizado, vacuolado em excesso e denso evidenciando alterações nas membranas dos tilacóides (Figura 22 – 2), além de apresentar número elevado de glóbulos de lipídios em relação ao cultivar Santa Rosa. Constatou-se presença de glóbulos de lipídios nos cloroplastos do cultivar IAC-15, em todas as condições de fornecimento de Mn na solução, o que pode indicar alteração na rota metabólica na síntese de amido, ou ainda, ser característica do próprio cultivar. Não foi constatada a presença de glóbulos de lipídios nos cloroplastos do cultivar IAC-Foscarin 31 em nenhuma condição de suprimento de Mn.

Segundo Campbell e Nable (1988), a nutrição em Mn afeta vários aspectos do metabolismo de lipídios e de óleos, bem como a composição de ácidos graxos dos tecidos vegetais. A deficiência de Mn reduz o conteúdo de ácidos graxos polinsaturados (incremento de ácido linoléico e decréscimo de ácido oléico); de glicolipídios, proteínas e polipeptídios nos cloroplastos (CONSTANTOPOULOS, 1970; ABADIA; NISHIO; TERRY, 1986); e reduz o conteúdo de óleo e a composição das sementes. O papel do Mn nestes processos não é bem conhecido, porém, os efeitos podem ser secundários, resultantes da baixa taxa fotossintética a qual restringe o suprimento de esqueletos de carbono para a síntese de ácidos

graxos. A redução no número de cloroplastos, no número de membranas lamelares e na quantidade de amido em plantas deficientes em Mn são evidências morfológicas da redução da atividade fotossintética (WEILAND; NOBLE; CRANG, 1975).

Nos cultivares de soja desenvolvidos na mais alta dose de manganês, especialmente no IAC-15, foram observadas alterações na conformação e distribuição dos tilacóides dos cloroplastos (Figura 22 - 4), bem como na distribuição dos *granum* no estroma. Os grânulos de amido, no IAC-15, estavam distribuídos em menor quantidade e apresentavam tamanho reduzido em comparação com aqueles dos cloroplastos dos cultivares Santa Rosa e IAC-Foscarin-31. O citoplasma apresentou aspecto amorfo e denso (manchado), largamente desorganizado e com grande número de vesículas. Em algumas células, o protoplasto foi nitidamente separado da parede celular em direção ao centro da célula (Figura 22 - 4). Segundo Santandrea, Tani e Bennici (1998), a entrada de altos níveis de Mn nas células provoca danos na estrutura das membranas e, provavelmente, nas funções fisiológicas. Além da separação da membrana da parede celular, pode ocorrer ruptura com formação de inúmeras vesículas citoplasmáticas em espaços adjacentes (SANTANDREA; TANI; BENNICI, 1998). A absorção excessiva de Mn, como a de outros metais pesados, provavelmente incrementa a formação de radicais livres e reduza o conteúdo de ácido ascórbico ocasionando, assim, em dano peroxidativo (estresse oxidativo) da membrana celular (DEVOS et al., 1991; MORITA et al., 2006). Doncheva et al. (2005) relataram cloroplastos com tilacóides distorcidos, com incremento no tamanho e número de grãos de amido, presença de pequenas vesículas e escurecimento do estroma, em plantas de ervilha (*Pisum sativum* L.) cultivadas com dose de Mn de 3.000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A alteração estrutural mais evidente nos cloroplastos foi o aumento dos grãos de amido, o que foi associado como possível causa da inibição do transporte de fotoassimilados da folha para outros locais (DONCHEVA et al., 2005).

De acordo com os estudos ultraestruturais e anatômicos, do presente estudo, pode-se levantar a hipótese da existência de vários mecanismos conjuntos que atuam na manutenção do aparato bioquímico e estrutural das plantas, visto que, mesmo com as alterações ultraestruturais exibidas pela cultivar IAC-15 na condição de excesso de Mn na solução, a sua produção de massa seca de grãos, de pericarpos e da parte aérea, no Experimento 2, foi superior em relação aos demais cultivares. Por outro lado, nesta mesma condição de suprimento elevado de Mn, as plantas do cultivar IAC-Foscarin 31 não exibiram sintomas visuais de toxidez. As diferentes ocasiões das manifestações visuais de deficiência e de toxidez de Mn entre os cultivares também sustentam esta hipótese.

Figura 21. Microscopia eletrônica de transmissão em células do mesófilo foliar do cultivar Santa Rosa (x 3.000): (1) células de plantas cultivadas em solução nutritiva, com dose de Mn de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, exibindo cloroplastos com tilacóides reduzidos e agrupados (*granum*), espaço intercelular (EI), lamela média (lm) e (2) cloroplasto (x 4.400) exibindo glóbulos de lipídios (GL), mitocôndrias (M), vesículas (V) e tilacóides (TI); (3) cloroplastos de plantas cultivadas com dose de Mn de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (x 3.000), exibindo plastogóbulos (PG) com grânulos de amido (GA) e tilacóides bem espalhados no estroma; (4) cloroplastos de plantas cultivadas com dose de Mn de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (x 3.000), exibindo plastogóbulos com grânulos de amido e tilacóides extensos e agrupados. A escala das eletrofotomicrografias tem valor de $2 \mu\text{m}$.

Figura 22. Microscopia eletrônica de transmissão (x 3.000) em células do mesófilo foliar do cultivar IAC-15: (1) e (2) cloroplastos de plantas cultivadas com dose de Mn de $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ exibindo glóbulos de lipídios (GL), vesículas (V), mitocôndrias (M), núcleo (N) e tilacóides (TI); (3) cloroplastos de plantas cultivadas com dose de Mn de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, exibindo glóbulos de lipídios, plastogóbulos (PG) com grânulos de amido (GA) e tilacóides bem espalhados; (4) células do mesófilo de plantas cultivadas com dose de Mn de $200,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, exibindo cloroplastos com glóbulos de lipídios; plastogóbulos com grânulos de amido; núcleo (N); mitocôndrias (M) e tilacóides desorganizados no estroma dos cloroplastos. Em detalhe, separação do protoplasma da parede celular (★). A escala das eletrofotomicrografias tem valor de $2 \mu\text{m}$.

Figura 23. Microscopia eletrônica de transmissão (x 3.000) em células do mesófilo foliar do cultivar IAC-Foscarin 31 mantido na dose de Mn de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$: (1) e (2) cloroplastos de tamanho reduzido e exibindo vesículas (V); tilacóides (Tl) em feixes bem definidos; grande área de estroma e de espaço intercelular (EI); núcleo (N); (3) cloroplastos de plantas cultivadas com dose de Mn de 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, exibindo plastogóbulo (PG) com grânulos de amido (GA) e tilacóides espalhados e bem definidos no estroma; (4) cloroplastos de plantas cultivadas com dose de Mn de 200,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, exibindo plastogóbulo com grânulos de amido, certa desorganização dos tilacóides e com presença de algumas pequenas vesículas no estroma (V). A escala das eletrofotomicrografias tem valor de 2 μm .

5 CONCLUSÕES

As produções de massa seca das plantas (parte aérea, raízes e total) bem como a superfície e comprimento total de raízes não são atributos, unicamente, efetivos para a determinação da eficiência de absorção e uso de Mn pelos cultivares IAC-Foscarin 31, IAC-15 e Santa Rosa.

O maior acúmulo de Mn nas raízes e, posterior, transporte à longa distância observados no cultivar IAC-Foscarin 31, como também a menor dose de Mn para a produção de grãos são determinantes para o uso eficiente do nutriente, em relação aos demais genótipos. A maior relação parte aérea : raiz do cultivar IAC-Foscarin 31 pode ser um atributo significativo na indicação da maior eficiência de utilização de Mn.

O IAC-Foscarin 31 apresentou o menor K_m e mais alto V_{max} , o que conferiu maior eficiência de absorção. A eficiência de absorção e de uso do Mn pelas plantas de soja foram maiores nos cultivares: IAC-Foscarin 31 > IAC-15 $\geq$ Santa Rosa.

Os cultivares apresentam comportamento distinto quanto ao aparecimento dos sintomas e para a produção de massa seca. Na condição de excesso de Mn, os cultivares IAC-15 e Santa Rosa exibiram sintomas de toxidez de Mn associados a altos teores do nutriente nos tecidos, enquanto o IAC-Foscarin 31 não manifestou as anomalias. Entretanto, o IAC-15 apresentou maiores produções de massa seca da parte aérea e de grãos, enquanto o IAC-Foscarin 31 apresentou produções intermediárias. Para estes atributos produtivos, o Santa Rosa mostrou-se mais sensível ao excesso de Mn na solução.

Os maiores comprimento e superfície total de raízes, a maior produção de massa seca e acúmulo do Mn no sistema radicular do IAC-Foscarin 31 foram estratégias responsáveis pela maior tolerância ao excesso do Mn.

A manutenção das estruturas anatômicas, principalmente das raízes, confere tanto maior eficiência de absorção, na condição de deficiência, quanto maior tolerância quando o Mn estava em excesso na solução nutritiva. A diferenciação na organização do mesófilo foliar dos cultivares (examinadas por meio da microscopia óptica e de varredura), possivelmente, poderá ser mais evidente com a evolução dos sintomas – de deficiência e de toxidez.

As conformações, bem como as distribuições das ultraestruturas celulares, como os cloroplastos, grãos de amido e glóbulos de lipídios são afetados, principalmente, no cultivar IAC-15, pelas desordens nutricionais em Mn.

REFERÊNCIAS

- ABADIA, J.; NISHIO, J.N.; TERRY, N. Chlorophyll-protein and polypeptide composition of Mn-deficient sugar beet thylakoids. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v.7, p.237-245, 1986.
- ABBOTT, A.J. Physiological effects of micronutrient deficiencies in isolated roots of *Lycopersicon esculentum*. **New Phytologist**, New York, v.66, p.419-437, 1967.
- ABREU, C.A.; RAIJ, B.; TANAKA, R.T. Comportamento de cultivares de soja em solo deficiente em manganês. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.19, p.149-152, 1995.
- ADRIANO, D.C. **Trace elements in terrestrial environments** - biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 2001. 867p.
- ALAM, S.; KAMEI, S.; KAWAI, S. Amelioration of manganese toxicity in barley with iron. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, p.1421-1433, 2001.
- APPEZZATO-da-GLÓRIA, B.; HAYASHI, A.H. Raiz. In: APPEZZATO-da-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Eds.) **Anatomia vegetal**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. cap.10, p.267-281.
- ARAÚJO, A.P.; FERNANDES, A.M.; KUBOTA, F.Y.; BRASIL, F.C.; TEIXEIRA, M.G. Sample size for measurement of root traits on common bean by image analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, p.313-318, 2004.
- ARRU, L.; ROGNONI, S.; BARONCINI, M.; BONATTI, P.M.; PERATA, P. Copper localization in *Cannabis sativa* L. grown in a copper-rich solution. **Euphytica**, Dordrecht, v.140, p.33-38, 2004.
- BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.3, p.643-654, 1981.
- BALDISSEROTTO, C.; FERRONI, L.; MEDICI, V.; PAGNONI, A.; PELLIZZARI, M.; FASULO, M.P.; FAGIOLI, F.; BONORA, A.; PANCALDI, S. Specific intra-tissue responses to manganese in the floating lamina of *Trapa natans* L. **Plant Biology**, Stuttgart, v.6, p.578-589, 2004.
- BOHM, W. **Methods of studying root system**. Berlim: Spring Verlag, 1979. 187p.

- BOX JUNIOR, J.E. Modern methods for root investigations. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Eds.) **Plant roots: the ridden half**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.10, p.193-237.
- BROADHURST, C.L.; CHANEY, R.L.; ANGLE, J.S.; MAUGEL, T.K.; ERBE, E.F.; MURPHY, C.A. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.38, p.5797-5802, 2004.
- BROWN, J.C.; DEVINE, T.E. Inheritance of tolerance or resistance to manganese toxicity in soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.898-904, 1980.
- CAMPBELL, L.C.; NABLE, R.O. Physiological functions of manganese in plants. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Eds.) **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. cap.10, p.139-154.
- CLAASSEN, N.; BARBER, S.A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.54, p.564-568, 1974.
- CLUNE, S.T.; COPELAND, L. Effects of aluminum on canola roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.216, p.27-33, 1999.
- CONAB. Central de Informações Agropecuárias. disponível em:<www.conab.gov.br/conabweb/index.php?pag=101> acesso em: 11 set. 2006.
- CONSTANTOPOULOS, G. Lipid metabolism of manganese-deficient algae. 1. Effect of manganese deficiency on the greening and the lipid composition of *Euglena gracilis* Z. **Plant Physiology**, Rockville, v.45, p.76-80, 1970.
- COSTA, C.G.; CALLADO, C.H.; CORADIN, V.T.R.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Xilema. In: APPEZZATO-da-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Eds.) **Anatomia vegetal**. 2.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. cap.5, p.129-154.
- COSTA, C.; DWYER, L.M.; ZHOU, X.; DUTILLEUL, P.; HAMEL, C.; REID, L.M.; SMITH, D.L. Root morphology of contrasting maize genotypes. **Agronomy Journal**, Madison, v.94, p.96-101, 2002.

- DELHAIZE, E.; KATAOKA, T.; HEBB, D.M.; WHITE, R.G.; RYAN, P.R. Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. **Plant Cell**, Rockville, v.15, p.1131-1142, 2003.
- DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; STOYANOVA, Z.; HOLZER, R.; FELLER, U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.52, p.253-266, 2004.
- DEVOS, C.H.R.; SCHAT, H.; DEWALL, M.A.M.; VOOIJS, R.; ERNEST, W.H.O. Increased resistance to copper induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerance *Silene cucubalus*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, p.523-528, 1991.
- DI TOPPI, L.S.; MUSETTI, R.; VATTUONE, Z.; PAWLIK-SKOWRONSKA, B.; FOSSATI, F.; BERTOLI, L.; BADIANI, M.; FAVALI, M.A. Cadmium distribution and effects on ultrastructure and chlorophyll status in photobionts and mycobionts of *Xanthoria parietina*. **Microscopy Research and Technique**, Hoboken, v.66, p.229-238, 2005.
- DONCHEVA, S.; GEORGIEVA, K.; VASSILEVA, V.; STOYANOVA, Z.; POPOV, N.; IGNATOV, G. Effects of succinate on manganese toxicity in pea plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.28, p.47-62, 2005.
- DUCIC, T.; LEINEMANN, L.; FRINKELDEY, R.; POLLE, A. Uptake and translocation of manganese in seedling of two varieties of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *viridis* and *glauca*). **New Phytologist**, Oxon, v.170, p.11-20, 2006.
- EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J. Tolerance of crop and pasture species to manganese toxicity. In: INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM, 9., 1982, Warwick, **Proceedings...** Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks, United Kingdom, 1982. p.145-150.
- EGUEZ, L.; CHUNG, Y.S.; KUCHIBHATLA, A.; PAIDHUNGAT, M.; GARRET, S. Yeast Mn²⁺ transporter, Smflp, is regulated by ubiquitin-dependent vacuolar protein sorting. **Genetics**, Baltimore, v.167, p.107-117, 2004.
- EL-JAOUAL, T.; COX, D.A. Manganese toxicity in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, p.353-386, 1998.

- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants**: principles and perspectives. 2. ed. Sunderland: Sinauer, 2005. 400p.
- FAGERIA, N.K. Adequate and toxic levels of copper and manganese in upland rice, common bean, corn, soybean and wheat grown on an oxisol. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.32, p.1659-1676, 2001.
- FERNANDO, D.R.; BAKKAUS, E.J.; PERRIER, N.; BAKER, A.J.M.; WOODROW, I.E. BATIANOFF, G.N.; COLLINS, R.N. Manganese accumulation in the leaf mesophyll of four tree species: a PIXE/EDAX localization study. **New Phytologist**, Oxon, v.171, p.751-758, 2006a.
- FERNANDO, D.R.; BATIANOFF, G.N.; BAKER, A.J.M.; WOODROW, I.E. *In vivo* localization of manganese in the hyperaccumulator *Gossia bidwilli* (Benth.) N. Snow & Guymer (Myrtaceae) by cryo-SEM/EDAX. **Plant, Cell and Environment**, Oxon, v.29, p.1012-1020, 2006b.
- FOY, C.D.; SCOTT, B.J.; FISHER, J.A. Genetics and breeding of plant of manganese toxicity. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Eds.) **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. cap.19, p.293-307.
- GAO, X.; ZOU, C.; ZHANG, F.; VAN DER ZEE, S.E.A.T.M.; HOFFLAND, E. Tolerance to zinc deficiency in rice correlates with zinc uptake and translocation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.278, p.253-261, 2005.
- GONZÁLEZ, A.; LYNCH, J.P. Subcellular and tissue Mn compartmentalization in bean leaves under Mn toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v.26, p.811-822, 1999.
- GRAHAM, R.D. Breeding for nutritional characteristics in cereals. In: TINKER P.B.; LAUCHLI, A. (Eds.) **Advances in plant nutrition**. New York: Praeger Scientific, 1984. v.1, p.57-102.
- GRAHAM, R.D. Genotypic differences in tolerance to manganese deficiency. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Eds.) **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. cap.17, p.261-276.
- GRAHAM, M.J.; NICKELL, C.D.; HOEFT, R.G. Inheritance to manganese deficiency in soybean. **Crop Science**, Madison, v.35, p.1007-1010, 1995.

- HABIB, R. Total root length as estimated from small sub-samples. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.267-274, 1988.
- HAUG, A. Molecular aspects of aluminum toxicity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.1, p.345-373, 1984.
- HEBBERN, C.A.; PEDAS, P.; SCHJOERRING, J.K.; KNUDSEN, L.; HUSTED, S. Genotypic differences in manganese efficiency: field experiments with winter barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.272, p.233-244, 2005.
- HENRIQUES, F.S. Reduction in chloroplast number accounts for the decrease in the photosynthetic capacity of Mn-deficient pecan leaves. **Plant Science**, Clare, v.166, p.1051-1055, 2004.
- HORIGUCHI, T. Mechanism of manganese toxicity and tolerance of plants. II. Deposition of oxidized manganese in plant tissues. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.33, p.595-606, 1987.
- HORST, W.J. Factors responsible for genotypic manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.72, p.213-218, 1983.
- HUANG, C.; WEBB, M.J.; GRAHAM, R.D. Effect of pH on Mn absorption by barley genotypes in a chelator-buffered nutrient solution. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.156, p.437-440, 1993.
- HUNT, R. **Plant growth analysis**. London: Edward Arnold Limited, 1978. 67p.
- IBGE. Banco de dados agregados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 11 set. 2006.
- IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L.; SINCLAIR, T.R. Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. **Annals of Botany**, Oxford, v.96, p.149–158, 2005.
- JIANG, W.Z.; IRELAND, C.R. Characterization of manganese use efficiency in UK wheat cultivars grown in a solution culture system and in the field. **Journal of Agricultural Science**, New York, v.143, p.151-160, 2005.
- JIANG, W.Z. Mn use efficiency in different wheat cultivars. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.57, p.41-50, 2006.

- JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R.; BROYER, T.C.; CARLTON, A.B. Comparative chlorine requirements of different plants species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.8, p.337-353, 1957.
- JUNGK, A.O. Dynamics of nutrient movement at the soil-root interface. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Eds.) **Plant roots: the ridden half**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.27, p.529-556.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. 413p.
- KOMATUDA, C.R.N.; SEDIYAMA, C.S.; NOVAIS, R.F.; MONNERAT, P.H.; NEVES, J.C.L. Comportamento de cultivares de soja sob deficiência ou excesso de manganês em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.217-221, 1993.
- KORSHUNOVA, Y.O.; EIDE, D.; CLARK, W.G.; GUERINOT, M.L.; PAKRASI, H.B. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.40, p.37-44, 1999.
- KÜPPER, H.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.305-311, 1999.
- LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F.A. Perfilhamento, área foliar e sistema radicular do capim-Mombaça submetido a combinações de doses de nitrogênio e potássio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, p.1068-1075, 2003.
- LEIDI, E.O.; GOMEZ, M.; LA GUARDIA, M.D.D. Soybean genetic differences in responses to Fe and Mn: activity of metalloenzymes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.99, p.139-146, 1987.
- LERER, M.; BAR-AKIVA, A. Effect of manganese deficiency on chloroplasts of lemon leaves. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.47, p.163-166, 1979.
- LIDON, F.C. Rice plant structural changes by addition of excess manganese. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.25, p.287-296, 2002.
- LIDON, F.C.; TEIXEIRA, M.G. Oxy radicals production and control in the chloroplasts of Mn-treated rice. **Plant Science**, Clare, v.152, p.7-15, 2000.

- LIMA, A.M.N.; NEVES, J.C.L.; SILVA, I.R.; LEITE, F.P. Cinética de absorção e eficiência nutricional de K^+ , Ca^{2+} , e Mg^{2+} em plantas jovens de quatro clones de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.903-909, 2005.
- LIMA, D.V.; KLIEMANN, H.J.; MORAES, M.F.; LEANDRO, W.M. Relações entre doses de calcário e manganês na nutrição mineral da soja na região de Rio Verde – GO. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.34, p.61-69, 2004.
- LOMBNAES, P.; SINGH, B.R. Effect of free manganese activity on yield and uptake of micronutrient cations by barley and oat grown in chelator-buffered nutrient solution. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section B-Soil and Plant Sciences, Oslo, v.53, p.161-167, 2003a.
- LOMBNAES, P.; SINGH, B.R. Varietal tolerance to zinc deficiency in wheat and barley grown in a chelator-buffered nutrient solution and its effect on uptake of Cu, Fe and Mn. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.166, p.76-83, 2003b.
- LONERAGAN, J.F. Distribution and movement of manganese in plants. In: GRAHAM, R.D.; HANNAM, R.J.; UREN, N.C. (Eds.) **Manganese in soils and plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. cap.8, p.113-124.
- LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical Biochemical Cytology**, New York, v.9, p.409-414, 1961.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental** – metais pesados, mitos, mistificação e fatos. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153p.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MALAVOLTA, E.; KLIEMANN, H.J. **Desordens nutricionais no Cerrado**. Piracicaba: Potafos, 1985. 136p.
- MALAVOLTA, E.; SARRUGE, J.R.; BITTENCOURT, V.C. Toxidez de alumínio e de manganês. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO: BASES PARA UTILIZAÇÃO AGROPECUÁRIA, 4, 1976, Brasília. **Anais...** Belo Horizonte-MG: Itatiaia/São Paulo: USP, 1977. p.275-301. (Coleção Reconquista do Brasil, 38).
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

- MANN, E.N.; RESENDE, P.M.; MANN, R.S.; CARVALHO, J.G.; PINHO, E.V.R.V. Efeito da aplicação de manganês no rendimento e na qualidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, p.1757-1764, 2002.
- MARCAR, N.E.; GRAHAM, R.D. Tolerance of wheat, barley, triticale and rye to manganese deficiency during seedling growth. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.38, p.501-511, 1987.
- MARSCHNER, H. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.1-20, 1991.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic Press, 1995. 889p.
- MARTINOIA, E.; MAESHIMA, M.; NEUHAUS, H.E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, p.83-102, 2007.
- MASCARENHAS, H.A.A.; CAMARGO, C.E.O.; FALIVENE, S.M.P. Comportamento de cultivares de soja em solução nutritiva contendo diferentes níveis de manganês. **Bragantia**, Campinas, v.43, p.201-209, 1984.
- MASCARENHAS, H.A.A.; MIRANDA, M.A.C.; RAMOS, L.C.S; FURLANI, P.R.; BATAGLIA, O.C. Comportamento de três cultivares de soja em diversos níveis de manganês em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.41, p.225-230, 1982.
- MASCARENHAS, H.A.A.; MIRANDA, M.A.C.; TANAKA, R.T.; FALIVENE, S.M.P.; DECHEN, A.R. Comportamento de cultivares precoces de soja em solução nutritiva contendo diferentes níveis de manganês. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, p.609-615, 1990.
- MAUK, C.S.; NOODÉN, L.D. Regulation of mineral redistribution in pod-bearing soybean explants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.43, p.1429-1440, 1992.
- MENGEL, K; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 5.ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.
- MENGEL, K.; SEGARS, W.; REHM, G.W. Soil fertility and liming. In: WILCOX, J.R. (Ed.). **Soybeans: improvement, production and uses**. 2.ed. Madison: American Society Agronomy, 1987. p.461-496.

- MIYASAKA, S.C.; KOCHIAN, L.V.; SHAFF, J.E.; FOY, C.D. Mechanisms of Al tolerance in wheat - an investigation of genotypic differences in rhizosphere pH, K⁺, and H⁺ transport, and root-cell membrane potentials. **Plant Physiology**, Rockville, v.91, p.1188-1196, 1989.
- MOREIRA, A. **Influência do magnésio na absorção e transporte do manganês e do zinco na soja**. 1999. 138p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- MOREIRA, A.; MALAVOLTA, E.; HEINRICHS, R.; TANAKA, R.T. Influência do magnésio na absorção de manganês e zinco por raízes destacadas de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, p.95-101, 2003.
- MORITA, A.; YOKOTA, H.; ISHKA, M.R.; GHANATI, F. Changes in peroxidase activity and lignin content of cultured tea cells in response to excess manganese. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.52, p.26-31, 2006.
- MORONI, J.S.; SCOTT, B.J.; WRATTEN, N. Differential tolerance of high manganese among rapeseed genotypes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.253, p.507-519, 2003.
- MUNNS, D.N.; JACOBSON, L.; JOHNSON, C.M. Uptake and distribution of manganese in oat plants II. A kinetic model. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.19, p.193-204, 1963.
- NIELSEN, N.E.; BARBER, S.A. Differences among genotypes of corn in the kinetics of P uptake. **Agronomy Journal**, Madison, v.70, p.695-698, 1978.
- NOORDWIJK, M.V.; FLORIS, J. Loss of dry weight during washing and storage of root samples. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.53, p.239-243, 1979.
- NYE, P.H.; TINKER, P.B. The uptake properties of the root system in solution. In: NYE, P.H.; TINKER, P.B. (Eds.) **Solute movement in the soil-root system**. 1.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. cap.5, p.92-126.
- OLIVEIRA JUNIOR, J.A.; MALAVOLTA, E.; CABRAL, C.P. Efeitos do manganês sobre a soja cultivada em solo de Cerrado do triângulo mineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.1629-1636, 2000.
- OHKI, K. Manganese deficiency and toxicity levels for “Bragg” soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v.68, p.861-864, 1976.

- OHKI, K. Manganese critical levels for soybean growth and physiological processes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.3, p.271-284, 1981.
- OHKI, K.; WILSON, D.O.; ANDERSON, O.E. Manganese deficiency and toxicity sensitivities of soybeans cultivars. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.713-716, 1980.
- OHLROGGE, A.J. Mineral nutrition of soybeans. In: NORMAN, A.G. (Ed.). **The soybean**. New York: Academic Press, 1963. p.125-160.
- PAGE, E.R.; DAINITY, J. Manganese uptake by excised oat roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.15, p.428-443, 1963.
- PARKER, D.R.; CHANEY, R.L.; NORVELL, W.A. Chemical equilibrium models: applications to plant nutrition research. In: LOEPPERT, R.H.; SCHAWB, A.P.; GOLDBERG, S. (Eds.). **Soil chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science Society of America, 1995a. cap.9, p.163-200.
- PARKER, D.R.; NORVELL, W.A.; CHANEY, R.L. GEOCHEM – PC: a chemical speciation program for IBM and compatible personal computers. In: LOEPPERT, R.H.; SCHAWB, A.P.; GOLDBERG, S. (Eds.). **Soil chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science Society of America, 1995b. cap.13, p.253-269.
- PEDAS, P.; HEBBERN, C.A.; SCHJOERRING, J.K.; HOLM, P.E.; HUSTED, S. Differential capacity for high-affinity manganese uptake contributes to differences between barley genotypes in tolerance to low manganese availability. **Plant Physiology**, Rockville, v.139, p.1411-1420, 2005.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: O autor, 2000. 477p.
- PITTMAN, J.K. Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. **New Phytologist**, Oxon, v.167, p.733-742, 2005.
- PRIMO-YÚFERA, E.; CARRASCO-DORRIÉN, J.M. La fertilización con oligoelementos. In: PRIMO-YÚFERA, E.; CARRASCO-DORRIÉN, J.M. (Eds.) **Química agrícola**. I – Suelos y fertilizantes. Madrid: Editorial Alhambra, 1973. cap.17, p.214-230.
- QUIQUAMPOIX, H.; LOUGHMAN, B.C.; RATCLIFFE, R.G. A ³¹P-NMR study of the uptake and compartmentation of manganese by maize roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, p.1819-1827, 1993.

- RAMANI, S.; KANNAN, S. Manganese absorption and transport in rice. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.33, p.133-137, 1975.
- REDDY, M.R. Response of various soybean genotypes to excess soil manganese. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v.17, p.150-152, 1990.
- REDDY, M.R.; RONAGHI, A.; BRYANT, J.A. Differential responses of soybean genotypes to excess manganese in an acid soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.221-226, 1991.
- REID, R.J. Kinetics of nutrient uptake by plant cells. In: RENGEL, Z. (Ed.) **Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications**. 1.ed. New York: Food Products Press, 1999. cap.2, p.41-66.
- REUTER, D.J.; EDWARDS, D.G.; WILHELM, N.S. Temperate and tropical crops. In: REUTER, D.J.; ROBINSON, J.B. (Ed.). **Plant analysis: an interpretation manual**. 2.ed. Collingwood: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), 1997. cap.5, p.83-284.
- REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, New York, v. 17, p.208-212, 1963.
- ROUT, G.R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Studies on differential manganese tolerance of mung bean and rice genotypes in hydroponic culture. **Agronomie**, Les Ulis Cedex, v.21, p.725-733, 2001.
- RUIZ, H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos, Km e Vmax por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres**, Viçosa, v.32, p.79-84, 1985.
- SADANA, U.S.; LATA, K.; CLAASSEN, N. Manganese efficiency of wheat cultivars as related to root growth and internal manganese requirement. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.25, p.2677-2688, 2002.
- SADANA, U.S.; SAMAL, D.; CLAASSEN, N. Differences in manganese efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.) and raya (*Brassica juncea* L.) as related to root-shoot relations and manganese influx. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.166, p.385-389, 2003.
- SADANA, U.S.; SHARMA, P.; ORTIZ, N.C.; SAMAL, D.; CLAASSEN, N. Manganese uptake and Mn efficiency of wheat cultivars are related to Mn-uptake kinetics and root growth. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v.168, p.581-589, 2005.

- SAMAL, D.; SADANA, U.S.; GILL, A.A.S. Mechanistic approach to study manganese influx and its depletion in the rhizosphere of wheat and raya. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.34, p.3033-3044, 2003.
- SANTANDREA, G.; SCHIFF, S.; BENNICI, A. Effects of manganese on *Nicotiana* species cultivated in vitro and characterization of regenerated Mn-tolerant tobacco plants. **Plant Science**, Clare, v.132, p.71-82, 1998.
- SANTANDREA, G.; TANI, C.; BENNICI, A. Cytological and ultrastructural response of *Nicotiana tabacum* L. roots to manganese stress. **Plant Biosystems**, Firenze, v.132, p.197-206, 1998.
- SAS Institute. **SAS/STAT**. User's guide, version 6.11. 4.ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 1996. v.2, 842p.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, New York, v.149, p.167-192, 2001.
- SHINONAGA, T.; PRÖHL, G.; MÜLLER, H.; AMBE, S. Experimentally determined mobility of trace elements in soybean plants. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.225, p.241-248, 1999.
- TANAKA, R.T.; MASCARENHAS, H.A.A.; BULISANI, E.A. Deficiência de manganês em soja induzida por excesso de calcário. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p.247-250, 1992.
- TIMONIN, M.I. Microflora of the rhizosphere in relation to the manganese deficiency disease of oats. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.11, p.284-292, 1946.
- TEICHLER-ZÄLLEN, D. The effect of manganese on chloroplast structure and photosynthetic ability of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, Rockville, v.44, p.701-710, 1969.
- TSUKAMOTO, T.; NAKANISHI, H.; KIYOMIYA, S.; WATANABE, S.; MATSUHASHI, S.; NISHIZAWA, N.K.; MORI, S. ⁵²Mn translocation in barley monitored using a positron-emitting tracer imaging system. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.52, p.717-725, 2006.

- ULRICH, A.; HILLS, E.J. Plant analysis as an acid fertilizing sugar crops: part I. Sugar beets. Principles and practices of plant analysis. In: WALSH, L.M.; BEATON, J.D. (Ed.). **Soil testing and plant analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1973. p.271-288.
- WANG, J.J. Kinetics of manganese uptake by excised roots of sensitive and tolerant tobacco genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.26, p.1439-1450, 2003.
- WANG, J.J.; EVANGELOU, B.P.; ASHRAF, M.M. Changes in root cell wall chemistry induced by manganese exposure with two tobacco genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.26, p.1527-1540, 2003.
- WEILAND, R.T.; NOBLE, R.D.; CRANG, R.E. Photosynthetic and chloroplast ultrastructural consequences of manganese deficiency in soybean. **American Journal of Botany**, Ohio, v.62, p.501-508, 1975.
- WILLIAMS, D.E.; VLAMIS, J. The effect of silicon on yield and manganese-54 uptake and distribution in the leaves of barley plants grown in culture solutions. **Plant Physiology**, Rockville, v.32, p.404-409, 1957.