

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

**Nitrato de amônio e nitrato de potássio no desenvolvimento *in vitro*  
de embriões somáticos de pupunheira**

**Thaís Lobo dos Santos**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia  
e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Thaís Lobo dos Santos**  
**Bacharel em Ciências Biológicas**

**Nitrato de amônio e nitrato de potássio no desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de pupunheira**

**Orientador:**  
**Prof. Dr. MARCÍLIO DE ALMEIDA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

**Piracicaba**  
**2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Santos, Thais Lobo dos

Nitrato de amônio e nitrato de potássio no desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de pupunheira / Thais Lobo dos Santos. - - Piracicaba, 2009.  
130 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.  
Bibliografia.

1. Amônio 2. Embriogênese somática 3. Micropropagação vegetal 4. Nitratos 5. Nitrogênio  
6. Potássio 7. Pupunha I. Título

CDD 634.6  
S237n

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

**Ao William,  
Ofereço**

**À Marina e à Sheila,  
Dedico**

**“Quando a última árvore tiver caído, e o último rio tiver secado, e o último peixe tiver sido pescado, aí vocês vão entender que dinheiro não se come”.**

**Autor desconhecido**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser maravilhoso e ter criado todos os seres vivos. Que saibamos cuidar.

A meus pais Sheila e Cláudio e irmã Marina, por sempre terem incentivado e apoiado e às queridas avós Yolanda e Rosa, pelo exemplo de vida.

Ao orientador prof. Dr. Marcílio de Almeida e à Dr<sup>a</sup> Cristina Vieira de Almeida, pela dedicação, ensino, compreensão e amizade.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pelo aprendizado e apoio na execução dos experimentos.

A Capes, pela concessão de bolsa.

Ao meu namorado William, pela ajuda na formatação do trabalho e pelo companheirismo sempre.

A Cássia, pelos inúmeros auxílios dentro e fora do laboratório e pela amizade.

Aos amigos do laboratório Katherine, Érika, Gabriela, Natália, Laura, Gilvano, Malu, Maysa, Marcela, Francisco, Monita, Liliane, Heron e Fernando pela amizade e pela ajuda em diferentes etapas do trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Kluge, por ceder o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-colheita para realização de parte das análises.

Aos companheiros da vila dos estudantes da pós-graduação, especialmente os amigos Marcos, Ju, Sergio, Vânia, Shirley, Lilian, Lidinalva, Elenilson, Fabiane, Deborah e Daniele, pela companhia e amizade todos os dias.

À técnica Lucia e equipe do Laboratório de Tecido Vegetal do Departamento de Ciência do Solo, pelas análises químicas.

À Fabiana (Baguinha) e colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Pós-colheita pelas informações e auxílio nas análises laboratoriais e pela amizade.

Ao professor Dr. Ricardo Ferraz Oliveira e ao aluno Rafael, por gentilmente ceder o uso do equipamento para análises fisiológicas.

Ao Romeu e à Cidinha, pela amizade.

A secretária do programa, Maria Solizéte Granzioi Silva, pela atenção e ajuda constantes.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela contribuição com seus conhecimentos.

A Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), campus experimental do Litoral Paulista, unidade São Vicente, pela contribuição na minha formação e em especial à prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Dzimidas Rodrigues, por ter sido minha primeira orientadora.

A todos meus familiares, pelo carinho.

Aos amigos de curso e da capoeira da ESALQ, por tornarem cada momento mais divertido.

Às primeiras e eternas amigas, Paulinha, Arenda, Déia e Marina.

Aos integrantes da banca examinadora, pela contribuição com seus conhecimentos.



## SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 Pupunheira .....	15
2.1.1 Características Gerais .....	15
2.1.1.1 Nomenclatura e distribuição .....	15
2.1.1.2 Morfologia Externa .....	15
2.1.1.3 Clima e solo.....	17
2.1.1.4 Fenologia.....	17
2.1.2 Importância Econômica .....	18
2.1.3 Pragas e relações com microrganismos.....	20
2.2 Micropropagação.....	24
2.3 Nutrição Mineral .....	27
2.3.1 Micronutrientes.....	32
2.3.2 Macronutrientes.....	36
2.3.2.1 Nitrogênio .....	40
2.3.2.2 Nitrogênio <i>in vitro</i> .....	44
2.3.3 Problemas nutricionais da pupunheira e sua necessidade de nitrogênio .....	47
3 OBJETIVO.....	51
3.1 Objetivo geral .....	51
3.2 Objetivos específicos .....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	53
4.1 Local de realização do experimento.....	53

4.2. Material Vegetal e condições de cultivo.....	53
4.3 Coleta de dados.....	55
4.3.1 Avaliações morfofisiológicas.....	55
4.3.2 Quantificação de Proteínas Totais Solúveis.....	55
4.3.3 Avaliação indireta do teor de clorofila.....	55
4.3.4 Avaliação do teor de macro e micronutrientes.....	56
4.4 Delineamento estatístico.....	56
4.4.1 Análise dos dados.....	56
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Coleta de dados.....	59
5.1.1 Avaliações morfofisiológicas.....	59
5.1.1.1 Parâmetros Morfofisiológicos aos 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	59
5.1.1.2 Parâmetros Morfofisiológicos aos 120 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	63
5.1.1.3 Parâmetros Morfofisiológicos aos 180 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	70
5.1.1.4 Parâmetros Morfofisiológicos aos 240 dias de cultivo <i>in vitro</i> .....	76
5.1.2 Quantificação de Proteínas Totais Solúveis.....	82
5.1.3 Avaliação indireta do teor de clorofila.....	84
5.1.4 Avaliação do teor de macro e micronutrientes.....	86
6 DISCUSSÃO.....	93
7 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO.....	129

## RESUMO

### Nitrato de amônio e nitrato de potássio no desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de pupunheira

O experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar a influência da interação entre o nitrato de amônio e nitrato de potássio sobre as respostas morfogênicas de embriões somáticos de pupunheiras *in vitro* a fim de otimizar o protocolo de micropropagação da espécie. As concentrações utilizadas foram 0, 825, 1650, 2475 e 3300 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de amônio e 0, 950, 1900, 2850 e 3800 mg L<sup>-1</sup> de nitrato de potássio, combinadas entre si, perfazendo um total de 25 tratamentos. Os tratamentos foram preparados a partir da solução completa de Murashige e Skoog, devidamente modificado para as proporções desses íons no suprimento de nitrogênio. Utilizaram-se duzentos e cinquenta embriões somáticos com características morfológicas homogêneas, isentos de raízes e folhas, obtidos a partir de microplantas mantidas em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas. Foram aferidos dados do comprimento da parte aérea e da raiz, o número de raízes, brotações e folhas, a porcentagem de ramificação da raiz, a porcentagem de raízes finas, medianas e grossas, em quatro períodos de cultura, a cada 60 dias, totalizando 240 dias de cultivo. Ao final desse período, avaliou-se também o teor de proteínas totais solúveis, o teor de clorofila pelo índice SPAD e os teores de macro e micronutrientes nas microplantas. Utilizou-se delineamento estatístico inteiramente casualizado e os dados foram submetidos ao teste de Bartlett a 5% e análise de variância (ANOVA) a 1% e 5% de probabilidade de erro ou foi elaborada uma matriz de correlação de Pearson a 1% e 5% de probabilidade de erro, conforme o caso. Os resultados permitiram inferir que aos 240 dias de cultivo as microplantas passam a investir mais em formação de parte aérea e aumentam a porcentagem de raízes finas, e funcionais. Os tratamentos que melhor favoreceram a formação de proteínas foram aqueles com concentração de 2475 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ou com 2850 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Os maiores índices SPAD ocorreram nos tratamentos com até 1650 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> combinado com até 1900 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Diferentes combinações dos sais de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> podem favorecer a absorção de cada nutriente. Conclui-se que os resultados obtidos no trabalho podem contribuir com a melhoria do protocolo de micropropagação de *B. gasipaes*, na medida em que permitem estabelecer o melhor tratamento para maximização de uma resposta específica desejada para cada momento do processo de cultivo dos embriões somáticos de pupunheiras, como enraizamento, crescimento da parte aérea, formação de proteínas e formação de brotações, facilitando dessa forma a otimização da produção de microplantas com características desejáveis e, conseqüentemente, sua aclimatização e desenvolvimento *ex vitro*.

Palavras-chave: Pejibaye; Nitrogênio; *Bactris gasipaes*; Micropropagação



## ABSTRACT

### **Ammonium nitrate and potassium nitrate in the peach palm somatic embryos *in vitro* development**

This study aimed to evaluate the influence of the interaction between ammonium nitrate and potassium nitrate on the morphogenetic responses of peach palm somatic embryos *in vitro* cultivated, to optimize the micropropagation protocol for this species. The concentrations used were 0, 825, 1650, 2475 and 3300 mg L<sup>-1</sup> of ammonium nitrate and 0, 950, 1900, 2850 and 3800 mg L<sup>-1</sup> of potassium nitrate, in all possible associations, totalizing 25 treatments. The treatments were prepared with the complete solution of Murashige and Skoog, with modified proportions of these ions in relation to the nitrogen supply. Two hundred and fifty somatic embryos with homogeneous morphological characteristics, without roots and leaves, obtained from microplants from a controlled temperature and luminosity room, were used in the experiment. Every 60 days, during 240 days, the length of shoot and root, the number of roots, propagules and leaves and the root architecture were measured. At the end of 240 days of cultivation, it was also analyzed the total soluble proteins, the foliar chlorophyll by a chlorophyll meter equipment (SPAD-502) and the macronutrients and micronutrients concentrations in the microplants. The experiment was conducted in a randomized design. The data were subjected to Bartlett's test at 5% and variance analysis (ANOVA) at 1% and 5% of probability of error, or it was made a correlation matrix at 1% and 5% of probability of error, according to each analysis. The results showed that at 240 days of cultivation the microplants spent more energy building the shoot part and raised the percentage of thin, functional root. The best treatments for proteins formation were those with 2475 mg L<sup>-1</sup> of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> or with 2850 mg L<sup>-1</sup> of KNO<sub>3</sub>. The highest SPAD index occurred in the treatments with at most 1650 mg L<sup>-1</sup> of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> associated with at most 1900 mg L<sup>-1</sup> of KNO<sub>3</sub>. Different associations of NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> may favor the absorption of each nutrient. We conclude that the results obtained may contribute to the optimization of the *B. gasipaes* micropropagation protocol, as it is possible to establish the best treatment for maximization of a specific answer for each moment of the somatic embryos cultivations process, such as rooting, shoot growth, propagules and protein formation, and thus increase the optimization of microplants production with wanted characteristics and hence its acclimatization and *ex vitro* development.

Keywords: Pejibaye; Nitrogen; *Bactris gasipaes*; Micropropagation



## 1 INTRODUÇÃO

Os métodos de obtenção de palmito mais freqüentes ocorrem por explorações extrativistas e irracionais, ocasionando a extinção das espécies produtoras mais comuns: juçara e açai. Essa é uma das razões pelas quais o cultivo da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth–Arecaceae) tem se expandido, tornando-se atualmente a principal produção de palmito no mercado interno e externo. Além dessa importância ecológica, a produção de palmito de pupunha vem se destacando também devido a suas qualidades agronômicas, industriais e comerciais, levando-se em consideração que seu cultivo apresenta excelente alternativa para o pequeno agricultor devido a sua alta rentabilidade.

Contudo, muitas são as dificuldades encontradas para a expansão dessa cultura no Brasil, como a ausência de campos de produção de sementes de matrizes com superioridade agronômica. Normalmente as sementes comercializadas não são de matrizes selecionadas, resultando em plantios heterogêneos, onde se observam variação no número de perfilho, presença de espinhos no pecíolo, diâmetro irregular do estipe, além de baixa produção e qualidade do palmito.

Dessa forma, cabe salientar que a seleção de plantas mais produtivas com características agronômicas desejáveis é de grande importância para o desenvolvimento da cultura da pupunha não só na região Amazônica, como também em todas as regiões do Brasil que vêm investindo nessa cultura. A seleção das matrizes por meio de análises dos parâmetros genéticos e fenotípicos auxiliam sobremaneira a escolha da melhor estratégia de melhoramento a ser adotada.

Vários estudos indicam que as principais fontes de sementes de germoplasma dessa espécie são oriundas de Yurimáguas no Peru, San Carlos na Costa Rica e Benjamin Constant na Amazônia brasileira. As sementes de procedência de Yurimáguas têm sido as mais procuradas devido à menor incidência de espinhos, já que esses são indesejáveis não apenas por dificultar o corte da planta para obtenção do palmito, mas também por afetar sua qualidade para a comercialização e, por isso, mudas com espinhos são descartadas.

Essas características tornam as sementes da procedência Yurimáguas mais caras tanto pela maior demanda quanto por apresentarem baixo poder germinativo, onerando

ainda mais o custo de produção das mudas. Em decorrência destes fatos, várias empresas nacionais da iniciativa privada estão à procura de fontes idôneas que forneçam sementes de pupunha de boa qualidade genética.

A pupunha é monóica com flores diclinas e alógamas, determinando um sistema genético de auto-incompatibilidade, o que resulta em alto índice de sementes inviáveis, características que justificam a utilização da técnica de micropropagação, a qual permite a produção maciça de matrizes selecionadas. Os métodos *in vitro* utilizados para a propagação dessa espécie, mesmo sendo mais complicados, em médio prazo permitem multiplicar genótipos com muito mais rapidez, permitindo a instalação de bioensaios de clones em todas as regiões produtoras do Brasil. Esses ensaios poderão identificar genótipos adaptados a cada região, podendo ser distribuídos aos produtores de sementes, reduzindo a necessidade futura de importá-las. Além disso, a produtividade da cultura poderá ser substancialmente aumentada com o melhoramento genético convencional e a aplicação da cultura de meristema *in vitro*.

A técnica *in vitro* vem sendo aplicada na propagação de pupunheiras de progênes oriundas de Yurimáguas, a partir de ápices caulinares, desde 1994, com resultados satisfatórios, no laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva da ESALQ/USP em Piracicaba-SP. Entretanto, apesar dos resultados obtidos, o protocolo para micropropagação de pupunheiras necessita de otimização, pois as palmeiras em geral são recalcitrantes e poucos são os genótipos que se adaptam ao cultivo *in vitro*.

As plantas em geral tendem a responder diferentemente às formulações dos meios de cultivo *in vitro* quanto às formas de nitrogênio utilizadas. Assim, diferentes eventos fisiológicos podem ser desencadeados, como a promoção ou inibição no desenvolvimento do vegetal para o crescimento, formação de folhas, raízes e brotos.

Nesse contexto, o trabalho teve por objetivo avaliar a influência da interação do nitrato de amônia e nitrato de potássio, no desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de pupunheiras, visando a otimização do protocolo de micropropagação da espécie.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Pupunheira

#### 2.1.1 Características Gerais

##### 2.1.1.1 Nomenclatura e distribuição

*Bactris gasipaes*, conhecida no Brasil como pupunha, possui diversos nomes populares nos países sul e centro americanos, como tembe e palmeira-de-castilla (Bolívia); chonta (Bolívia e Equador); cachipay (Colômbia); chontaduro (Colômbia e Equador); pejibaye (Costa Rica, Guatemala e Nicarágua); paripie (Guiana); parépou (Guiana Francesa); piba e pisbae (Panamá); pijuayo (Peru); paripoe (Suriname); peach palm e pewa palm (Trinidad); pijiguao e macana (Venezuela) (FERREIRA, 2005).

A pupunha é uma palmeira de ciclo perene com ocorrência natural desde Honduras, na América Central, até a região norte do Brasil, passando pela Venezuela, Colômbia, Guianas, Peru, Equador e Bolívia (MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997).

O gênero *Bactris* possui 73 espécies e 21 variedades, distribuídas desde o sul do México até o sul do Brasil e Paraguai, com maior diversidade na Amazônia (HENDERSON, 2000). São consideradas sinônimas para *Bactris gasipaes*: *B. ciliata* (RUIZ & PAV) Mart.; *B. insignis* (Mart.) Baillon; *B. speciosa* (Mart.) H. Karst.; *B. speciosa* var. *chichagui* (Mart.) H. Karst.; *B. utilis* (Oerst.) Benth. & Hook. f. ex Hemsl.; *Guilielma chontaduro* Triana; *G. ciliata* (RUIZ & PAV) H. Wendl.; *G. gasipaes* (Kunth) L. H. Bailey; *G. insignis* Mart.; *G. speciosa* Mart.; *G. utilis* Oerst.; e *Martinezia ciliata* Ruiz & Pav. (HENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995; MORA-URPÍ; WEBER; CLEMENT, 1997).

##### 2.1.1.2 Morfologia Externa

A pupunha é uma palmeira tipicamente cespitosa (multicaule), embora possam ocorrer palmeiras com apenas um estipe. A altura média é de 16m, podendo alcançar até 24m. Seu tronco é cilíndrico, não ramificado, com 12 a 26cm de espessura. Possui nós de 2 a 9cm e entrenós de 7 a 27cm de comprimento na altura do peito, apresentando espinhos ou raramente glabros. Os espinhos, quando presentes, são em número de 1 a 97 a cada 16cm<sup>2</sup>, com coloração escura e consistência variável, medindo de 3 a 14cm (MATTOS SILVA; MORA-URPÍ, 1996).

O principal fator que controla o número de brotações que resultam nos perfilhos é a dominância apical e, ao longo do desenvolvimento da planta, as raízes adventícias produzem um emaranhado de raízes superficiais, ocupando na maioria das vezes os primeiros 20cm do horizonte "A" do solo, exceto as raízes principais, que podem chegar a 2 metros ou mais de profundidade. As raízes podem se estender até 4 a 5 metros ao redor da planta (FERREIRA; CLEMENT; RANZANI, 1980).

A copa possui de 10 a 30 folhas pinadas, com espinhos curtos ou ausentes. Quando ocorrem, podem estar nas faces abaxial ou adaxial, nas nervuras, região internerval e pecíolo. As folhas são bifurcadas, medindo de 58 a 115cm de comprimento e 3 a 6cm de largura e freqüentemente são fundidas basal e apicalmente. Folhas jovens são pubescentes, fundidas ao longo de uma pequena raque (MATTOS SILVA; MORA-URPÍ, 1996).

A inflorescência é axilar, coberta com uma bráctea glabra ou revestida de espinhos; o pedúnculo possui raramente espinhos e mede 27cm de comprimento. A raque, com 31 a 78cm de comprimento, possui de 25 a 145 ráquulas férteis e até 16 ráquulas abortadas; as ráquulas são retas ou recurvadas e medem de 16 a 47cm de comprimento e possuem bractéolas que variam muito em comprimento e largura. A palmeira é geralmente monóica, com flores masculinas e femininas distribuídas na mesma inflorescência; flores hermafroditas ocorrem ocasionalmente; as flores estaminadas são menores, porém sempre em maior número, podendo alcançar 50 vezes o número de flores pistiladas. As flores estaminadas são de cor creme ou amarelo-pálido e possuem seis estames. As flores pistiladas são amarelas ou raramente verdes, tricarpelares, sincárpicas, uniloculares com estigma séssil, formado pela fusão incompleta da parte distal dos carpelos (MATTOS SILVA; MORA-URPÍ, 1996).

Seu fruto é uma drupa cujo exocarpo verde torna-se vermelho, amarelo ou de cor laranja quando amadurece e pode ter estriações superficiais. O formato e o tamanho são bastante variados, a base pode ser ondulada, plana, truncada ou arredondada; ápice arredondado, pontiagudo ou truncado; e corola dentada, tridentada ou arredondada. Os frutos são organizados em rácimo (cacho) que pode conter frutos férteis, além de frutos parternocárpicos, não fecundados, sendo que os frutos férteis

são em média mais pesados que frutos partenocárpicos. A semente é envolvida por endocarpo amarronzado ou preto, portanto a unidade de dispersão (diásporo) é considerada botanicamente um pirênio. O formato do pirênio é muito variável e pode ser elíptico, arredondado, oblongo, cuneiforme, cônico ou ligeiramente angular. Possui três poros: dois geralmente na região equatorial e o terceiro (poro germinativo) mais afastado. A superfície dorsal possui fibras pretas que atravessam longitudinalmente o propágulo e concentram-se ao redor do poro por onde emerge a plântula, formando um tampão fibroso na base do poro germinativo (MATTOS SILVA; MORA-URPÍ, 1996). As sementes são recalcitrantes e perdem a viabilidade rapidamente quando secas (FERREIRA; SANTOS, 1992).

#### **2.1.1.3 Clima e solo**

A pupunheira pode adaptar-se a diferentes condições climáticas, mas as condições consideradas ideais para seu desenvolvimento são temperatura média acima de 22°C e precipitação anual superior a 1600mm, bem distribuída. Embora seja uma planta rústica e consiga viver em solos ácidos e pouco férteis, desenvolve-se melhor em solos férteis de textura média a leve, respondendo bem à calagem e à adubação. As características físicas do solo são mais importantes que as químicas, pois não tolera solo com má drenagem e sujeito ao encharcamento e tampouco se desenvolve bem em solos compactados (EMBRAPA ACRE, 2000). Ocorre próxima ao nível do mar até cerca de 2000 m de altitude (ALMEYDA; MARTÍN, 1980).

#### **2.1.1.4 Fenologia**

Em regiões de pluviosidade alta e sem período de estiagem pronunciado, a floração ocorre duas vezes ao ano, sendo que em uma há maior produção de flores que na outra (MORA URPI; SOLÍS, 1980; BEACH, 1984). Já em áreas de menor precipitação e com período de estiagem pronunciado, a floração ocorre em uma só época e proporcionalmente um pico de floração superior (MORA URPI; SOLÍS, 1980).

As primeiras inflorescências surgem normalmente entre três e quatro anos após a germinação da semente. Em geral, cada palmeira produz de duas a seis inflorescências por ano, mas podem ultrapassar dez (CAMACHO, 1976; ALMEYDA;

MARTIN, 1980). O desenvolvimento da inflorescência está intimamente ligado à idade da folha (MORA-URPÍ; CLEMENT, 1981; CLEMENT, 1987), sendo que uma planta pode produzir tantas inflorescências quantas forem as suas folhas (MORA-URPÍ; CLEMENT, 1981). Três mecanismos de polinização são observados: o mais importante é efetuado por insetos, principalmente coleópteros (Curculionidae), seguido da polinização pelo vento e, em menor importância, pela gravidade (MORA URPI; SOLÍS 1980; MORA URPI et al., 1982) e diversas aves ajudam na dispersão das sementes.

O tempo para a formação dos frutos, entre a floração até o início da maturação é de cerca de 115 dias (MORA URPI, 1984) e na Amazônia Central este período é de aproximadamente 110 dias (FERREIRA, 1996). Em Manaus, a floração inicia-se normalmente em pleno período de estiagem, por volta do mês de agosto e prolonga-se até o mês de novembro. Já a presença de frutos maduros ocorre durante o período de chuvas, de dezembro a março.

### **2.1.2 Importância Econômica**

O palmito é extraído da extremidade superior do estipe de algumas palmeiras, formado por folhas internas em crescimento envolvidas por bainhas de folhas adultas (EMBRAPA ACRE, 2000). No Brasil, as espécies palmiteras mais exploradas são a Juçara (*Euterpe edulis*), nativa da Mata Atlântica e o açazeiro (*E. oleracea*), nativo da região amazônica. Entre as palmeiras cultivadas, destacam-se a pupunheira (*Bactris gasipaes*), nativa da região amazônica e a palmeira real australiana (*Archontophoenix* sp.), nativa do leste australiano.

Devido à conscientização da população mundial quanto aos problemas relacionados ao meio ambiente e à escassez de recursos naturais e ainda, da biodiversidade, os principais países produtores de palmito têm sofrido pressão para que sua obtenção não ocorra de forma predatória, a partir de palmeiras nativas. Os países consumidores mais exigentes preocupam-se, conforme dados do Instituto de Economia Agrícola - IEA, contidos em Anefalos, Tucci e Modolo (2007), não apenas com a padronização da qualidade e aparência do produto, mas também com a melhoria do processo produtivo, tanto no que diz respeito ao cuidado com o meio ambiente quanto ao cumprimento adequado de leis trabalhistas. Desde o final da década de 1990, a área

cultivada de pupunheira tem aumentado no Brasil, visto que a demanda pelo produto aumentou concomitantemente à redução do palmito extraído de matas nativas. A partir de 1988, houve grande expansão no cultivo de pupunheiras no Brasil para produção de palmito, o que promoveu a queda do percentual de palmeiras nativas extraídas (BOVI; BASSO; TUCCI, 1998) chegando, em 2005, a uma diminuição de 71%, com relação a 1990 (ANEFALOS; TUCCI; MODOLO, 2007).

Em termos agronômicos, o palmito é considerado uma hortaliça não convencional e tem recebido grande destaque no cenário do agronegócio mundial, principalmente devido à pupunheira, cuja grande aceitação no mercado externo devido às características desejáveis em comparação com as espécies exploradas indevidamente tem despertado interesse de pesquisadores e produtores no Brasil, desde a década de 1970 (ANEFALOS; TUCCI; MODOLO, 2007). Outras vantagens da pupunheira são o crescimento acelerado, a precocidade para o corte (dois anos) e o farto perfilhamento. Além disso, não escurece rapidamente depois de cortado e pode ser consumido *in natura*, na forma de saladas (BOVI, 2003). Já o palmito Juçara apresenta a desvantagem de ter o ciclo longo, estipe único e não regenerar após o corte, e o açai, apesar de apresentar perfilhamento, demora para iniciar a produção, além de fornecer palmito de menor rendimento (EMBRAPA ACRE, 2000).

Atualmente, a pupunheira está sendo cultivada em diferentes regiões do Brasil, principalmente no Sudeste. A expansão das áreas de cultivo, incluindo o semi-árido, tem sido acompanhada de uma melhoria do nível tecnológico, com a utilização de irrigações, calagens e adubações, o que tem permitido uma exploração mais precoce (FERNANDES et al., 2002).

Além do palmito, da pupunheira aproveita-se o fruto, que possui alto teor carotenóides (AGUIAR et al., 1980), como o  $\beta$ -caroteno, que tem importância nutricional como pró-vitamina A (YUYAMA et al., 1999), que é a principal fonte dietética dessa vitamina (BRITTON, 1991), além de amido (CARRERA, 1999) e óleo. O consumo do fruto ocorre *in natura*, cozido em água, fermentado para produção de bebidas, como vinho, vinagre, manteiga, azeite, farinha e pickles. De acordo com Yuyama et al. (2003), os níveis nutricionais médios do fruto variam entre 1,8 e 2,7% de proteínas, 3,5 a 11,1 % de lipídeos, 24,3 a 35% de fração livre de nitrogênio e 5,2% a 8,7% de fibras.

A pupunha vem sendo alvo de pesquisas visando identificar espécies oleaginosas nativas da Amazônia para a produção de óleo, juntamente a outras espécies potenciais como babaçu, andiroba, buriti, pinhão-manso, inajá e tucumã (EMBRAPA RONDÔNIA, 2007). Além disso, segundo Hartley (1977), seu óleo contém quantidade de ácidos graxos insaturados superior ao do azeite-de-dendê, o que demonstra sua importância nutricional e o potencial industrial na utilização do óleo do fruto.

Outras partes da planta que podem ser aproveitadas são as inflorescências, em saladas e condimentos, o pólen na apicultura (COUTO et al., 1999), as raízes como fitoterápico na cultura popular para dores de cabeça, problemas intestinais e contra vermes, as folhas para cobertura de habitações tradicionais e produção de produtos artesanais e também como ração animal devido ao alto teor protéico (7,5% de proteína bruta). De seu estipe produzem-se móveis, devido às suas características como resistência e elasticidade (MORA-URPÍ, 1984), bem como instrumentos musicais, peças decorativas, cabos para ferramentas e celulose (COUTO et al., 1999; CHAIMSOHN, 2001).

### **2.1.3 Pragas e relações com microrganismos**

Com relação a organismos causadores de doenças em plantas, segundo Pozza et al. (1999), bactérias, vírus, fungos e vermes nematódeos podem ocasionar grandes perdas em culturas, sendo portanto um fator de grande importância na agricultura. Nas regiões tradicionais do Brasil e da Costa Rica, a pupunheira é atacada por vários patógenos, principalmente fungos, desde a fase de viveiro até os plantios adultos. Dentre os patógenos que ocorrem na pupunheira, encontram-se os fungos *Colletotrichum gloesporioides*, *Bipolaris bicolor*, *Curvularia eragrostides*, *Pestalotiopsis* sp., *Dreschlera incurvata*, *Phomopsis* sp. e *Alternaria* sp., que causam manchas foliares, principalmente em plantas com estresse hídrico ou deficiência nutricional. A bactéria *Erwinia* sp. e os fungos *Fusarium* sp. e *Phytophthora palmivora* atacam o caule das plantas adultas e o coleto das plantas enviveiradas, causando podridão, seca das folhas e morte súbita das plantas (EMBRAPA FLORESTAS, 2001).

Outros microrganismos patogênicos já isolados em pupunheiras são os fungos *Monilia* sp., responsável pela podridão branca dos frutos, *Ceratocystis* sp., causador da ráquila negra, *Diplodia* sp., que provoca a podridão basal dos frutos, *Thielaviopsis paradoxa*, e *Chalaropsis* sp., causadores da podridão negra dos frutos colhidos, que também estragam as sementes, *Pestalotiopsis* sp., o fungo da mancha amarela, *Mycosphaerella* sp., da mancha parda, *Colletotrichum* sp., da mancha negra, *Desclera incurvata*, da mancha anelar e *Fusarium moniliforme*, do espessamento das nervuras. A antracnose (*Colletotrichum gloesporioides*) nas folhas mais jovens das pupunheiras causa manchas arredondadas e deprimidas, de cor amarronzada, com anéis concêntricos onde aparecem as estruturas dos fungos, cuja ocorrência é facilitada por algumas condições abióticas como vento, frio, escassez de água e fertilização inadequada (EMBRAPA FLORESTAS, 2001).

O fungo *Fusarium* sp. leva à perda do palmito, semelhantemente à *Phytophthora* sp. (SANTOS et al., 2001), cuja presença foi relatada por Santos et al. (2004), causando podridão do estipe. Grande parte das doenças que atacam as pupunheiras, portanto, é causada pelos fungos dos gêneros *Fusarium* sp. e *Colletotrichum* sp. e de bactérias como *Erwinia* sp., que causa podridão do estipe (BOVI, 1997).

Já na lavoura estabelecida, as principais pragas são a falsa broca de bananeira (*Metmasius hemipterus* Sericeus), cujas larvas atacam as touceiras e plantas em desenvolvimento, até completarem seu ciclo de vida; o bicudo de coqueiro (*Rhynchophorus palmarum* Linne), cuja larva ataca o rizoma sob a superfície ou na região do coleto das plantas fazendo galerias em direção ao centro do rizoma, provocando a perda do palmito e a morte da planta, além de serem transmissores de enfermidades fúngicas; o besouro Rinoceronte (*Strategus* sp.), que quando adulto perfura o solo abrindo galerias (ABOBOREIRA NETO; PIMENTEL, 2005).

Em condições de cultivo *in vitro*, as microplantas também podem mostrar sintomas de contaminação por organismos patogênicos. Contudo, já foi observado que a planta, nessas condições, sofre provavelmente devido ao empobrecimento nutricional e alteração do pH que antecedem a transferência, levando à redução de sua resistência, que é aproveitada por fungos endofíticos que anteriormente encontravam-se em condições de latência (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005). Além disso, quando

as condições do meio de cultura se tornam favoráveis ao desenvolvimento, as bactérias passam a competir por carboidratos e nutrientes minerais, o que compromete o desenvolvimento e a multiplicação das microplantas, podendo matá-las (PEREIRA; MATTOS; FORTES, 2003).

Em condições *in vitro*, a ocorrência de contaminação é elevada e dificulta a utilização da técnica para a multiplicação das matrizes. No entanto, já é conhecido que nem sempre tais contaminantes debilitam as plantas micropropagadas, mas ao contrário, parecem possuir uma relação simbiótica benéfica ao desenvolvimento das microplantas (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005).

Almeida, Yara e Almeida (2005) isolaram fungos de pupunheiras cultivadas *in vitro* e *in vivo* e observaram a presença de linhagens comuns às duas condições de cultivo. As sete linhagens fúngicas isoladas foram reintroduzidas em microplantas axênicas e os autores observaram que *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *Colletotrichum* sp. e *Alternaria gaisen* são responsáveis pela morte das microplantas, após 10 dias em condições *ex vitro*, por apodrecimento do sistema radicular e/ou tombamento da parte aérea. Todavia, os isolados *Epicoccum nigrum* e *Neotyphodium* sp. não causaram problemas no desenvolvimento das microplantas. Segundo os autores, essas duas linhagens de fungos podem ser caracterizadas como possíveis alternativas no controle biológico de insetos em pupunheiras, como no caso do gênero *Bradysia*, cujas larvas penetram nas plântulas e mudas atingindo a região do palmito (MORO, 1996).

Além disso, outros trabalhos têm mostrado a importância da associação da pupunheira com fungos micorrízicos arbusculares (fungos localizados no interior do córtex radicular, com estrutura dicotômica) em diferentes condições de cultivo (BOVI; BASSO; TUCCI, 1998; JANOS, 1977; RUIZ, 1993). Ensaio com inoculação de fungos micorrízicos têm demonstrado a importância da formação da micorriza no desenvolvimento da pupunheira, com uma dependência baseada na relação percentual entre a matéria seca de plantas inoculadas e não inoculadas, com variação de 17 a 125%, dependendo do genótipo da planta (CARVALHO, 1997; CLEMENT; HABTE, 1995; SILVA et al., 1998). A pupunheira é, então, conhecida por formar relações simbióticas com fungos micorrízicos vesiculares-arbusculares (VAM) para aumentar a



captura de água e nutrientes (JANOS, 1977; SUDO et al., 1996). A infecção por micorrizas nas raízes de pupunheiras pode explicar parcialmente seu desenvolvimento em solos pobres em nutrientes (CLEMENT; HABTE, 1995). O crescimento e a sobrevivência da pupunheira aumentam com a presença de micorrizas (JANOS, 1977), mas o grau de dependência em relação a elas varia entre diferentes progênies da palmeira (CLEMENT; HABTE, 1994; CLEMENT; HABTE, 1995).

A eficácia das micorrizas já foi relacionada com a concentração prévia de fósforo no solo. Em solos onde a concentração de P é menor que  $0.02 \text{ mgL}^{-1}$  em  $0.01 \text{ M CaCl}_2$ , não se observa o efeito das micorrizas, sugerindo que um mínimo de P no solo é necessário para que a micorriza tenha uma atuação efetiva (DEENIK; ARES; YOST, 2000). Em solos contendo níveis mais altos de P ( $>0.04 \text{ mg L}^{-1}$ ), não se encontra resposta à adição de níveis de P, tanto com ou sem micorrizas presentes nos tratamentos (CLEMENT; HABTE, 1994). A inoculação com micorrizas e bactérias diazotróficas aumenta a produção de matéria seca e a eficiência do uso de N e P em mudas de pupunheiras sem espinhos (CARVALHO, 1997).

Postula-se que a associação entre micorriza e planta seja multifuncional, pelo seu papel na ciclagem de nutrientes, principalmente o fósforo, na proteção da planta contra patógenos e seca, dentre outros efeitos, o que reforça a teoria de que poderiam ter co-evoluído nas comunidades vegetais (SMITH; READ, 1997).

Bactérias endofíticas são encontradas em tecidos saudáveis de várias espécies de plantas, em diferentes estádios de desenvolvimento (STURZ, 1995; PALUS et al., 1996). Isso ocorre devido às plantas fornecem um ambiente propício ao desenvolvimento de inúmeras populações de bactérias endofíticas, muitas das quais não são cultiváveis e por isso são de difícil identificação. A presença dos endofíticos pode afetar a fisiologia do hospedeiro, consumindo produtos da fotossíntese (considerando-se os endófitos como heterotróficos) ou metabólitos tóxicos (BATAGIN, 2008).

A pupunha já teve os seguintes microrganismos endofíticos isolados: *Thielaviopsis paradoxa*, *Ceratocystis paradoxa*, *Phomopsis* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* de plantas cultivadas no campo (*in vivo*) (COSTA NETO, 2002), *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*, *Neotyphodium* sp., *Epicoccum nigrum*,

*Colletotrichum* sp. e *Alternaria gaisen* de plantas cultivadas *in vitro* e *in vivo* (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005), os endosimbiontes *Moraxella* sp e *Brevibacillus* sp. (ALMEIDA et al., 2009). Apesar da identificação de diferentes microrganismos vivendo como endofíticos em pupunheiras, acredita-se que diversos outros ainda não foram identificados, e podem exercer funções metabólicas importantes para o desenvolvimento dessa espécie *in vitro*.

## 2.2 Micropropagação

A técnica de micropropagação, ou propagação assexual *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990), pode ser definida como um conjunto de técnicas nas quais células, conjunto de células ou fragmentos de tecidos vivos são isolados e cultivados em condições assépticas, por períodos indeterminados, em um meio nutritivo e sob condições ambientais controladas. No caso de vegetais, essa definição deve ser mais ampla, abrangendo diversos tipos de explantes a serem utilizados, desde protoplastos até plântulas (TORRES; CALDAS, 1990; MROGINSKI; ROCA, 1993).

Dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente são algumas das principais razões que justificam o uso de técnicas de micropropagação (KAJIKI, 1996). Dentre as finalidades da micropropagação destacam-se a propagação intensiva de novas variedades e espécies, a limpeza de vírus, a manutenção de germoplasma e suas aplicações em programas de melhoramento genético (TOMBOLATO; COSTA, 1998). A propagação de plantas *in vitro* fornece ao produtor mudas de alto padrão em quantidade suficiente para atender à demanda em curto espaço de tempo. No entanto, algumas dificuldades ainda são encontradas no Brasil e dificultam o desenvolvimento do setor de micropropagação, como a falta de protocolos adequados para cada espécie, tanto com relação à fonte dos explantes quanto aos meios nutritivos, a escassez de pessoal especializado, dificuldades técnicas na assepsia, a necessidade de melhorar o processo de aclimatização com baixo custo e o risco de introdução de patógenos com a introdução de novas espécies e escassos recursos para pesquisa (TOMBOLATO; COSTA, 1998).

Todas as espécies de plantas têm virtualmente potencial para serem formadas via micropropagação, desde que sejam submetidas a condições adequadas de nutrição, reguladores vegetais e clima (HARTMANN; KESTER; DAVIES, 1997). A potencialidade celular e o balanço hormonal podem ser considerados os princípios mais importantes sobre os quais se baseia a cultura de tecidos (VILLALOBOS; THORPE 1993; KERBAUY, 1999).

A micropropagação pode utilizar embriogênese de células somáticas, formação de brotações adventícias ou brotações axilares forçadas e a produção de calo pode preceder os processos embriogênicos e a formação da brotação adventícia. As brotações adventícias e axilares devem posteriormente emitir raízes adventícias para se obter a planta (MURASHIGE, 1977).

Na composição dos meios nutritivos, diversos componentes variáveis em função da espécie vegetal e da origem do explante são necessários. Os principais componentes de uso mais freqüente nos meios de micropropagação são, conforme Torres e Caldas (1990): água, macronutrientes, micronutrientes, fontes de carbono (sacarose, glicose ou frutose); vitaminas e aminoácidos (considerados essenciais: tiamina – vitamina B<sub>1</sub>; ácido nicotínico – niacina; piridoxina (vitamina B<sub>6</sub>) – Glicina e Mio-inositol); reguladores de crescimento, sendo que os principais utilizados em cultura *in vitro* são as auxinas e as citocininas, e as substâncias mais utilizadas como auxinas são AIA (ácido 3-indolilacético), ANA (ácido alfa-naftalenoacético), AIB (ácido indol-3-butírico), 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e  $\beta$ -NOA (ácido  $\beta$ -naftoxiacético) e como citocininas o BAP [N-benzil-9-(2-tetrahidropiranyl)-adenina], a cinetina [KIN (6-furfurilamino-purina)], BAP ou 6-BA (6-benzilamino-purina) e zeatina (N<sup>6</sup>-4-hidroxi-3-metilbut-2 enil amino-purina). Além desses reguladores, é comum a utilização de giberelinas, como o GA<sub>3</sub> (ácido giberélico) e de inibidores, como o ABA (ácido abscísico); extratos orgânicos, como água de coco, extrato de malte, sulfato de adenina e suco de tomate; agar e géis. A acidez do meio de cultura para a maioria das plantas situa-se de 5.5 a 6.0.

Um dos primeiros protocolos de cultura de embriões envolvendo palmeiras foi publicado por de Guzman e del Rosário em 1964, para o coqueiro Makapuno e

posteriormente outros também foram estabelecidos (ASSY-BAH; DURAND-GASSELIN; PANNETIER, 1987; RILLO; PALOMA, 1992; ASHBURNER et al., 1995).

Em pupunheiras, protocolos de organogênese e embriogênese somática foram estabelecidos por Arias e Huete (1983), Stein e Stephens (1991), Almeida (1994), Almeida e Kerbauy (1996) e Almeida e Almeida (2006). Atualmente, matrizes selecionadas de pupunheiras estão sendo objeto de investigações e avaliações sobre seu desenvolvimento e sua interação com microrganismos endofíticos (ALMEIDA; YARA; ALMEIDA, 2005; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006) e endossimbiontes (ALMEIDA et al., 2009).

A técnica de clonar células isoladas *in vitro* tem mostrado que células somáticas, sob condições apropriadas, podem se diferenciar em uma planta inteira (RAZDAN, 1993). Esse potencial de uma célula crescer e se desenvolver em um organismo multicelular e com tecidos diferenciados é denominado totipotência celular. Uma vez que o potencial consiste principalmente na diferenciação celular, isso indica que todos os genes responsáveis pela diferenciação estão presentes em células individuais e muitos deles que permanecem inativos em diferentes tecidos ou órgãos são capazes de se expressar apenas sob condições específicas de cultura. O desenvolvimento de um organismo adulto a partir de uma célula simples é o resultado da integração da divisão e da diferenciação celular. Células isoladas de tecidos já diferenciados geralmente não sofrem divisão e são quiescentes. Para expressarem sua totipotência a célula primeiramente sofre desdiferenciação e posterior rediferenciação. Em plantas, a cultura de tecidos é uma excelente oportunidade de se estudar fatores responsáveis pela diferenciação de células. Esses fatores controlam a totipotencialidade celular através da diferenciação citológica, histológica e organogênica (RAZDAN, 1993).

A embriogênese somática é o processo pelo qual uma célula ou grupo de células iniciam uma rota de desenvolvimento que leva à regeneração de embriões não zigóticos capazes de germinar e formar plantas completas. Sob condições naturais esse padrão pode ocorrer com algumas espécies, como citros, mas na cultura de tecidos a embriogênese somática ocorre com muito mais frequência e como alternativa à organogênese para a regeneração de plantas inteiras. Esse processo morfogênico depende da coordenação entre a célula ou as células em estabelecer uma polaridade

como unidade e então iniciar a atividade gênica específica resultando em regiões de tecidos. Essas estruturas bipolares germinam desenvolvendo plântulas em condições de cultura específicas e, dessa forma, um aparato sexual completo não é um pré-requisito para a embriogenia em cultura de tecidos (RAZDAN, 1993), o que torna essa técnica muito útil principalmente para espécies recalcitrantes, como é o caso da pupunheira.

É notável, portanto, a importância da ampliação das pesquisas com a pupunheira principalmente no que diz respeito à otimização das técnicas de cultivo das mesmas. Muitas são as áreas de pesquisa com essa espécie, abrangendo, por exemplo, fisiologia (BOVI; MARTINS; SPIERING, 2004; OLIVEIRA et al., 2005), nutrição mineral (MARIANO et al., 2004), fitopatologia (PIZZINATTO et al., 2001; SANTOS et al., 2004), trato cultural (ALVES Jr. et al., 2005) e propagação vegetativa *in vitro* (ALMEIDA, 1994; ALMEIDA, KERBAUY, 1996; ALMEIDA; ALMEIDA, 2006; STEINMACHER; CLEMENT; GUERRA, 2007).

Apesar de a técnica *in vitro* ser promissora para a obtenção de propágulos, ela apresenta uma série de dificuldades, como a morosidade na resposta a estímulos morfogênicos e aclimatização das microplantas.

### **2.3 Nutrição Mineral**

A absorção é um processo pelo qual o elemento passa do substrato (solo, solução nutritiva) para uma parte da célula (parede, citoplasma, vacúolo) (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A região apical da raiz possui altas taxas de absorção de nutrientes, devido à demanda destes nos tecidos e à disponibilidade dos nutrientes no solo ou meio de cultura circundante (AMARAL, 2003).

De acordo com Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), para que o elemento penetre na raiz é necessário, obviamente, que ele entre em contato com a mesma. Esse contato pode ocorrer via três processos distintos: o primeiro é a interceptação celular, na qual a raiz encontra o elemento na solução do solo, durante seu desenvolvimento. Nesse caso, o elemento tem que estar presente na solução do solo, para que possa ser absorvido. O segundo é o fluxo de massa, no qual o elemento em uma fase aquosa móvel (solução do solo) movimenta-se de uma região mais úmida, distante da raiz, a

outra mais seca, próxima da superfície radicular. E o terceiro é a difusão, que consiste no movimento espontâneo do elemento causado pela agitação térmica a favor do gradiente de concentração, ou seja, de uma região com maior concentração (a solução do solo) para uma de menor concentração (a superfície da raiz). Sempre que a interceptação radicular e o fluxo de massa não forem capazes de fornecer o elemento em quantidade suficiente (como é o caso do nitrogênio e do potássio), a necessidade deve ser satisfeita pelo processo de difusão.

Quanto aos mecanismos de absorção, pode-se considerar a absorção passiva e a ativa. Na passiva, o elemento adentra a célula sem que esta gaste energia, obedecendo sempre a um gradiente de concentração, sendo a maior concentração na porção exterior da célula e a menor na parede celular, espaços intercelulares e superfície externa da membrana plasmática, que delimitam o espaço livre aparente e a quantidade de elemento nele contida corresponde a cerca de 15% do total absorvido. Essa entrada ocorre por fluxo de massa, difusão, troca iônica ou equilíbrio de Donnan (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Os mecanismos de absorção passivos são rápidos e reversíveis, ou seja, o elemento contido no espaço livre aparente pode sair dele. A passagem passiva ocorre através de canais iônicos, que são enzimas com alta velocidade de renovação que aumentam a velocidade de passagem de íons orgânicos ou minerais, água e eletrólitos através das membranas da célula, do vacúolo e de outras organelas (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Os canais abrem e fecham em decorrência da mudança de conformação das proteínas causadas pelas variações da voltagem, da concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  e de  $\text{H}^{+}$ , fosforilação e ácidos graxos. Para o  $\text{K}^{+}$ , já foram identificados diversos canais em plantas, 3 para  $\text{Cl}^{-}$ , 3 para  $\text{Ca}^{+2}$  e um para  $\text{H}^{+}$ .

No transporte ativo, por sua vez, os elementos atravessam a membrana celular e/ou o tonoplasto com gasto de energia fornecida pela respiração, visto que o sentido do transporte é da região de menor para a de maior concentração (espaço livre aparente). Trata-se de um mecanismo lento e irreversível, e o elemento só deixa o citosol ou o vacúolo caso suas respectivas membranas sejam danificadas. Já no caso do transporte ativo secundário, a energia utilizada é aquela armazenada em gradientes de potencial eletroquímico, para transportar substâncias. Quando prótons são

eliminados no citosol por  $H^+$ -ATPases atuando na membrana plasmática e no tonoplasto, é criado um potencial de membrana e um gradiente de pH às custas da hidrólise do ATP. Esse gradiente de potencial eletroquímico representa energia livre armazenada na forma de gradiente  $H^+$  e diversas substâncias aproveitam esse gradiente para serem transportadas juntamente com o  $H^+$ , mesmo estando contra seu gradiente de concentração. Esse transporte junto com o gradiente de prótons pode ocorrer de duas formas, o simporte (no mesmo sentido através da membrana) e o antiporte (em sentido oposto). Nos dois casos, o íon ou soluto a ser transportado simultaneamente aos prótons move-se contra seu gradiente de potencial eletroquímico, tratando-se, portanto, de transporte ativo. Contudo, a energia motriz é fornecida pelos prótons e não diretamente pela hidrólise do ATP (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As plantas absorvem diversos elementos sem muita discriminação. No entanto, nem sempre o que foi absorvido tem uma função benéfica para elas. Na verdade, alguns elementos absorvidos podem prejudicar seu desenvolvimento. Diante disso, existe uma classificação dos nutrientes nas plantas, que os separa em essenciais, benéficos e os que podem causar a morte (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Para ser considerado essencial, o elemento deve satisfazer pelo menos um dos dois critérios de essencialidade, o direto ou o indireto: no direto, o elemento participa de alguma reação ou composto, sem o qual a planta não pode viver; já no indireto, a planta não consegue completar seu ciclo de vida sem o elemento, ou o elemento não pode ser substituído por nenhum outro e tem efeito direto na vida da planta, sua ação não consistindo na anulação de condições físicas, químicas ou biológicas desfavoráveis presentes no substrato (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). O autor lista os elementos considerados essenciais [não contando o C (carbono), H (hidrogênio) e O (oxigênio)], sendo os macronutrientes: N (nitrogênio), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio) e S (enxofre) e os micronutrientes: B (boro), Cl (cloro), Co (cobalto), Cu (cobre), Fe (ferro), Mn (manganês), Mo (molibdênio), Ni (níquel), Se (selênio), Si (silício) e Zn (zinco). Há indicações de que o Si poderia ser considerado micronutriente por satisfazer o critério indireto e o Na, no caso de uma halófito, já satisfaz tal critério. Algumas espécies C-4 necessitam de Na como elemento essencial.

A separação entre macro e micronutrientes baseia-se na concentração do elemento na matéria seca da planta, o que reflete as quantidades exigidas pelo solo, ou contidas no adubo ou fornecidas por ambos durante o processo de formação da colheita. No caso dos macronutrientes, a concentração é dada em kg/ha e dos micronutrientes em g/ha, ou seja, mil vezes menos. Além disso, os teores dados em nutrição mineral de plantas são em forma elementar: P no lugar de  $P_2O_5$ , K no lugar de  $K_2O$ , e assim sucessivamente. Vale lembrar também que *teor* refere-se à concentração (porcentagem ou g/kg, mg na matéria fresca ou seca), ao passo que *conteúdo* é a quantidade do elemento (micrograma, mg, g, kg) num determinado peso (g, kg, t) de material vegetal (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

A absorção dos íons minerais depende da afinidade entre o nutriente e o mecanismo de absorção da raiz (MENGEL; KIRKBY, 1987). Assim, tanto na solução do solo quanto nos meios nutritivos, os sais de  $KNO_3$ ,  $CaCl_2$  e  $MgSO_4$  são primeiramente ionizados para depois serem absorvidos pelas raízes através das membranas celulares, via transportadores específicos e posteriormente transportados até as regiões de crescimento pelo fluxo de transpiração através do xilema.

Esses transportadores são em geral proteínas carreadoras, que possuem poros que se estendem completamente através da membrana. No transporte mediado por um carreador, a substância a ser transportada inicialmente tem uma localização restrita específica na proteína carreadora, permitindo-a ser altamente seletiva ao substrato. A ligação substrato-carreador provoca uma transformação na conformação da proteína que expõe o substrato à solução do outro lado da membrana e o transporte é completo quando a substância dissocia-se do carreador (TAIZ; ZEIGER, 2004).

A captura de nitrato, bem como de fosfato e sulfato do solo, são um desafio para as plantas, pois a concentração deles no solo pode variar de duas a três ordens de magnitude e porque sua captura freqüentemente ocorre contra um gradiente de concentração e elétricos. Assim, as plantas desenvolveram sistemas ativos de transporte regulados em resposta a mudanças ambientais e condições internas (CHRISPEELS; CRAWFORD; SCHROEDER, 1999).

Análises fisiológicas da captura iônica pelas raízes das plantas mostram classes distintas de atividades de transporte reguladas (CLARKSON; LUTTGE, 1991; von



WIREN et al., 1997; CRAWFORD; GLASS, 1998). O trabalho original de Epstein classificava essas atividades em dois mecanismos, sendo que o primeiro opera na concentração abaixo de 200  $\mu\text{m}$  e se comporta como um carreador por saturação (EPSTEIN, 1966). Em altas concentrações, o segundo mecanismo entra em ação e pode mostrar uma cinética de atuação linear ou de múltipla saturação. Esses transportes podem também ser chamados de baixa afinidade (LATS – low-affinity transport system, na sigla em inglês) e de alta afinidade (HATS – high-affinity transport systems, na sigla em inglês), sendo que esse último possui dois subtipos, que diferem entre si por terem transportadores induzidos pelo tempo de exposição ao substrato (iHATS) ou ativos constitutivamente (cHATS) (CAMARGOS, 2002). Tanto o sistema de baixa afinidade quanto os de alta são eletrogênicos, ou seja, quando as células da planta estão expostas a nitrato, sulfato ou fosfato, ocorre a indução da despolarização da membrana, deixando o interior da célula mais positivo, seguindo-se uma repolarização da membrana, que pode ser atribuída ao aumento da atividade  $\text{H}^+$ -ATPase na membrana. A amplitude da despolarização inicial é inversamente proporcional ao pH da solução circundante e está associada à alcalinização no ambiente celular (CHRISPEELS; CRAWFORD; SCHROEDER, 1999). Esses dados indicam que a captura de ânions requer cotransporte de dois ou mais prótons para cada ânion, embora a hipótese de antiporte com hidróxido não deva ser rejeitada.

Para fosfato e sulfato, a atividade dos transportadores da alta afinidade diminuem quando esses nutrientes são escassos. Já para o nitrato, os HATS são induzidos pela presença do nitrato e são inibidos por feedback negativo quando o nitrogênio é escasso ou está na forma orgânica. Essas respostas permitem às plantas ajustarem a entrada de ânions conforme as condições do ambiente externo e de seu metabolismo (CHRISPEELS; CRAWFORD; SCHROEDER, 1999). Mudanças externas interferem, portanto, no nível de síntese dos transportadores, sugerindo que a regulação pode ser mediada por alguns outros fatores, incluindo o fitocromo, compostos metabolizados e suprimento de nitrogênio inorgânico (ONO; FROMMER; WIRÉ, 2000).

### 2.3.1 Micronutrientes

Os micronutrientes desempenham papel importante como constituintes de estruturas orgânicas, ativadores de enzimas, carreadores de elétrons e osmorreguladores. Também funcionam como reguladores do metabolismo, na reprodução e proteção contra estresses bióticos e abióticos (SHARMA, 2006). O boro, por exemplo, é essencial na composição da parede celular (O'NEILL et al., 2004), no desenvolvimento do citoesqueleto (YUYAMA et al., 2003) e na extensão da célula (O'NEILL et al., 2001). O boro juntamente com o zinco é importante na estrutura e função das membranas e alterações do suprimento desses pode levar a alterações na sua fluidez, aumentando a permeabilidade (SHARMA, 2006).

O ferro, zinco, manganês, cobre e molibdênio constituem uma série de oxireduases envolvidas em reações metabólicas básicas desde captura de íons, metabolismo mineral, fotossíntese, respiração, fixação de nitrogênio, vias biossintéticas (cofatores) e mecanismos de defesa. A clorina, junto com o macronutriente potássio, é importante nas mudanças de turgor das células guarda que regulam a abertura do estômato. A clorina também desempenha um importante papel osmorregulatório sob condições de estresse salino (SHARMA, 2006).

A biossíntese de giberelinas, por exemplo, um dos maiores sinalizadores em plantas (SUN; GUBLER, 2004), envolve a atividade de diversas enzimas ativadas por micronutrientes, como  $Mn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ . Na biossíntese do ácido jasmônico, o ferro é um cofator importante (FEUSSNER; WASTERACK, 2002), bem como na catalização da biossíntese de etileno (SHARMA, 1996).

O molibdênio tem papel na síntese do ácido abscísico (ROMAO et al., 1995). No caso de defesa contra ROS (espécies reativas de oxigênio, na sigla em inglês), as superóxido-desmutases são muito importantes, e possuem micronutrientes como cofatores, como Fe-SOD, Mn-SOD e Cu-Zn-SOD. As mitocôndrias possuem alta atividade de Mn-SOD e os cloroplastos de Cu-Zn-SOD e Fe-SOD. O citosol mostra também atividade de Cu-Zn-SOD. Assim, os micronutrientes contribuem para defesa contra o estresse oxidativo (GUPTA et al., 1993; PERL et al., 1993; SLOOTEN et al., 1995; VAN CAMP et al., 1996). Um declínio na atividade de enzimas antioxidantes

devido à limitação da disponibilidade dos cofatores metálicos enfraquece os mecanismos de defesa antioxidantes e expõe a planta aos danos das ROS.

Os micronutrientes também estão envolvidos na proteção contra patógenos. O Mn, Cu e B estão envolvidos no metabolismo de compostos fenólicos e sua polimerização como lignina e suberina, que aumentam a espessura da parede celular, tornando a planta menos suscetível à entrada de organismos patogênicos (MEHDY, 1994).

As funções dos micronutrientes não estão limitadas a uma parte específica da planta, célula ou compartimento. Assim, eles devem estar disponíveis em todas as partes funcionais em concentrações adequadas às necessidades bioquímicas demandadas, o que requer um mecanismo para sua homeostase. Isso envolve a indução de sistemas de transporte de alta afinidade em resposta à deficiência e um mecanismo de captura subcelular sob condições de excesso. O mecanismo de alta afinidade para captura de ferro, por exemplo, é regulado pela falta dele (BERECZKY et al., 2003).

O mecanismo ativo de captura de boro é induzido pela sua deficiência (DANNEL; PFEFFER; ROMHELD, 2002). O zinco regula a captura de fósforo por regular genes que codificam o transportador de fosfato de alta afinidade (HUANG et al., 2000).

Como cofatores de enzimas catalisadoras em reações redox e metaloproteínas funcionando como carreadoras de elétrons, os micronutrientes participam da cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias e cloroplastos, mediando o fluxo de elétrons de uma molécula para outra. Em certas etapas, o transporte de elétrons é acoplado à geração de moléculas ricas em energia (ATP) e na produção de poder redutivo (NAD(P)H), necessários para a ocorrência das reações metabólicas principais. Nos diferentes estágios de oxidação o Mn permite o acúmulo de carga para produção de poder redutor necessário à foto-oxidação da água na reação inicial do fotossistema II da fotossíntese (SHARMA; KUMAR; BISHT, 2006). Já o molibdênio atua no processo de fixação simbiótica do nitrogênio e em outros processos fisiológicos, participando ativamente como cofator integrante nas enzimas nitrogenase, redutase de nitrato e oxidase de sulfato, e está intensamente relacionado com o transporte de elétrons

durante as reações bioquímicas. A falta de Mo no solo irá causar menor síntese da enzima nitrogenase, com conseqüente redução da fixação biológica do nitrogênio.

No transporte de elétrons mitocondrial, o ferro e o cobre atuam como cofatores de proteínas transportadoras de elétrons da membrana mais interna da mitocôndria. No transporte de elétrons fotossintético, o Mn constitui o complexo PS II, e está envolvido com a oxidação da molécula de água; o ferro e o cobre estão relacionados no transporte de elétrons através do fotossistema II e fotossistema I e em coordenar o fluxo de elétrons do PS II para o PS I. A proteína ferredoxina recebe os elétrons do P 700 e os doa para a ferredoxina-NADP redutase. Esta catalisa a produção de NADPH, que por sua vez serve como redutor no Ciclo de Calvin (SHARMA, 2006).

Com relação à reprodução das plantas, diversos estudos apontam para um envolvimento mais direto dos micronutrientes no desenvolvimento reprodutivo (GRAHAM, 1975; DELL, 1981; SHARMA; RAMCHANDRA, 1990; SHARMA et al., 1991; PANDEY; SHARMA, 1996).

O zinco parece estar envolvido na divisão e expansão de células florais em *Arabidopsis*, petúnia e repolho da China (TAKATSUJI, 1999), bem como no desenvolvimento do gametófito feminino e desenvolvimento da semente (GROSSNIKLAUS et al., 1998; BRIVE et al., 2001).

O desenvolvimento reprodutivo também pode ser inibido devido aos micronutrientes não atingirem adequadamente os tecidos reprodutivos pelas limitações morfológicas ou transporte ineficiente (BROWN et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2003) como, por exemplo, a falta de nicotinamida, que possui um papel na quelação e transporte de longa distância de micronutrientes catiônicos, como Zn, Cu e Mn (WELCH, 1995; Von WIREN et al., 1999).

Existe uma demanda quantitativa dos micronutrientes para um desempenho ótimo de seus papéis, e um desvio desse ótimo tem como conseqüência aberrações estruturais, funcionais e de desenvolvimento nas respostas adaptativas das plantas.

O níquel é absorvido como  $Ni^{2+}$  e transportado pelo xilema como quelados orgânicos aniônicos. Faz parte da composição da enzima urease que catalisa a decomposição hidrolítica da uréia no tecido vegetal e no animal: a soja, em meio pobre em Ni, mostra necrose na ponta dos folíolos, o que corresponde a um teor elevado de

uréia, da ordem de 25g/kg. Em gramíneas, os sintomas de toxidez consistem em clorose ao longo das nervuras, podendo a folha toda ficar esbranquiçada e mostrar necrose nas margens. Nas dicotiledôneas há uma clorose intervenal parecida com a deficiência de Mn (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

O selênio possui sítios de absorção que competem com os do enxofre. Ele é incorporado em aminoácidos análogos aos que contém enxofre (selenocisteína, selenometionina, por exemplo), mas o selenato parece inibir a absorção do fosfato (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

O sódio, ativamente absorvido como  $\text{Na}^+$ , em geral favorece a absorção de  $\text{K}^+$ , especialmente quando este se encontra em baixas concentrações. *Atriplex vesicaria*, uma halófito da família Chenopodiaceae, satisfaz o critério indireto de essencialidade com respeito ao Na, pois na sua ausência as folhas ficam cloróticas e podem mostrar manchas necróticas nas pontas e ao longo das margens, o crescimento para e as plantas morrem. Após receberem sódio na solução nutritiva por uma semana as plantas se recuperam (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

O boro, sendo pouco móvel, ainda não tem todas suas funções fisiológicas bem esclarecidas até o momento (VERÍSSIMO et al., 2006). As principais funções atribuídas ao boro são o metabolismo e transporte de açúcares via membranas (MALAVOLTA; BOARETTO; PAULINO, 1991; TAIZ; ZIEGER, 2004), síntese de ácidos nucléicos e reguladores vegetais, formação da parede e divisão celular (DECHEN et al., 1991). Também tem papel na formação de pectina, nos ápices vegetativos, no floema, na formação dos frutos, raízes e flores, na absorção de água e no metabolismo dos glicídios (BASSO; SUZUKI, 2001). O boro é um elemento importante na absorção radicular do cálcio, além de ajudá-lo em sua função (BRAKEMEIER, 1999), e sua redução acarreta redução na lignificação (menor diferenciação do xilema) e aumento das substâncias pécticas e calose no floema, reduzindo o transporte de carboidrato, diminuindo a quantidade de citocinina nas raízes, além de causar necrose e morte de pontos de crescimento (MALAVOLTA; BOARETTO; PAULINO, 1991).

### 2.3.2 Macronutrientes

Nas culturas, a demanda do fósforo é muito menor que a de N, aparecendo como matéria seca com teores da ordem de décimos de um por cento.

O ácido ortofosfórico,  $H_3PO_4$ , dá por dissociação três espécies iônicas, dependendo do pH do meio:  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  e  $PO_4^{-3}$ . Na faixa de pH que vai de 4 a 8, onde as plantas se encontram, predomina o  $H_2PO_4^-$ . A absorção de P é fortemente influenciada pela concentração de  $Mg^{+2}$  no meio, e o efeito é sinérgico. Além disso, as micorrizas, aumentando a superfície absorvente, promovem maior absorção do  $H_2PO_4^-$ . O P absorvido em forma mineral é rapidamente incorporado em compostos orgânicos, sendo que o transporte no xilema se faz principalmente na forma de  $H_2PO_4$ , podendo aparecer também como fosforil colina e ésteres de carboidrato. Altas concentrações de Ca, Cu, Fe, Zn e um pH pouco ácido também podem determinar precipitação do fosfato inorgânico nos vasos do xilema. A redistribuição de P pelo floema é das mais rápidas, e a principal forma que aparece é a fosforil colina. No caso de deficiência, o P não metabólico localizado no vacúolo pode sair redistribuindo para os órgãos mais novos, que param de crescer quando acaba tal reserva (MALAVOLTA, 1980).

O P possui variadas funções na vida da planta. É constituinte das membranas fosfolipídicas; compõe o principal composto armazenador de energia e responsável por transferi-la para a promoção de processos endergônicos, o trifosfato de adenosina (ATP); na fotossíntese, faz parte das moléculas de ATP e NADPH, chamado de poder redutor, gerado na fase luminosa e empregado na fase escura para fixar o  $CO_2$  reduzindo-o ao nível de carboidrato e, em plantas C3, o aceitador de gás carbônico é um composto duplamente fosforilado, a ribulose-1,5-difosfato (RuDP), que dá duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA), numa reação catalisada pela enzima RuDP-carboxilase. A fixação de  $CO_2$  via composto de 4 átomos de carbono (C4) também ocorre devido a um composto fosforilado, o ácido fosfoenolpirúvico (PEP) que, sob a ação da PEP-carboxilase, produz ácido oxaloacético (AOA).

Além disso, o fósforo faz parte da enzima que catalisa a biossíntese de amido, fornece energia contida no ATP para produção de ácidos graxos, absorção ativa de nutrientes, penetração das raízes no solo, entre outros. Devido a seu papel na síntese

de proteínas, sua falta reflete no menor crescimento da planta, e os frutos e sementes acumulam quantidade menores, o mesmo acontecendo com o Mg, que acompanha o fósforo. Quando ocorre carência de P, há uma rápida redistribuição dos tecidos mais velhos para os mais jovens e por isso as partes mais velhas, como folhas, são as primeiras a mostrarem sintomas na forma de coloração verde-azulada ou com coloração roxa da antocianina (MALAVOLTA, 1980).

O S faz parte dos aminoácidos cisteína, cistina e metionina. A tiamina, biotina e a coenzima A são coenzimas de baixo peso molecular, essenciais para o metabolismo enzimático. As ferredoxinas, que são proteínas com ferro que não apresentam o grupo heme e são importantes na fotossíntese, na fixação biológica do  $N_2$  atmosférico e em outras reações de transferência de elétrons, contêm S em quantidades equivalentes ao ferro presente. Os compostos de S desempenham importante papel na estrutura das proteínas, compondo sua estrutura secundária, com pontes dissulfeto. Os aminoácidos contendo enxofre fornecem as ligações de dissulfeto (da cisteína) para a ligação de duas cadeias ou para a formação de anéis estáveis numa mesma cadeia. Os grupos sulfidrilo (SH) fornecem sítios para ligação de cátions metálicos podendo afetar a estrutura secundária devido à conformação da cadeia protéica ao redor do metal. Esses grupos SH ainda podem funcionar como locais para a formação de pontes de hidrogênio e para a ligação dos grupos prostéticos (não proteicos) das enzimas. Os grupos tioéster ( $S-CH_3$ ) da metionina, por serem hidrofóbicos, podem afetar a estrutura terciária devido à interação com outros grupos hidrofóbicos da cadeia.

Os grupos SH nas proteínas enzimáticas podem ser o sítio de ligação enzima-substrato, outros grupos de S funcionam como carreadores na oxidação de alfa cetoácidos. A biotina, por exemplo, está relacionada com a fixação não fotossintética de  $CO_2$  e com reações de descarboxilação. O S também é componente essencial do anel de tiazol da tiamina, uma vitamina como a biotina, que pode estar na forma livre ou atuar como coenzima. A falta de S, portanto, segundo o autor supracitado, pode provocar diversos grandes distúrbios metabólicos, como diminuição na fotossíntese e na atividade respiratória, queda na síntese de proteínas com o aparecimento de altas relações de N solúvel/N protéico, redução no teor de gorduras, acúmulo de carboidratos solúveis com elevação da relação C solúvel/C amido e diminuição na fixação livre e

simbiótica do  $N_2$  do ar. O sulfato é transportado predominantemente da base da planta para cima, razão pela qual em casos de carência os sintomas aparecem primeiramente nos órgãos mais novos, como as folhas mais jovens

Já dentre os macronutrientes catiônicos, que são K, Ca e Mg, o K é o mais exigido e sua maior proporção encontra-se em órgãos vegetativos. Esse elemento também é mais exigido por plantas produtoras de amido, açúcar e fibras e, além disso, as gramíneas possuem relativamente mais K que as leguminosas, que por sua vez exigem maiores quantidades de Ca. O K pode ser encontrado na litosfera em maior proporção na forma de diferentes minerais, principalmente silicatos e é absorvido pelas raízes em forma iônica ( $K^+$ ), sendo o processo essencialmente ativo com a solução do solo servindo como fonte do nutriente. O excesso de  $Ca^{+2}$  e de  $Mg^{+2}$  determinam menor absorção do potássio, provavelmente por inibição competitiva. Após absorvido, o K é levado à parte aérea via xilemática e floemática. Depois vai das folhas mais velhas para as mais jovens, para as regiões de crescimento, frutos, via floema. Isso ocorre, em parte, devido a cerca de 75% do potássio total da planta encontrar-se no tecido em forma solúvel.

As funções e exigências do K são comparáveis às de N, contudo o potássio não possui função estrutural na planta. Atua na regulação da turgidez do tecido, de modo que a quantidade de água a ser armazenada no tecido depende em grande parte do suprimento celular de potássio, ou seja, quanto mais potássio na célula, mais água acumulada, criando condições favoráveis para as reações da fotossíntese e outros processos metabólicos. Atua também na ativação de inúmeras enzimas, como algumas das reações de fosforilação e de síntese de proteínas, na abertura e fechamento dos estômatos, no transporte de carboidratos, na transpiração (plantas bem supridas com K usam melhor a água), na resistência à geada, seca e salinidade e na resistência a doença, na resistência ao acamamento. Alguns sintomas de carência de K, que se manifestam primeiramente em folhas mais velhas, devido à rapidez na distribuição, são clorose seguida de necrose nas pontas e margens (MALAVOLTA, 1980).

Quanto ao cálcio, no solo pode ser encontrado nas formas principais de carbonatos, sulfatos, silicatos, nas formas trocável e solúvel. É absorvido pelas raízes



como  $\text{Ca}^{+2}$ , sendo sua absorção diminuída por concentrações elevadas de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{NH}_4^+$  no meio. A maior parte é transportada pelo xilema, através de reações de troca em vasos condutores mais que por fluxo de massa, sendo que o  $\text{Ca}^{+2}$  é deslocado dos sítios de troca por outros cátions como Mg, Mn e Zn, tornando-se, após atingir a folha, pouco móvel. Ao contrário do potássio, portanto, o cálcio encontra-se em formas não solúveis em água dentro da planta, e grande parte do cálcio insolúvel está na parede celular, como pectato de cálcio na lamela média, que aumenta sua rigidez. Em células mais maduras o cálcio pode estar presente nas formas de carbonato, oxalato, sulfato, fosfato, tartarato ou citrato. Sais de cálcio ocorrem mais freqüentemente nos vacúolos de células especializadas e são chamados de idioblastos, com predomínio de oxalatos. A insolubilidade dos compostos de Ca da planta e sua localização na célula explicam em parte a falta de redistribuição em condições de deficiência, o que ocasiona falta nos órgãos mais jovens, como gemas e pontas da raiz. Em folhas a falta de Ca é vista na forma de clorose nas mais jovens, que em geral caminha das margens para o centro (MALAVOLTA,1980).

Além da função estrutural de integrar a parede celular, o cálcio tem papel na absorção iônica. A falta de cálcio pode afetar os pontos de crescimento da raiz, levando ao aparecimento de células com núcleos poliplóides, ou binucleadas, ou com divisões amitóticas, levando ao escurecimento e morte. O Ca é indispensável para a germinação do grão de pólen e para o crescimento do tubo polínico, sendo também importante para o crescimento do ginóforo em amendoim.

O magnésio aparece no solo na forma de minerais primários, como silicatos, carbonatos e sulfatos, minerais secundários, matéria orgânica, trocável e solúvel. Considera-se disponível para a planta tanto o  $\text{Mg}^{+2}$  trocável quanto o existente na solução do solo. A energia de retenção do Mg pelo complexo de troca é menor que a relativa ao  $\text{Ca}^{+2}$  e, conseqüentemente, há maior disponibilidade e maior possibilidade de perdas por lixiviação. As plantas absorvem o magnésio na forma de  $\text{Mg}^{+2}$ , sendo que existe um antagonismo entre Mg e Ca de um lado e Mg e K de outro. O aumento da concentração de um elemento no meio implica na diminuição da absorção do outro, de maneira que o excesso de um dos elementos pode causar deficiência na absorção de outro. Um excesso de K pode levar à escassez de absorção de Mg e, por outro lado, o

excesso de Mg pode ocasionar falta de K ou principalmente de Ca. O  $Mg^{+2}$ , como o  $Ca^{+2}$  e o  $K^{+}$ , move-se para cima na corrente transpiratória e, de maneira semelhante ao que acontece com o potássio e diferentemente do que ocorre com o cálcio, o  $Mg^{+2}$  é móvel no floema e, por isso, os sintomas de carência, clorose inter-venal, começam nas folhas mais velhas. O magnésio tem função na composição da molécula de clorofila, correspondendo a 2,7% de seu peso molecular, e como ativador enzimático, sendo cofator de quase todas as enzimas fosforilativas, formando uma ponte entre o pirofosfato do ATP ou do ADP (tri e difosfato de adenosina, respectivamente) e a molécula da enzima, sendo, portanto, fundamental nos processos de fotossíntese, respiração, síntese de compostos orgânicos e absorção iônica. A falta de Mg inibe a fixação de  $CO_2$  mesmo se existir clorofila o suficiente. O metabolismo do nitrogênio também é influenciado, pois em plantas deficientes em Mg observa-se que a síntese de proteínas é diminuída, pois o Mg parece estar relacionado com a estabilização da configuração dos ribossomos, na ativação dos aminoácidos e sua transferência para formação da cadeia polipeptídica (MALAVOLTA, 1980).

### 2.3.2.1 Nitrogênio

O nitrogênio é o nutriente mineral essencial mais limitante para o crescimento das plantas (DATE, 1973; HARDY; HAVELKA, 1975). Durante o processo de decomposição da matéria orgânica o nitrogênio é liberado na forma amoniacal, que é rapidamente oxidada a nitrato por bactérias quimiossintetizantes.

Em condições especiais de solo, pH muito ácido, alta concentração de fenóis ou anoxia, a amônia não é oxidada e algumas plantas a absorvem nesta forma e, como os colóides do solo apresentam carga líquida de superfície negativa, o nitrato não é retido e rapidamente sofre lixiviação pela percolação da água. Isso faz com que o nitrogênio fixado seja sempre escasso no ambiente (CAMARGOS, 2002).

O acúmulo de solutos como o potássio e o nitrato pode influenciar na alongação celular, pelo aumento da pressão osmótica dentro da célula. O amônio é a principal fonte de nitrogênio para sustentar a divisão das células meristemáticas, uma vez que tecidos meristemáticos freqüentemente são pobres em carboidratos e a assimilação de amônio consome menos energia do que a de nitrato (AMARAL, 2003).

Alguns procariontes desenvolveram mecanismos bioquímicos que permitem reduzir  $N_2$  a amônia e por isso ocupam importante nicho ecológico, fornecendo nitrogênio fixado em diferentes ecossistemas, desde solos aeróbios, superfície oceânica a nódulos de leguminosas (HALBLEIB; LUDDEN, 2000). Poucas espécies de plantas, na maior parte leguminosas, são capazes de estabelecer uma relação simbiótica com organismos procariotos capazes de fixar  $N_2$  atmosférico. Portanto, as plantas possuem mecanismos de resistência ao baixo suprimento de nitrogênio, como sistemas sensíveis e seletivos de absorção e transporte e também a possibilidade de crescimento utilizando diferentes fontes de nitrogênio. Tais estratégias envolvem o desenvolvimento de um sistema de passos regulatórios na via de assimilação de nitrogênio e sua integração com a assimilação do carbono, a fim de manter um balanço carbono/nitrogênio adequado ao crescimento da planta (TISCHNER, 2000). Dentre as fontes de nitrogênio disponíveis, a amônia é utilizada em condições especiais de solo, como baixa aeração, os aminoácidos são consumidos pelas plantas em locais onde a nitrificação e a mineralização são limitadas pelo clima (como em regiões árticas) e o nitrato é a forma mais comum de nitrogênio disponível (CAMARGOS, 2002).

O nitrato que é absorvido pelas raízes pode ser translocado para a parte aérea ou armazenado nos vacúolos. No caso de ser translocado, será reduzido ou armazenado nos vacúolos das regiões de dreno. A redução do nitrato a nitrito, assim que o nitrato é absorvido, ocorre no citosol e envolve a atividade da enzima nitrato redutase (NR). O nitrito então entra nos plastídeos e é reduzido a amônia pela ação da enzima nitrito redutase (NiR), que será fixada via GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase) em aminoácidos, glutamina e glutamato, os quais servem de substrato para reações de transaminação, para produção de todos os demais aminoácidos necessários à síntese de proteínas. A glutamina sintetase localiza-se nos cloroplastos e no citoplasma nas células foliares e no citoplasma das células radiculares (OAKS; HIREL, 1985), e a glutamato sintase nos cloroplastos no caso de células das folhas e em plastídeos nas radiculares (MIFLIN; LEA, 1980; EMES; FOWLER, 1979), de forma que as raízes são a principal fonte de nitrogênio (*fonte*) para as demais partes da plantas que demandam esse nutriente (*drenos*).

Quando a amônia é a única fonte de nitrogênio, ela é imediatamente incorporada a aminoácidos nas raízes, embora haja relatos de que existem concentrações da ordem de milimols em seiva de xilema em *Brassica napus* (FINNEMANN; SCHJOERRING, 1999) e cevada (MATTSON; SCHJOERRING, 1996), em plantas crescendo com amônia como fonte de nitrogênio. O principal composto nitrogenado translocado para a parte aérea em plantas supridas com amônia é a glutamina.

O nitrogênio desempenha na planta diversas funções na estrutura, na fisiologia e na osmorregulação, bem como compõe as moléculas de ácidos nucleicos. Pode ser absorvido de forma iônica pelas raízes das plantas, como íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e/ou amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (MENGEL; KIRKBY, 1987; MARSCHNER, 1995; HOPKINS, 1995), sendo que a maior parte do amônio é reduzido e incorporado em compostos orgânicos nas raízes. Além disso, o nitrato é móvel no xilema e pode ser armazenado nos vacúolos das células radiculares e na parte aérea, exercendo importante papel no balanço de cátions e ânions, na regulação osmótica e no equilíbrio eletroquímico celular (MARSCHNER, 1995).

O teor de nitrato nos tecidos vegetais é determinado por vários fatores, dentre os quais se destacam a luminosidade, a interação entre nutrientes, a disponibilidade de nitrato e molibdênio, as fontes e tipos de adubos nitrogenados e os inibidores de nitrificação (SCHARPF, 1991). A luz, por exemplo, é um fator indutor da enzima nitrato redutase e, conseqüentemente, atua na redução do nitrato a nitrito. Além disso, aumenta a disponibilidade de NADH, o doador de elétrons da reação, aumentando ainda mais a redução de nitrato a nitrito. A luz ainda é determinante do acúmulo de nitrato em plantas, visto que os açúcares sintetizados em uma maior atividade fotossintética substituem o nitrato como componente osmótico (BEHR; WIEBE, 1992). Quando a intensidade luminosa é baixa, o nitrato acumula-se mais nos vacúolos das células, pois a síntese de osmorreguladores como o malato fica reduzida (BLOM-ZANDSTRA; LAMPE, 1985).

O mecanismo de transporte de nitrato é sugerido como um co-transporte, via membrana,  $\text{H}^+$ /nitrato (ULLRICH, 1987), sendo o  $\text{K}^+$  necessário para manter o balanço de cargas no ambiente celular. Alguns fatores que afetam a absorção e o transporte de nitrato são o  $\text{CO}_2$  atmosférico, a temperatura radicular, a presença de  $\text{NO}_2$  no ar, que

penetra os estômatos, causando aumento na concentração de nitrato e redução dos compostos nitrogenados reduzidos, sendo transportado para a raiz pelo floema, inibindo a absorção e o transporte de nitrato nelas (TISCHNER et al., 1988).

Baixas concentrações de nitrito ( $10\mu\text{M}$ ) podem induzir a síntese de transportadores de alta afinidade induzidos pelo tempo de exposição ao substrato (IHATS) (WILLIAMS; MILLER, 2001), ao passo que concentrações elevadas a inibem.

Os órgãos que mais acumulam nitrato são caule, seguido por pecíolo, folhas, raízes e órgãos reprodutores (MAYNARD; BARKER, 1972), sendo que a disponibilidade de molibdênio influencia o teor de nitrato, pois ele participa do sistema de transferência de elétrons da nitrato redutase (GUPTA; LIPSET, 1981). Assim, a deficiência de molibdênio causa acúmulo de nitrato, podendo promover também alterações morfológicas nas plantas (RUSCHEL, 1998).

O nitrato, além de ser importante fonte de suprimento de nitrogênio, age também como sinalizador de processos celulares. A indução de enzimas envolvidas na assimilação de nitrato é um dos mecanismos estimulados pela presença de nitrato. Além disso, o metabolismo de carboidratos é afetado diretamente pela sua presença, pois ele altera a relação entre síntese de amido e de sacarose, aumentando a síntese desta última, resultando na produção de ácidos orgânicos, como o oxoglutarato, que estão diretamente envolvidos na assimilação de amônia via GS/GOGAT (CAMARGOS, 2002).

A capacidade de absorção e transporte de nitrato não é igualmente distribuída ao longo do eixo da raiz e é diferente em raízes de idades distintas (LAZOF; RINCON; RUFTY, 1994): as raízes mais velhas absorvem e transportam nitrato mais ativamente e possuem atividade reduzida de nitrato redutase, o que indica que ocorre um aumento na translocação de nitrato delas para a parte aérea (JIAO; BARABAS; LIPS, 2000). Em concentrações baixas de suprimento de nitrato, geralmente a redução ocorre preferencialmente nas raízes, ao passo que em altas concentrações o armazenamento e transporte para a parte aérea são auxiliares na manutenção do nitrogênio na planta (AGRELL et al., 1997).

Além disso, a absorção e o transporte do meio externo para a raiz dependem da concentração externa de nitrato, levando em conta que o transporte via xilema depende

da demanda da parte aérea e do conteúdo de compostos nitrogenados reduzidos presentes no floema (SARAVITZ et al., 1998) e o transporte e assimilação de nitrato é diretamente regulado pelas variações na concentração de glutamina.

### 2.3.2.2 Nitrogênio *in vitro*

O meio de cultura descrito por Murashige e Skoog (1962) é amplamente utilizado para a maioria das culturas. O elemento chave deste meio nutritivo é a presença de altos níveis de nitrogênio na forma de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), que tem se mostrado benéfico para indução de organogênese *in vitro* (AMMIRATO, 1983).

A função do nitrogênio no crescimento e desenvolvimento das plantas, embora seja amplamente reconhecida, não é bem compreendida no que diz respeito aos efeitos benéficos das formas  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  *in vitro*, uma vez que essas e a quantidade de nitrogênio no meio de cultura exercem grande influência na taxa de crescimento, morfologia e totipotência celular (KIRBY; LEUSTEK; LEE, 1987). Além das formas inorgânicas de nitrogênio, formas orgânicas podem ser fornecidas, e são prontamente assimiláveis pelas células vegetais (FRÁGUAS et al., 2003), como uréia, aminoácidos, poliaminas e ureídeos (GROTHGE, 1992).

Já foi relatado que algumas concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  podem influenciar níveis endógenos de hormônios como, por exemplo, em *Eleusine coracana* (L.) Gaertn., na qual altas concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  substituíram a necessidade do ácido naftalenoacético (ANA) na regeneração das plantas (PODDAR; VISHNOI; KOTHARI, 1997). Em bromélias cultivadas com nitrato de amônia, também foi observado alto conteúdo de ácido indolacético (AIA) e algumas citocininas (MERCIER; KERBAUY, 1998).

Em alguns casos, as concentrações de nitrato de amônia no meio de cultura produziram aumento do número de raízes, como é o caso de *Pitcairnia flammaea* e *Vriesia philippocoburgii* (MERCIER; KERBAUY, 1998). Os autores verificaram ainda que comparando glutamina com nitrato de amônia no meio de cultura em *Tillandsia pohliana*, o último induziu o acréscimo nas concentrações de citocininas e declínio no

conteúdo de AIA, sendo que o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  possuiu um melhor resultado no crescimento de *T. pohliana* sobre a matéria fresca e sobre a matéria seca.

Segundo Silva et al. (2005), uma visão desafiadora tem sido proposta recentemente, no sentido de que seria possível substituir os reguladores de crescimento no meio de cultura por nutrientes orgânicos e inorgânicos (PREECE, 1995), com a vantagem de que o nitrato de amônia possui custo baixo em relação aos reguladores de crescimento. A substituição de alguns reguladores de crescimento por nitrato de amônia em protocolos de clonagem *in vitro* seria, caso comprovadamente eficaz, uma alternativa para redução de custos de operação em laboratórios industriais.

O nitrato como única fonte de nitrogênio é responsável por uma taxa de crescimento razoável para algumas culturas, como a cenoura (REINERT; TOZAWA; SEMEROFF, 1967). Outras culturas, como o arroz, no entanto, não se desenvolvem bem na presença apenas de nitrato como fonte de nitrogênio (YATAZAWA; FURUHASHI, 1968). Conforme Gamborg e Shyluk (1970), quando a única fonte de nitrogênio fornecida são sais inorgânicos de amônio, as células *in vitro* apresentam sintomas de toxidez. Ao contrário, quando são fornecidas as duas formas, nitrato e amônio, o crescimento de diversas espécies *in vitro* é estimulado (SARGENT; KING, 1974). Mas além do efeito estimulatório do amônio sobre o crescimento, em cenoura há uma dependência desse para embriogênese somática (HALPERIN; WETHERELL, 1965).

Donato, Andrade e Câmara (1999), observaram que para cana-de-açúcar, a presença dos dois íons nitrato e amônio como fonte de nitrogênio no meio de cultura MS foi mais favorável tanto para a formação como para o crescimento dos brotos. No entanto, observou-se que o nitrato pode ser utilizado como única fonte de nitrogênio, sem prejuízo para o índice de multiplicação.

A utilização do nitrato pelas células depende da atividade da enzima nitrato redutase, que mostra atividade *in vitro* (GILES; VASIL, 1980).

No trabalho de Donato et al. (1999), a inibição à multiplicação *in vitro* da cana-de-açúcar não foi ocasionada por carência de nitrogênio, pois as concentrações de N reduzido foram semelhantes às apresentadas pelas plantas que foram cultivadas nos demais meios com fontes adequadas de N.

A utilização de nitrato ou amônio pode ser influenciada pelo genótipo da planta (GABELMAN et al., 1986), pH da solução (YOKOTA; OJIMA, 1995) e temperatura da solução (IKEDA; OSAWA, 1984). No trabalho de McElhannon e Mills (1978), com feijão, a utilização de nitrato ou amônio também foi afetada pelo estágio de crescimento e no trabalho de Mills e McElhannon (1982), o mesmo ocorreu com milho.

A uréia é um dos fertilizantes nitrogenados mais importantes utilizados na produção de vegetais no campo (VAVRINA; OBREZA, 1993). A uréia como fonte orgânica de N é, no entanto, raramente utilizada em culturas de hidroponia para produção vegetal, embora algumas tentativas bem sucedidas tenham reduzido o acúmulo de nitrato em vegetais folhosos pela realocação parcial do nitrato em uréia (GUNES et al., 1994).

O nitrogênio originado a partir de aminoácidos, segundo Lea (1993), é assimilado mais rapidamente pelos esqueletos carbônicos durante o metabolismo e síntese de proteínas, em relação a outras fontes de nitrogênio inorgânico. Contudo, apesar de vários trabalhos citarem as vantagens da suplementação do meio basal com uma fonte de nitrogênio orgânico, autores como Carvalho, Biasi e Telles (2004) não encontraram resultados satisfatórios para o cultivo de ápices meristemáticos de caqui, para as concentrações de aminoácidos utilizadas, o que sugere que essa suplementação é variável para diferentes espécies.

Interações entre nutrientes ocorrem, em plantas superiores, quando o suprimento de um nutriente afeta a absorção, distribuição ou função de outro nutriente, podendo induzir toxidez ou deficiência e/ou modificar o crescimento (ROBSON; PITMAN, 1983). Alguns fatores influenciam a existência de uma interação, como estado fisiológico da planta, genótipo, idade, estágio de crescimento e fatores ambientais. Devido aos diversos fatores envolvidos, dois nutrientes podem ter uma ação sinérgica em uma função e antagônica em outra (LIMA FILHO, 1995). A importância relativa dessas interações, opostas, determinará o sinal da interação como um todo, detectada através de análise química ou pelo desempenho da planta (MARTIN-PRÉVEL; GAGNARD; GAUTIER, 1984).

A absorção de íons da solução pode ser afetada por outros íons por diversos fatores, como o aumento ou diminuição no acesso aos sítios de absorção, em que um



ion pode afetar a absorção de outro, modificando sua concentração no sítio de absorção da membrana plasmática; a competição do sítio de absorção, onde o movimento através da membrana plasmática é um processo seletivo em baixas concentrações, sendo que alguns íons são tão parecidos quimicamente que os mecanismos de transporte muitas vezes não os identificam, competindo uns com os outros no processo de absorção; e a interação com controles metabólicos de absorção, devido à ativação ou desativação de enzimas ou a supressão de um transportador (EPSTEIN, 1975; ROBSON; PITMAN, 1983). Um nutriente pode ter sua função prejudicada ou incrementada por outro, ou pode ocorrer a substituição parcial de um elemento por outro ou ainda um pode requerer a ação de outro nutriente para que possa ser absorvido (ROBSON; PITMAN, 1983).

### **2.3.3 Problemas nutricionais da pupunheira e sua necessidade de nitrogênio**

Embora seja uma importante cultura, há relativamente pouco conhecimento sobre as necessidades nutricionais da pupunheira. Apesar de nos últimos 30 anos cientistas e produtores comerciais na América Latina terem conduzido diversos experimentos, ainda não há uma linha totalmente confiável no que diz respeito às necessidades nutricionais da cultura da pupunheira (DEENIK; ARES; YOST, 2000). A literatura sugere que a pupunheira é bem adaptada a solos ácidos e pouco férteis nos trópicos (MOLINA, 1997), no entanto a fertilização é comumente utilizada na produção de seu palmito. Na Costa Rica, os pequenos produtores aplicam até 300 kg de N, 82 kg de P e 250 kg de K /ha/ano (ALVARADO; SMITH; SMYTH, 1998), embora atualmente se use menos que essas quantidades.

No Brasil, a recomendação de aplicação é de 220g de P e 83g de K por m<sup>3</sup> de substrato em viveiros (BOVI; BASSO; TUCCI, 1998). No estado de São Paulo, durante a fase de produção, as adições nutricionais normalmente ficam entre 110 e 300 kg/ha de N, 0 a 35 kg/ha de P, 17 a 133 kg/ha de K, 20 a 50 kg/ha de S e 1 a 2 kg/ha de B (BOVI; CANTARELLA, 1997; BOVI, 1998).

De acordo com Bovi et al. (1998), o número de folhas é um parâmetro que reflete bem o efeito de estresse hídrico e adubação, com respostas significativas a níveis crescentes de nitrogênio e lâminas de irrigação.

De acordo com Magat, Rincon e Alforja (1993), as espécies da família Arecaceae possuem características favoráveis quando na presença de solos com salinidade elevada, pois a produção tem se mostrado elevada pela presença do Na, bem como quantidades elevadas de Cl têm sido requeridas para manifestação de todo seu potencial produtivo (MARSCHNER, 1995; SOBRAL; LEAL, 1999).

Alguns trabalhos mostram redução dos teores de N em plantas sob estresse salino (HU; SCHMIDHALTER, 1997), ao passo que outros revelam um aumento nos teores de N nas raízes até um nível de salinidade de  $4,0\text{dS m}^{-1}$ , enquanto que na parte aérea os teores não sofreram alterações significativas (AI-HARBI, 1995).

Fernandes et al. (2002) estudaram as concentrações adequadas de Na e Cl capazes de estimular o crescimento e fornecer um maior equilíbrio nutricional em pupunheiras, sem prejudicar a absorção de outros íons, a fim de melhor compreender a tolerância da espécie à salinidade. Os autores verificaram que quanto maior o nível de salinidade, menores são os teores de P e K nas raízes, os teores de K e Ca nas folhas, e o teor de S nas diferentes partes das plantas, e maiores os teores de Na e Cl nas diferentes partes das plantas de pupunheira. Além disso, concluíram que as relações Na/K, Na/Ca, Na/Mg, Cl/N, Cl/P e Cl/S aumentam com alta salinidade e causam um desbalanço nutricional na planta, caracterizando a sensibilidade da pupunheira à salinidade.

O crescimento da pupunheira é limitado em algumas situações, como em solos mal drenados que sofrem alagamento, solos com baixo conteúdo nutricional e de matéria orgânica e em áreas com tendência à seca (mais de três meses com menos de 50 mm de precipitação). Na região amazônica, algumas pupunheiras perdem mais de um terço de suas folhas durante a estação seca (WOLF, 1997).

Em sua revisão, Deenik, Ares e Yost (2000) observaram que testes com fertilizantes mostraram respostas significativas à aplicação de N, ao passo que a resposta a outros nutrientes como o P foram menos freqüentes. Eles citam o trabalho de Guzmán (1985), realizado na Costa Rica durante quatro anos com fertilizações, no qual foi medido um efeito significativo no N aplicado na produção de palmito. O número e peso dos palmitos por hectare por ano foram maximizados quando o N foi aplicado em uma taxa de  $367\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ . No maior nível de N ( $550\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ), a produção diminuiu

significativamente. Para P e K aplicados, não foi encontrado efeito significativo na produção. Quanto aos níveis de N, P e K foliares, não houve alteração de acordo com diferentes níveis de fertilização, diferentemente das respostas de crescimento com o N. Perez et al. (1987) encontraram resultados similares em estudos com crescimento de pupunheiras durante 6 anos no Peru. Uma resposta quadrática no crescimento da pupunheira com a aplicação de N ocorreu com taxas ótimas de cerca de  $180 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ , enquanto a produção de frutos respondeu linearmente ao N. O experimento não encontrou respostas para P e os níveis foliares não mostraram relação com crescimento e produção de frutos.

Outro estudo, realizado na costa Rica, mostrou efeitos significativos da aplicação de N na área foliar, altura da planta, número de perfilhos, diâmetro na base, massa seca total e massa seca da parte aérea de mudas de pupunheiras em Andisol (JONGSCHAAP, 1993). O único efeito significativo com relação ao P foi no diâmetro do estipe, ao passo que para o K não foram encontrados efeitos significativos, sugerindo que a falta de resposta a adições de P podem ser atribuídas à alta capacidade de fixação de P do solo, à presença de micorrizas ou ao acúmulo insuficiente de P no solo devido à idade muito jovem das palmeiras. Os níveis de N e P foliar não mudaram de maneira significativa com o aumento das taxas de fertilização.

No Brasil, as respostas da pupunheira para combinações de N, P e K foram registradas (ARKCOLL, 1982; GOMES; MENEZES; FILHO, 1987). Com 27 combinações diferentes de N, P e K, uma dose de 400 g de N, 80 g de P e 241 g de K por  $\text{m}^3$  de substrato induziu ao crescimento de plântulas em viveiros (KATO et al., 1997). Para P houve também uma resposta linear para crescimento, ao passo que as respostas para N e K tiveram uma tendência de parábola (LOPES REIS, 1997).

Outro estudo abordado na revisão, realizado por Wolf (1997), foi realizado por cerca de três anos e meio após transplante, sendo que as pupunheiras tiveram uma resposta positiva ao aumento das doses de fertilização em Manaus. Nesse estudo, as pupunheiras mostraram acumular biomassa e melhorar o uso dos nutrientes em comparação à castanha-do-pará, cupuaçu e urucum. Para a maioria dos nutrientes, a diferença de concentração entre folhas e caule (ou estipe) foi maior nas pupunheiras,

sugerindo uma alocação de nutrientes eficiente para tecidos que mais respondem para a produção de biomassa.

As taxas atuais de fertilização são baseadas em dados de campo dos últimos 25 anos. Pesquisas com características do solo de campos de produção de pupunheiras compilados pela Universidade da Costa Rica, centro de investigações agrônômicas (UCR-CIA), revelam um resumo dos dados disponíveis sobre necessidades do solo para a produção de pupunheiras, que indicam grande versatilidade da cultura com relação à fertilidade do solo. Não está claro, contudo, se tais dados estão baseados sobre o padrão dos primeiros 20 centímetros do perfil do solo. A profundidade das amostras pode ser uma consideração importante, uma vez que a amostra poderia incluir tanto a camada orgânica, mais rica em nutrientes disponíveis e em abundância de raízes, quanto à porção mineral do solo. Altos níveis de N ( $400 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ ) por mais de seis anos diminuíram o pH do solo de 5.4 no controle para 4.5 (HERRERA, 1989). Da mesma maneira, a acidez trocável aumentou de 0.5 para  $2 \text{ cmol } 100\text{g solo}^{-1}$ , enquanto que Ca, Mg e K trocáveis diminuíram significativamente. Esses dados sugerem que as altas taxas de N atualmente em uso na Costa Rica podem ser um importante tratamento para manutenção da capacidade do solo com alta produtividade da cultura no longo prazo.

Existem evidências de que as práticas de fertilização possuem efeitos prejudiciais nas propriedades químicas em algumas plantações de pupunheiras na Costa Rica (GUZMÁN, 1985; HERRERA, 1989).

Mais pesquisas devem ser realizadas a fim de esclarecer como diferentes elementos e concentrações destes podem afetar os aspectos nutricionais e o desenvolvimento de pupunheiras, tanto nas condições *ex vitro* como *in vitro*.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

O trabalho teve por objetivo avaliar a influência da interação do nitrato de amônio e nitrato de potássio, no desenvolvimento *in vitro* de embriões somáticos de pupunheiras, visando a otimização do protocolo de micropropagação da espécie.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar o desenvolvimento morfofisiológico dos embriões somáticos, avaliando-se o comprimento da parte aérea e da raiz, o número de brotações e folhas e a porcentagem de ramificação do sistema radicular, em relação às diferentes concentrações e interações das fontes de nitrogênio;

- Quantificar o teor de Proteínas Totais Solúveis, o teor de clorofila foliar e o estado nutricional das microplantas desenvolvidas em relação às diferentes concentrações e interações das fontes de nitrogênio.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização do experimento

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Biologia Reprodutiva de Plantas do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba-SP, de janeiro a setembro de 2008.

### 4.2 Material Vegetal e condições de cultivo

Foram utilizados duzentos e cinquenta embriões somáticos de pupunheiras (*Bactris gasipaes* Kunth) com características morfológicas homogêneas, sem raízes e folhas, obtidos a partir da cultura *in vitro* de ápices caulinares de matrizes adultas selecionadas, provenientes de Yurimáguas (Amazônia Peruana). Os embriões somáticos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura e luminosidade controladas ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  e irradiância de  $42\ \mu\text{mol/s/m}^2$ , respectivamente), em fotoperíodo de 16 horas.

Os tratamentos consistiram de modificações das concentrações das soluções de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , constituintes do meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). As concentrações utilizadas foram 0; 825; 1650; 2475; 3300  $\text{mg L}^{-1}$  de nitrato de amônio e 0; 950; 1900; 2850; 3800  $\text{mg L}^{-1}$  de nitrato de potássio, combinadas entre si, perfazendo um total de 25 tratamentos. As soluções foram preparadas a partir da solução completa do meio MS devidamente modificado para as proporções desses íons no suprimento de nitrogênio. O pH de todos os meios de cultura foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem ( $121^{\circ}\text{C}$  e 1,1 atm por 20 minutos). O meio de cultura foi renovado a cada 30 dias, mantendo-se as mesmas condições de cultivo para todos os tratamentos, por um período de 240 dias. Foi designado *meio básico* o meio MS isento das soluções de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ . A tabela 1 descreve os tratamentos aplicados no experimento:

Tabela 1 – Tratamentos aplicados no experimento. Meio de cultura Básico: MS

Tratamento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25
Concentração de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0	0	0	0	0	82 5	82 5	825	825	825	165 0	165 0	165 0	165 0	165 0	247 5	247 5	247 5	247 5	247 5	330 0	330 0	330 0	330 0	330 0
Concentração de $\text{KNO}_3$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0	95 0	190 0	285 0	380 0	0	95 0	190 0	285 0	380 0	0	950	190 0	285 0	380 0	0	950	190 0	285 0	380 0	0	950	190 0	285 0	380 0

- O tratamento T13 foi considerado testemunha por conter as concentrações usuais de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  no meio de cultura MS e são referidas no texto como 100%.



### **4.3 Coleta de dados**

#### **4.3.1 Avaliações morfofisiológicas**

As coletas dos dados morfofisiológicos foram realizadas aos 60, 120, 180 e 240 dias de cultivo *in vitro*.

Foram avaliados os seguintes parâmetros morfofisiológicos das microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos: Comprimento da parte aérea (CPA); comprimento da raiz (CR); número de raízes (NR), número de brotações (NB); número de folhas (NF); porcentagem de ramificação da raiz (RA); porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro), porcentagem de raízes medianas (1mm ≤ RM ≤ 1,5mm de diâmetro) e porcentagem de raízes grossas (RG > 1,5mm de diâmetro).

#### **4.3.2 Quantificação de Proteínas Totais Solúveis**

As análises para quantificação de proteínas totais solúveis foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Pós-colheita no Departamento de Ciências Biológicas - ESALQ/USP, pelo método Bradford (1976), aos 240 dias de cultivo, utilizando a microplanta inteira. A extração de proteínas foi feita com 100mg de matéria seca mais 1,5mL de tampão fosfato de sódio dibásico. O material foi centrifugado a 10000 g por 10 minutos e o sobrenadante colhido como extrato. A reação foi feita com 100µL de extrato mais 1mL de reagente de Bradford. A leitura colorimétrica foi feita em espectrofotômetro a 595nm. Os teores de proteínas totais solúveis foram calculados pela interpolação dos resultados na curva padrão de albumina de soro bovino (BSA). Os resultados foram expressos em mg de PTS.g<sup>-1</sup> da microplanta.

#### **4.3.3 Avaliação indireta do teor de clorofila**

Foi utilizado o método não destrutivo para quantificação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos com a aplicação do medidor indireto de clorofila, o clorofilômetro SPAD-502 (Soil and Plant Analysis Development) (MINOLTA, 1989). Cada microplanta foi amostrada em oito pontos de cada folha presente (quatro pontos por folíolo), aos 240 dias de cultivo, sendo que os valores foram homogeneizados para obtenção de um valor correspondente à microplanta inteira, devido à existência de

correlação entre o valor do índice SPAD e o teor de clorofila foliar, conforme curva de correlação obtida por Batagin (2008) para *B. gasipaes*.

#### **4.3.4 Avaliação do teor de macro e micronutrientes**

Microplantas inteiras com 240 dias de cultivo foram secas em estufa  $65^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$  até obtenção de peso constante e encaminhadas para moagem no Laboratório de Tecido Vegetal do Departamento de Ciência do Solo, onde foram determinados os teores de zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e nitrogênio total (N).

As extrações de Zn, Fe, Mn foram feitas com extrato nítrico perclórico e as leituras no espectrofotômetro de absorção atômica. Para a determinação de P, utilizou-se métodos colorimétricos, e para K, Ca e Mg, espectrofotometria de absorção atômica.

Quanto ao N total, foi feita digestão sulfúrica e a destilação pelo método microkjedahl, conforme Bremner e Mulvaney (1982). No caso do enxofre, utilizou-se método turbidimétrico, segundo Utti (1988).

#### **4.4 Delineamento estatístico**

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado no arranjo fatorial (5x5), sendo os fatores compostos por cinco concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e cinco concentrações de  $\text{KNO}_3$ , com vinte e cinco tratamentos.

Contudo, foram utilizados diferentes números de repetições para cada método. Para análise dos parâmetros morfofisiológicos, utilizou-se 10 repetições. Para análise do de proteínas totais solúveis e obtenção do índice SPAD foram utilizadas cinco repetições e para o conteúdo de macro e micronutrientes três repetições, conforme o número de plantas sobreviventes ao final do experimento (240 dias).

##### **4.4.1 Análise dos dados**

Inicialmente os dados referentes ao teor de proteínas totais solúveis, índice SPAD e parâmetros morfofisiológicos foram submetidos ao teste de Bartlett a 5% de probabilidade de erro, a fim de verificar a homogeneidade da variância entre os tratamentos. Em seguida, realizou-se análise de variância (ANOVA), respectivamente

em 5% e 1% de probabilidade de erro. De acordo com a significância, os dados foram analisados por regressão polinomial em 5% de probabilidade de erro.

Para analisar os dados de macro e micronutrientes e relacioná-los as demais variáveis respostas, foi elaborada matriz de correlação de Pearson, respectivamente em 5% e 1% de probabilidade de erro.

Para tanto, utilizou-se o pacote estatístico SOC (EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA, 1990) para a realização dos procedimentos estatísticos.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Coleta de dados

Para avaliar a interação entre os sais de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , pela análise de variância (ANOVA), foram elaborados gráficos em 3D demonstrando a influência conjunta dos sais sobre determinado parâmetro, com a respectiva equação e pontos críticos. Uma vez que a equação é uma representação matemática dos dados, em alguns casos os pontos críticos tiveram valores negativos, pois a equação busca valores de mínimo ou máximo dentro de um intervalo de dados maior que o intervalo amostrado no experimento. Assim, nos casos em que as estimativas de pontos críticos tiveram valores negativos, atentou-se para os valores contidos dentro do intervalo de dados amostrado no experimento e as tendências de comportamento dos tratamentos.

#### 5.1.1 Avaliações morfofisiológicas

##### 5.1.1.1 Parâmetros Morfofisiológicos aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

A tabela 2 resume a análise de variância realizada para todos os parâmetros avaliados aos 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 2 - Resumo da análise de variância para o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas (NF), porcentagem de ramificação da raiz (RA), porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro), porcentagem de raízes medianas (1mm  $\leq$  RM  $\leq$  1,5mm de diâmetro) e porcentagem de raízes grossas (RG > 1,5mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  aos 60 dias de cultivo

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios								
		CPA <sup>(1)</sup> cm explante <sup>-1</sup>	CR <sup>(1)</sup>	NR <sup>(1)</sup>	NB <sup>(1)</sup> explante <sup>-1</sup>	NF <sup>(1)</sup>	RA <sup>(1)</sup>	RF <sup>(1)</sup> %	RM <sup>(1)</sup>	RG <sup>(1)</sup>
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (A)	4	0,0096 <sup>ns</sup>	0,0055*	0,0209 <sup>ns</sup>	0,0070 <sup>ns</sup>	0,0033 <sup>ns</sup>	1,4267*	0,4233 <sup>ns</sup>	0,8989 <sup>ns</sup>	2,0269 <sup>ns</sup>
$\text{KNO}_3$ (B)	4	0,0075 <sup>ns</sup>	0,0009 <sup>ns</sup>	0,0209 <sup>ns</sup>	0,0074 <sup>ns</sup>	0,0026 <sup>ns</sup>	0,1849 <sup>ns</sup>	0,8001 <sup>ns</sup>	0,4114 <sup>ns</sup>	2,1377*
A * B	16	0,0158 <sup>ns</sup>	0,0034*	0,0101 <sup>ns</sup>	0,0062 <sup>ns</sup>	0,0025 <sup>ns</sup>	0,3374 <sup>ns</sup>	0,6394 <sup>ns</sup>	1,0640*	1,1354 <sup>ns</sup>
Resíduo	100	0,0118	0,0018	0,0105	0,0038	0,0037	0,4479	0,3899	0,5726	0,8617
Média	—	3,92	0,22	0,82	0,27	0,38	6,58	6,30	9,56	16,85
CV <sub>exp.</sub> (%)	—	16,54	16,19	31,86	23,89	22,39	62,36	65,37	64,42	65,09

<sup>ns</sup> valor não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* valor significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $[(n+0,5)/10]^{0,5}$  pelo teste de Bartlett em nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Neste período, pela análise de variância (ANOVA), pôde-se observar que houve significância da interação entre os sais de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  apenas sobre o comprimento da raiz (Figura 1) e sobre a porcentagem de raízes medianas (Figura 2). Já sobre a porcentagem de ramificação, houve influência significativa do  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , de maneira isolada (Figura 3) e sobre a porcentagem de raízes grossas houve influência significativa do  $\text{KNO}_3$ , também isoladamente (Figura 4).

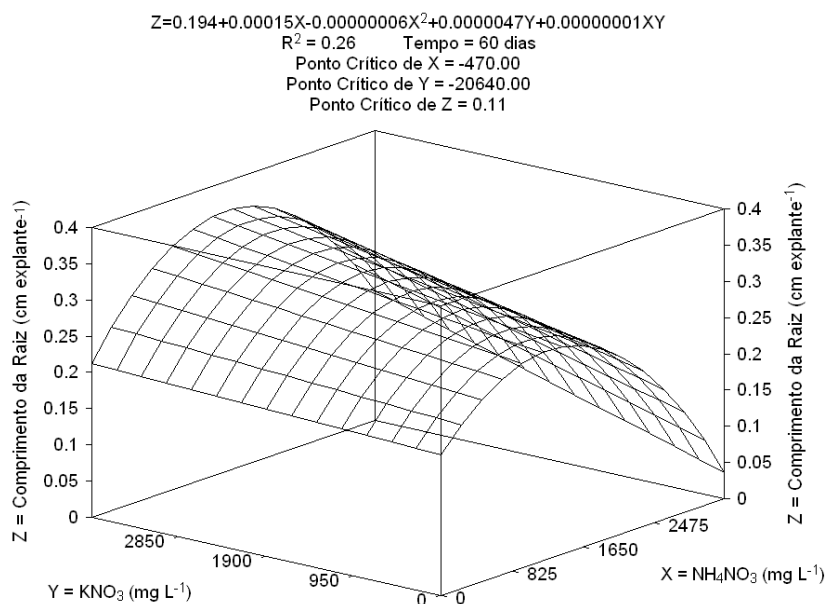


Figura 1 - Comprimento da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  aos 60 dias de cultivo

Notou-se uma tendência de incremento do comprimento da raiz nas interações entre os valores ao redor de  $1650 \text{ mg L}^{-1}$  (100%) de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e entre  $2850$  (150%) e  $3800 \text{ mg L}^{-1}$  (200%) de  $\text{KNO}_3$ .

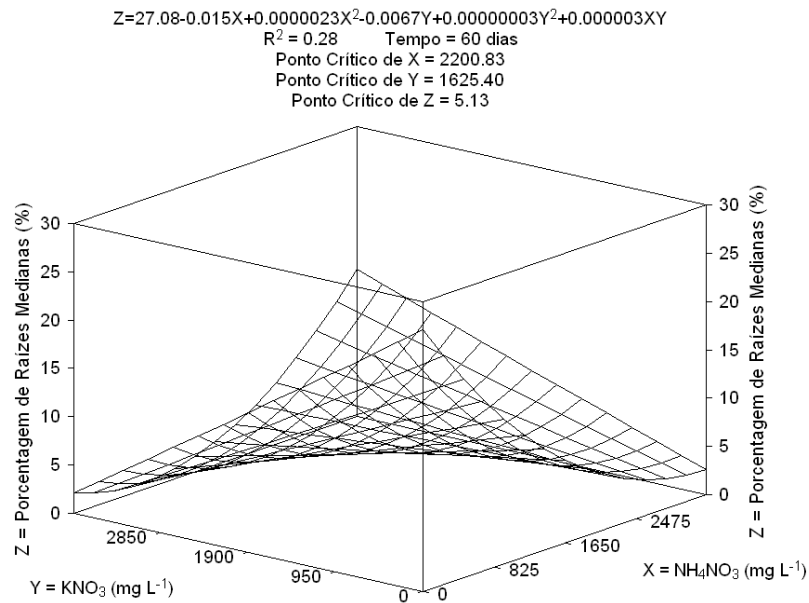


Figura 2 - Porcentagem de raízes medianas (1mm <math><RM</math> 1,5mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  aos 60 dias de cultivo

Apesar de o coeficiente de determinação ter sido baixo, nota-se uma tendência: as combinações situadas entre 0 (0%) e 825 (50%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e entre 0 (0%) e 950 (50%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  e as situadas entre 2475 (150%) e 3300 (200%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 2850 (150%) e 3800 (200%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$  favoreceram a formação de raízes de diâmetro mediano.

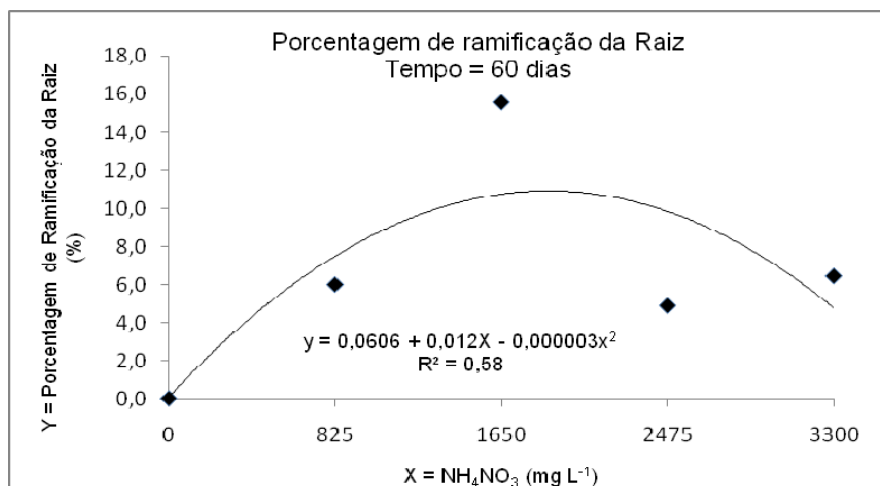


Figura 3 - Porcentagem de ramificação da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 60 dias de cultivo

Quando não houve fornecimento de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> no meio, a raiz não foi estimulada a sofrer ramificação. Já quando fornecido, observou-se que houve ramificação, sendo que a maior porcentagem foi observada na concentração de 1650 mg L<sup>-1</sup> (100%) de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

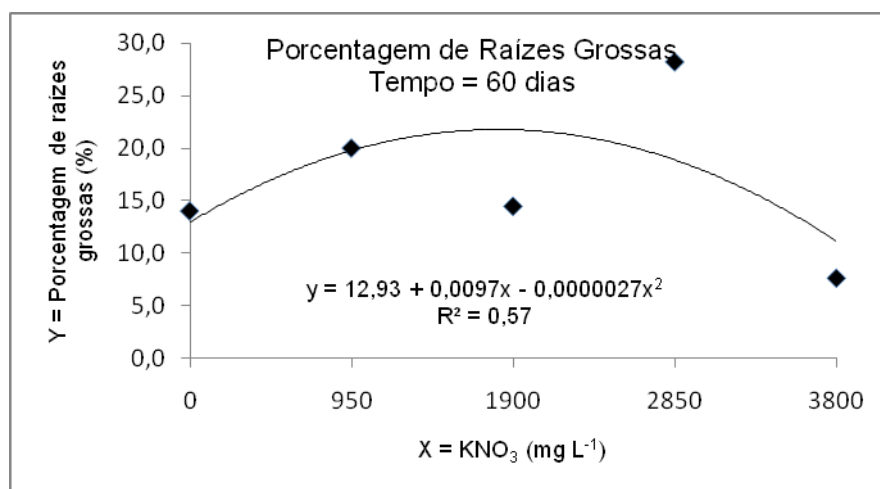


Figura 4 - Porcentagem de raízes grossas (RG > 1,5mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de KNO<sub>3</sub> aos 60 dias de cultivo

A porcentagem de raízes grossas foi influenciada pela concentração de KNO<sub>3</sub>, sendo as maiores porcentagens encontradas na concentração de 2850 mg L<sup>-1</sup> (150%) de KNO<sub>3</sub> (Figura 5a).



Neste período, os tratamentos tiveram influência significativa sobre o enraizamento das microplantas, tanto no que diz respeito a seu alongamento quanto a sua ramificação (Figura 5b).



Figura 5 – Microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 60 dias de cultivo. A. Raízes evidenciando diâmetro grosso (RG > 1,5mm de diâmetro), submetidas ao tratamento T9. B. Raízes evidenciando diâmetro mediano (1mm < RM < 1,5mm de diâmetro), ramificadas, submetidas ao tratamento T15

#### 5.1.1.2 Parâmetros Morfofisiológicos aos 120 dias de cultivo *in vitro*.

A tabela 3 resume a análise de variância realizada para todos os parâmetros avaliados aos 120 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância para o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas (NF), porcentagem de ramificação da raiz (RA), porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro), porcentagem de raízes medianas (1mm ≤ RM ≤ 1,5mm de diâmetro) e porcentagem de raízes grossas (RG > 1,5mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 120 dias de cultivo

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios								
		CPA <sup>(1)</sup> cm explante <sup>-1</sup>	CR <sup>(1)</sup>	NR <sup>(1)</sup>	NB <sup>(1)</sup> explante <sup>-1</sup>	NF <sup>(1)</sup>	RA <sup>(1)</sup>	RF <sup>(1)</sup> %	RM <sup>(1)</sup>	RG <sup>(1)</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (A)	4	0,0161 <sup>ns</sup>	0,0145 <sup>**</sup>	0,0494 <sup>*</sup>	0,0076 <sup>ns</sup>	0,0034 <sup>ns</sup>	3,9372 <sup>**</sup>	1,2283 <sup>*</sup>	3,0770 <sup>*</sup>	1,6446 <sup>ns</sup>
KNO <sub>3</sub> (B)	4	0,0104 <sup>ns</sup>	0,0045 <sup>ns</sup>	0,0324 <sup>ns</sup>	0,0061 <sup>ns</sup>	0,0154 <sup>ns</sup>	0,9846 <sup>ns</sup>	1,2326 <sup>*</sup>	1,1471 <sup>ns</sup>	3,3841 <sup>**</sup>
A * B	16	0,0235 <sup>ns</sup>	0,0083 <sup>**</sup>	0,0143 <sup>ns</sup>	0,0191 <sup>ns</sup>	0,0022 <sup>ns</sup>	1,8242 <sup>*</sup>	1,1703 <sup>**</sup>	1,1354 <sup>ns</sup>	1,0875 <sup>ns</sup>
Resíduo	100	0,0256	0,0034	0,0181	0,0125	0,0111	0,9110	0,4928	0,9024	0,8051
Média	–	7,10	0,54	1,58	0,86	1,15	26,69	9,96	19,34	16,70
CV <sub>exp.</sub> (%)	–	18,64	18,63	32,55	34,07	28,84	44,76	57,98	45,87	51,86

<sup>ns</sup> valor não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* valores significativos em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $[(n+0,5)/10]^{0,5}$  pelo teste de Bartlett em nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Aos 120 dias de cultivo, observou-se que houve significância da interação entre os sais de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> apenas sobre a porcentagem de ramificação da raiz (Figura 6), o comprimento da raiz (Figura 7), e a porcentagem de raízes finas (Figura 8). Já para número de raízes (Figura 9) e porcentagem de raízes medianas (Figura 10), houve influência significativa do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, de maneira isolada e para a porcentagem de raízes grossas houve influência significativa do KNO<sub>3</sub>, também isoladamente (Figura 11).

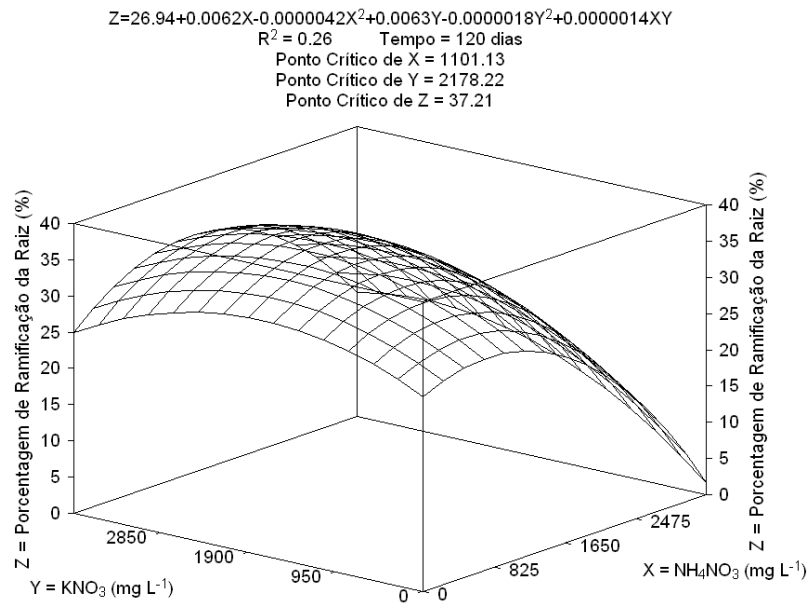


Figura 6 - Porcentagem de ramificação da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  aos 120 dias de cultivo

Pelos pontos críticos estimados pela equação, as combinações que mais favoreceram a porcentagem de ramificação da raiz aos 120 dias foram as próximas de  $1101 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e de  $2178 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ . De fato, pela observação do gráfico, esse comportamento pôde ser confirmado. Apesar de o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) da equação ter apresentado valor baixo, devido à heterogeneidade dos dados amostrados, nota-se pelos dados reais que as concentrações ótimas que parecem favorecer a ramificação radicular estariam situadas entre  $825$  (50%) e  $1650$  (100%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e entre  $1900$  (100%) e  $2850$  (150%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ .

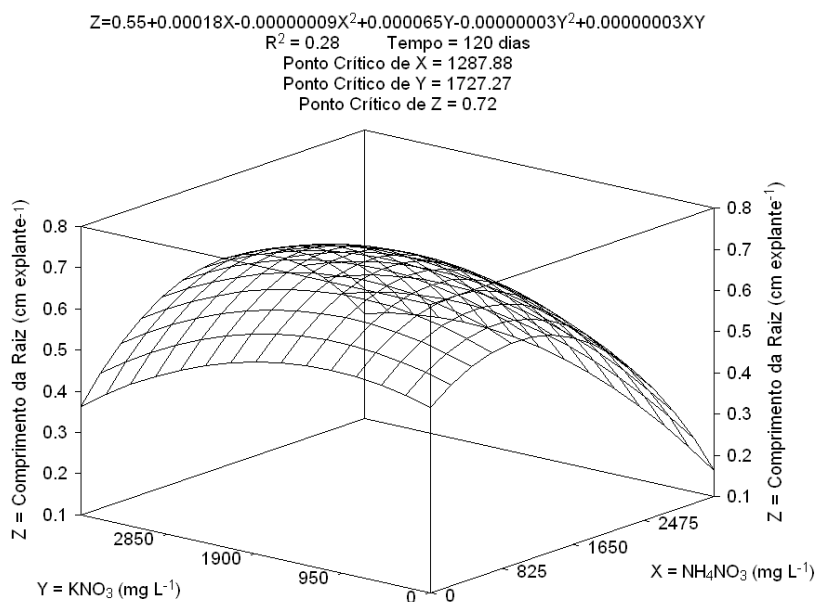


Figura 7 - Comprimento da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 120 dias de cultivo

De maneira semelhante à figura 6, devido à heterogeneidade dos dados, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) obtido foi baixo, no entanto foi possível observar a tendência no comportamento dos tratamentos no que diz respeito ao crescimento da raiz. Pelos pontos críticos estimados pela equação, as combinações que mais favoreceram o crescimento da raiz aos 120 dias foram as próximas de 1287 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e de 1727 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Pelos dados reais, as concentrações que mais favoreceram o crescimento da raiz foram aquelas situadas entre 825 (50%) e 1650 (100%) mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e entre 950 (50%) e 1900 (100%) mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.

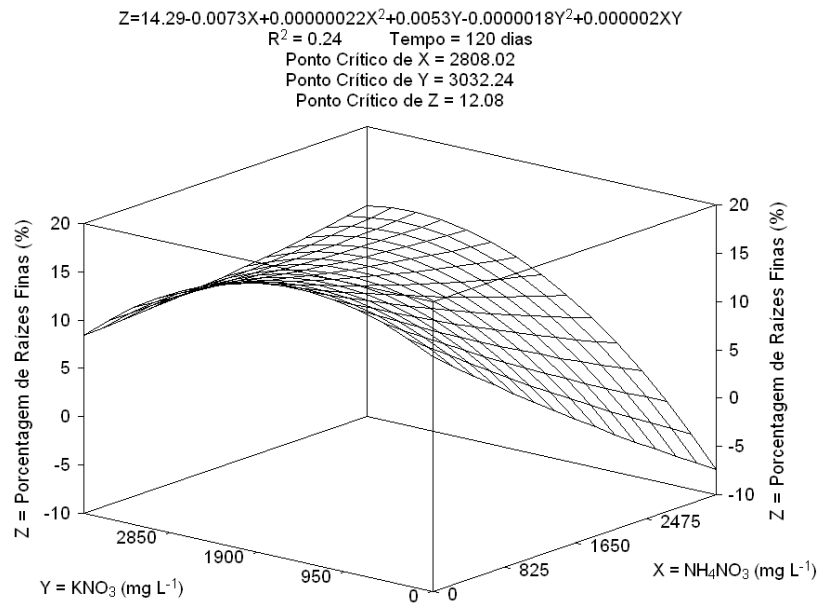


Figura 8 - Porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 120 dias de cultivo

A porcentagem de raízes finas foi favorecida pelas concentrações reais entre 2475 (150%) e 3300 (200%) mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e entre 2850 (150%) mg L<sup>-1</sup> e 3800 (200%) mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Da mesma forma, o  $r^2$  baixo pode ser justificado pelo fato de os dados não terem sido homogêneos.

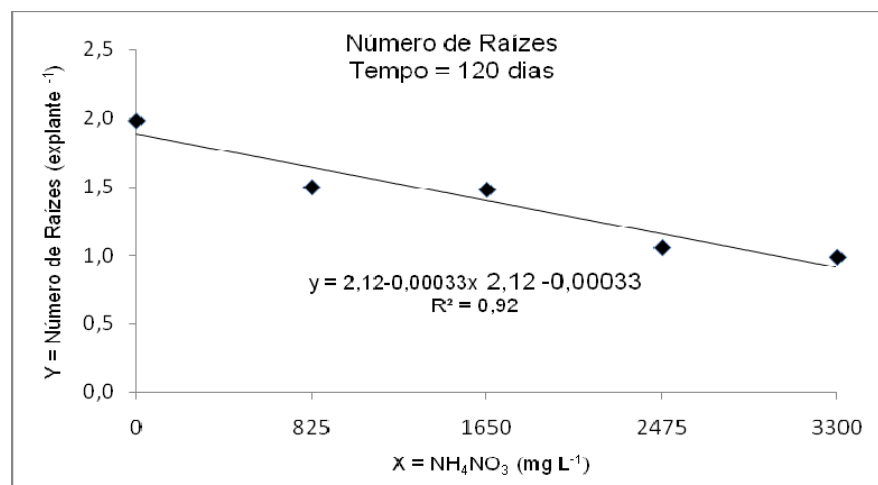


Figura 9 - Número de raízes de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 120 dias de cultivo

Notou-se que quanto maior a concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio, menor foi o número de raízes formadas.

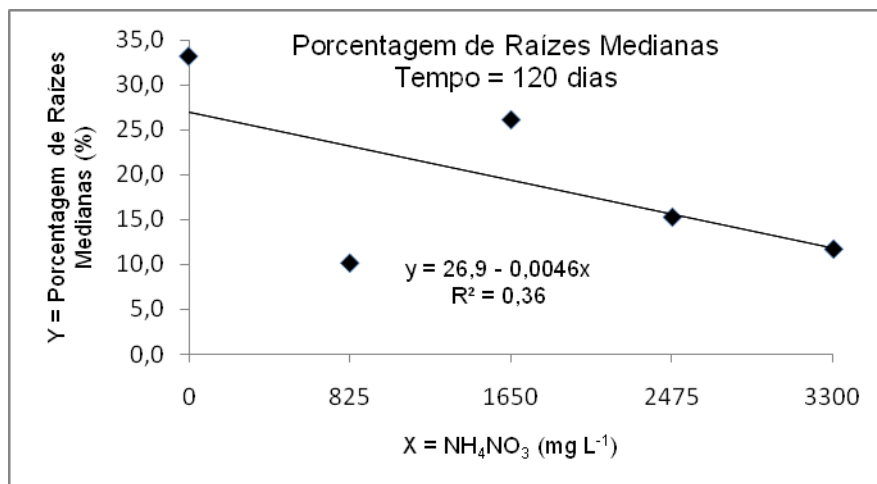


Figura 10 - Porcentagem de raízes medianas ( $1\text{mm} < \text{RM} < 1,5\text{mm}$  de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  aos 120 dias de cultivo

Verificou-se que houve tendência de diminuição da porcentagem de desenvolvimento de raízes medianas com o aumento das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio.

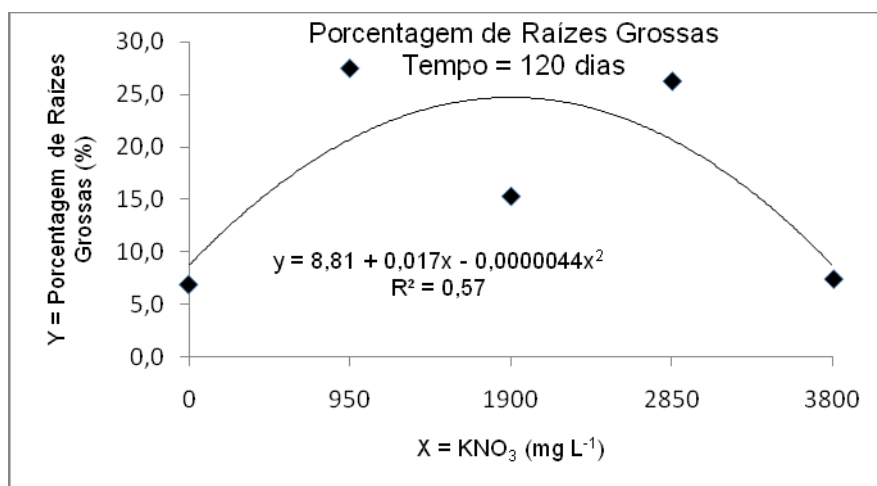


Figura 11 - Porcentagem de raízes grossas ( $\text{RG} > 1,5\text{mm}$  de diâmetro) de microplantas *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{KNO}_3$  aos 120 dias de cultivo

As raízes grossas ocorreram em maior quantidade nas concentrações intermediárias de  $\text{KNO}_3$  (50% e 150%) (Figura 12a), sendo que tanto a ausência quanto o fornecimento máximo não favoreceram a formação de raízes com diâmetro grosso.

Logo, aos 120 dias, observou-se que os tratamentos também foram significativos sobre o desenvolvimento da raiz, tanto em relação ao alongamento quanto à ramificação e ao número (Figura 12b), sendo que concentrações mais altas de ambos os sais, favoreceram a formação de raízes finas (Figura 12c e 12d) ao passo que o  $\text{KNO}_3$ , isoladamente, parece favorecer a formação de raízes de diâmetro grosso.

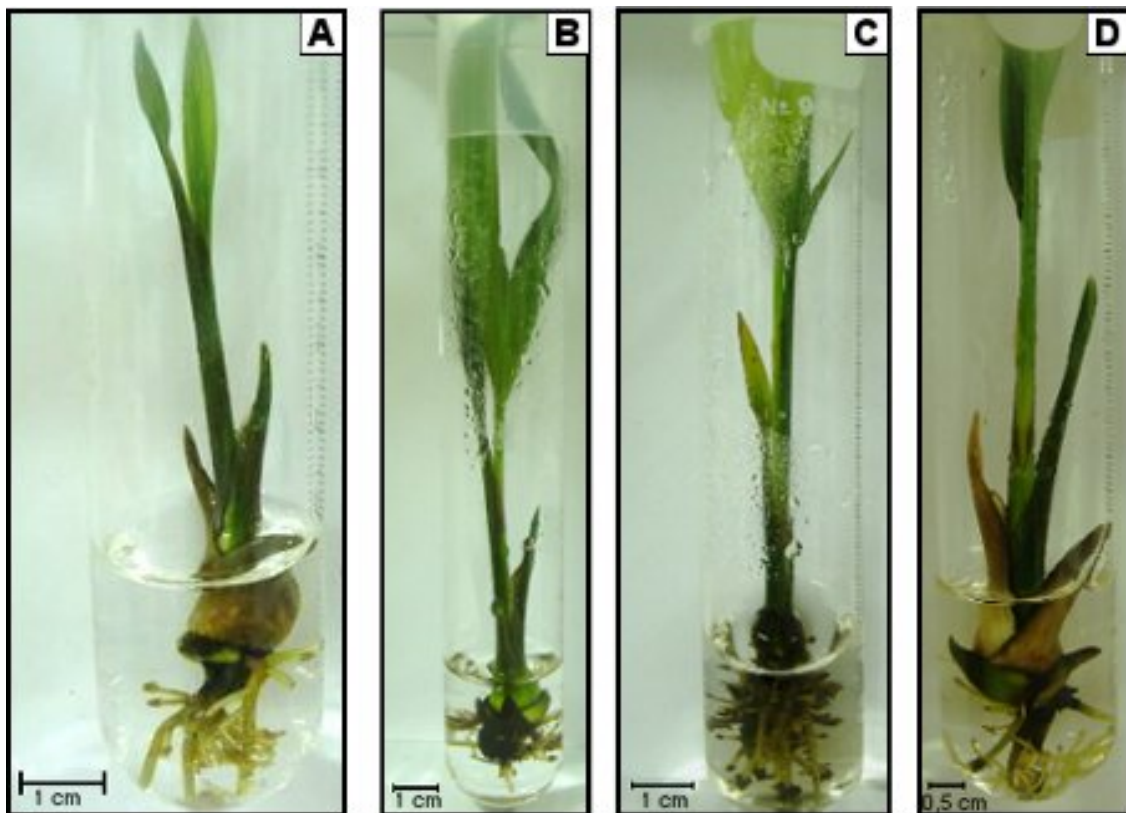


Figura 12 – Microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, com detalhe para o sistema radicular, aos 120 dias de cultivo. A. Raízes de diâmetro grosso (RG>1,5mm de diâmetro), submetidas ao tratamento T14. B. Formação de radicelas, submetidas ao tratamento T8. C. Elevada quantidade de raízes, submetidas ao tratamento T13. D. Raízes com diâmetro fino (RF<1mm de diâmetro), submetidas ao tratamento T20

### 5.1.1.3 Parâmetros Morfofisiológicos aos 180 dias de cultivo *in vitro*

A tabela 4 resume a análise de variância realizada para todos os parâmetros avaliados aos 180 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas (NF), porcentagem de ramificação da raiz (RA), porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro), porcentagem de raízes medianas (1mm ≤ RM ≤ 1,5mm de diâmetro) e porcentagem de raízes grossas (RG > 1,5mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios								
		CPA <sup>(1)</sup> cm explante <sup>-1</sup>	CR <sup>(1)</sup>	NR <sup>(1)</sup>	NB <sup>(1)</sup> explante <sup>-1</sup>	NF <sup>(1)</sup>	RA <sup>(1)</sup>	RF <sup>(1)</sup> %	RM <sup>(1)</sup>	RG <sup>(1)</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (A)	4	0,0955*	0,0420**	0,1028**	0,0109 <sup>ns</sup>	0,2481 <sup>ns</sup>	5,2095**	1,1480 <sup>ns</sup>	1,7000 <sup>ns</sup>	0,8566 <sup>ns</sup>
KNO <sub>3</sub> (B)	4	0,0507 <sup>ns</sup>	0,0292**	0,0599*	0,0105 <sup>ns</sup>	0,2031 <sup>ns</sup>	3,0519*	1,8259*	0,4454 <sup>ns</sup>	1,3724 <sup>ns</sup>
A * B	16	0,0208 <sup>ns</sup>	0,0069 <sup>ns</sup>	0,0180 <sup>ns</sup>	0,0207 <sup>ns</sup>	0,1660 <sup>ns</sup>	1,2982 <sup>ns</sup>	2,5082**	1,1009 <sup>ns</sup>	0,9820 <sup>ns</sup>
Resíduo	100	0,0314	0,0050	0,0177	0,0193	0,1314	0,8941	0,5861	1,2009	0,8277
Média	–	12,69	1,18	2,63	1,58	3,78	42,00	15,58	28,33	15,74
CV <sub>exp.</sub> (%)	–	15,64	17,70	25,31	34,01	40,48	53,69	50,42	43,86	54,77

<sup>ns</sup> valor não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* valores significativos em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $[(n+0,5)/10]^{0,5}$  pelo teste de Bartlett em nível de 5% de probabilidade de erro. n = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Neste período, observou-se que houve significância da interação entre os sais de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> apenas sobre a porcentagem de raízes finas (Figura 13). Para o comprimento da parte aérea (Figura 14), o comprimento da raiz (Figura 15), o número de raízes (Figura 16) e a porcentagem de ramificação da raiz (Figura 17), observou-se que houve influência significativa do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, de maneira isolada, enquanto que para o comprimento da raiz (Figura 18), o número de raízes (Figura 19) e a porcentagem de ramificação da raiz (Figura 20), houve influência significativa do KNO<sub>3</sub>, também isoladamente.



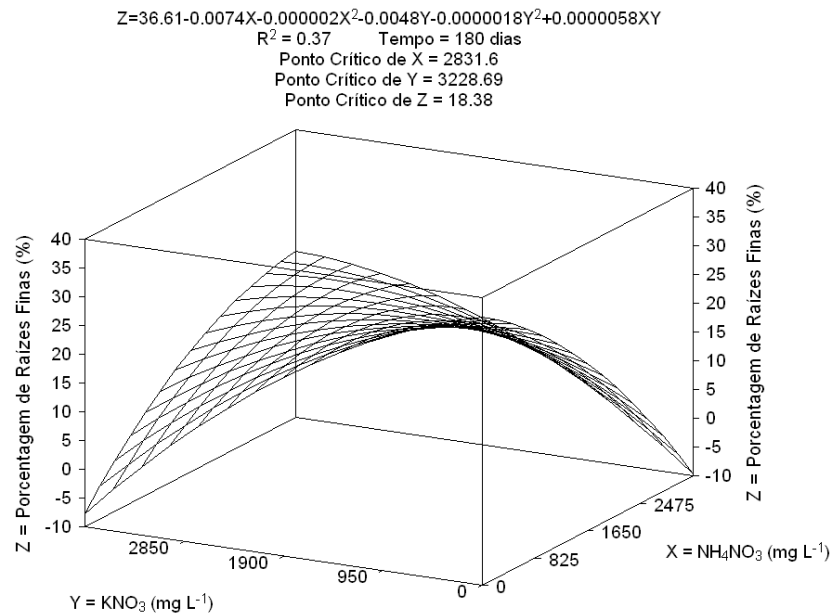


Figura 13 - Porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro) de microplantas *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

A formação de raízes finas foi influenciada pela interação dos sais de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo. As concentrações que mais favoreceram a formação de raízes finas foram as combinações mais baixas ou mais altas de ambos os sais, ou seja, as concentrações intermediárias não foram favoráveis. Na figura 21a pode-se observar a ocorrência de raízes de diâmetro fino.

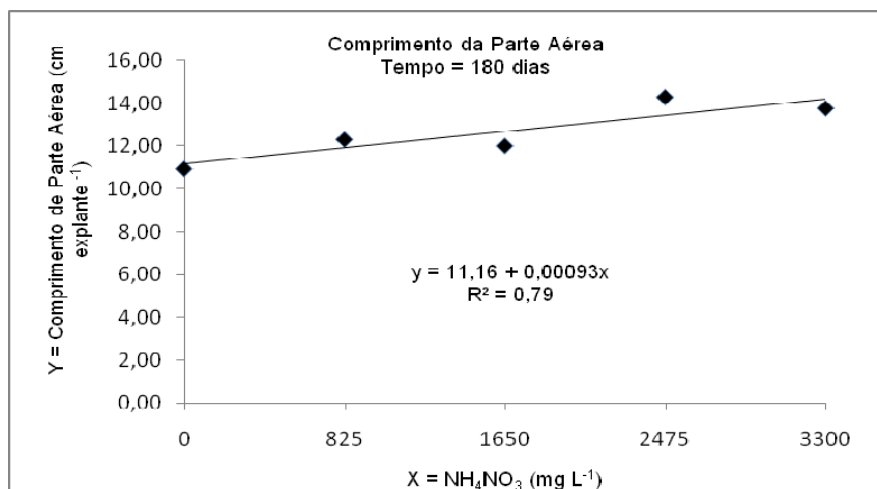


Figura 14 - Comprimento da parte aérea de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

Quanto maior a concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> notou-se um ligeiro incremento do comprimento da parte aérea aos 180 dias. Na figura 21b pode-se observar o crescimento da parte aérea.

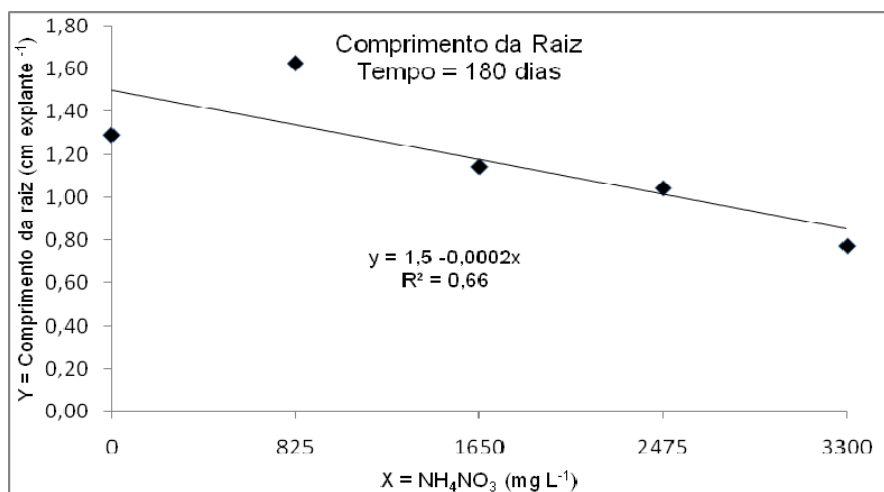


Figura 15 - Comprimento da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

Houve decréscimo do comprimento da raiz conforme se aumentou a concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 180 dias.

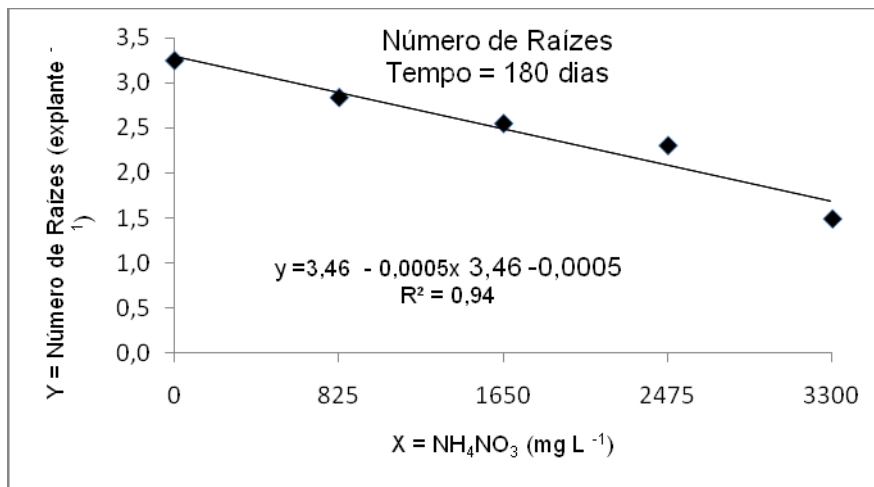


Figura 16 - Número de raízes de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

O número de raízes foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> no meio aos 180 dias.

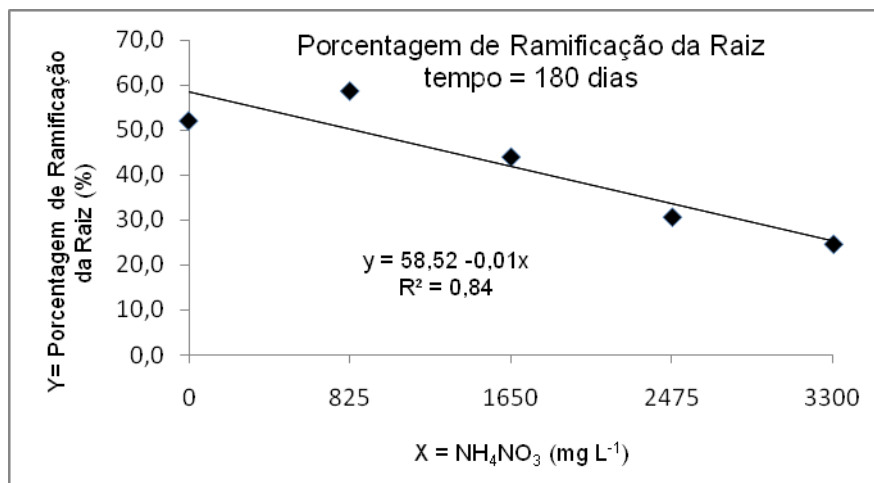


Figura 17 - Porcentagem de ramificação da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de H<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

Houve comportamento decrescente da curva com relação à porcentagem de ramificação da raiz em função da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ou seja, quanto maior a concentração deste, menor a porcentagem de raízes ramificadas, aos 180 dias. Na

figura 21d, pode-se observar uma figura representativa de um dos tratamentos que favoreceram a ramificação da raiz, bem como seu comprimento.

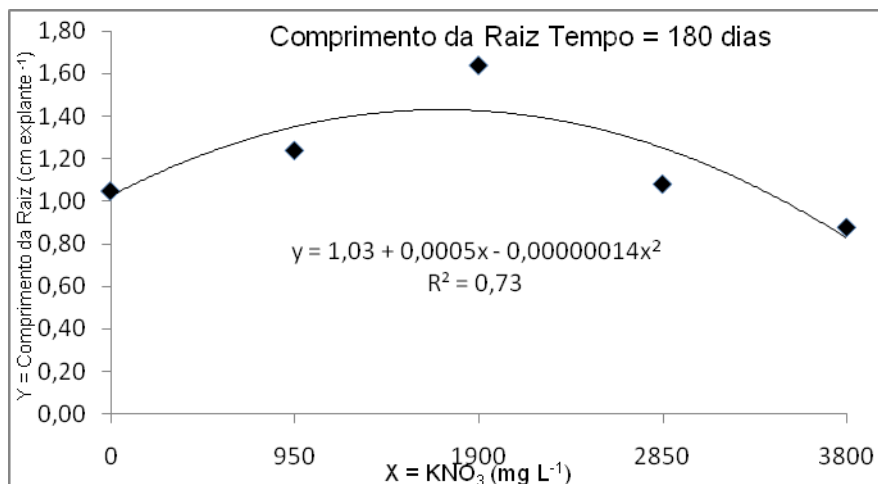


Figura 18 - Comprimento da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de KNO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

A concentração que mais favoreceu o alongamento da raiz aos 180 dias foi a de 1900 mg L<sup>-1</sup> (100%) de KNO<sub>3</sub> (Figura 21d).

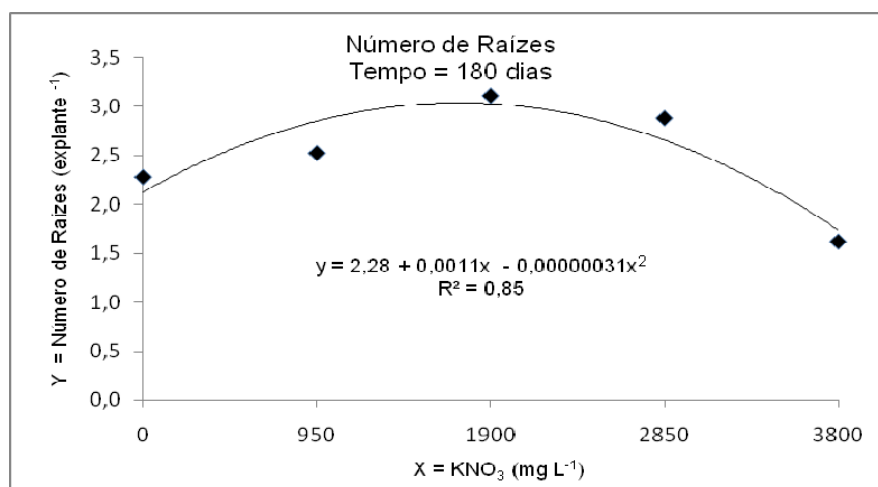


Figura 19 - Número de raízes de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de KNO<sub>3</sub> aos 180 dias de cultivo

Notou-se que ao redor de  $1900 \text{ mg L}^{-1}$  (100%) de  $\text{KNO}_3$ , foram encontrados os maiores valores para número de raízes (Figura 21c), ao passo que tanto sua falta quanto a concentração máxima foram desfavoráveis à formação de raízes.

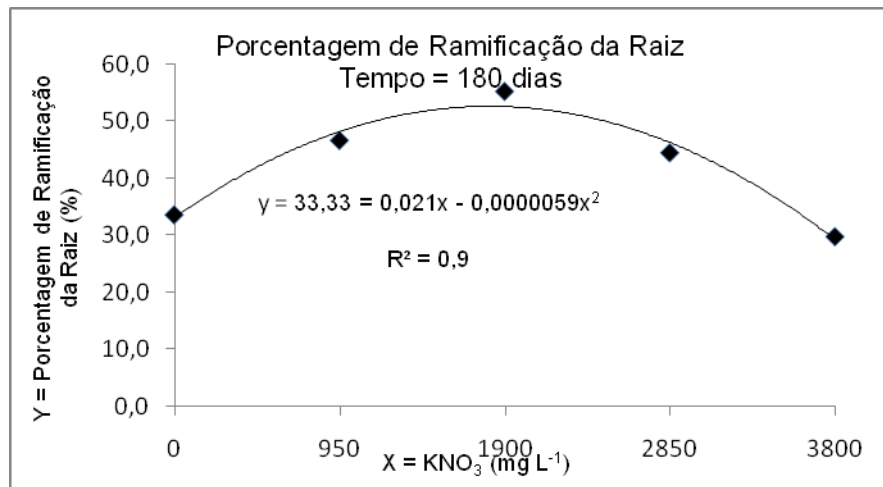


Figura 20 - Porcentagem de ramificação da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de  $\text{KNO}_3$  aos 180 dias de cultivo

O valor ótimo que mais favoreceu a ramificação radicular foi a concentração de  $1900 \text{ mg L}^{-1}$  (100%) de  $\text{KNO}_3$ , sendo que os valores extremos não foram favoráveis.

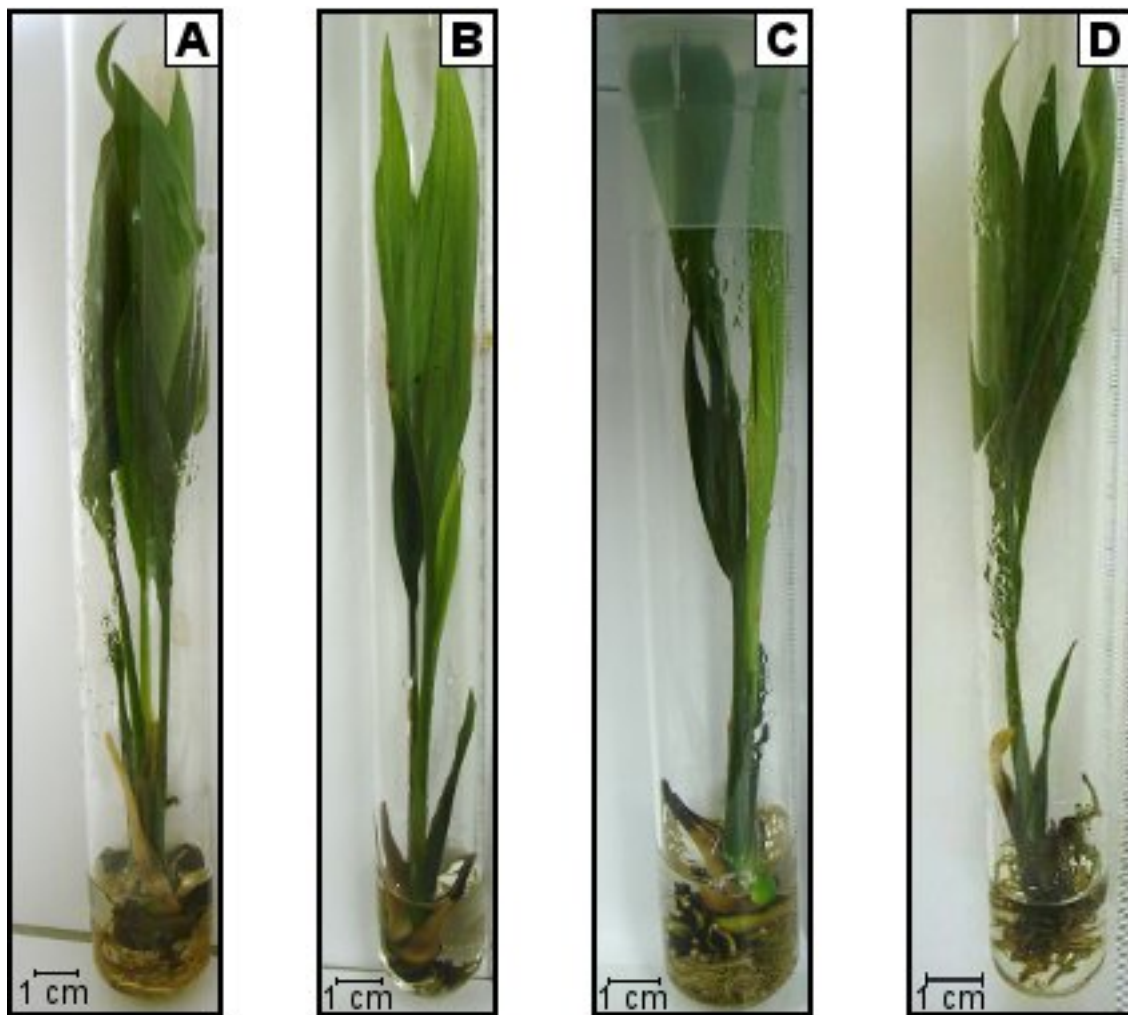


Figura 21 – Microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 180 dias de cultivo. A. Raízes com diâmetro fino (RF <1mm de diâmetro), submetidas ao tratamento T7. B. Comprimento elevado da parte aérea, submetidas ao tratamento T24. C. Elevada quantidade de radicelas, submetidas ao tratamento T24. D. Raízes longas e ramificadas, submetidas ao tratamento T8

#### 5.1.1.4 Parâmetros Morfofisiológicos aos 240 dias de cultivo *in vitro*

A tabela 5 resume a análise de variância realizada para todos os parâmetros avaliados aos 240 dias de cultivo *in vitro*.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância para o comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), número de raízes (NR), número de brotações (NB), número de folhas (NF), porcentagem de ramificação da raiz (RA), porcentagem de raízes finas (RF < 1mm de diâmetro), porcentagem de raízes medianas (1mm ≤ RM ≤ 1,5mm de diâmetro) e porcentagem de raízes grossas (RG > 1,5mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 240 dias de cultivo

Causas da Variação	G L	Quadrados Médios								
		CPA <sup>(1)</sup> cm explante <sup>-1</sup>	CR <sup>(1)</sup>	NR <sup>(1)</sup>	NB <sup>(1)</sup> explante <sup>-1</sup>	NF <sup>(1)</sup>	RA <sup>(1)</sup>	RF <sup>(1)</sup> %	RM <sup>(1)</sup>	RG <sup>(1)</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (A)	4	0,1167 <sup>ns</sup>	2,0839 <sup>ns</sup>	0,1407 <sup>**</sup>	0,4041 <sup>**</sup>	0,0435 <sup>**</sup>	10,0435 <sup>**</sup>	0,9863 <sup>ns</sup>	3,4076 <sup>ns</sup>	1,8373 <sup>ns</sup>
KNO <sub>3</sub> (B)	4	0,0704 <sup>ns</sup>	1,6159 <sup>ns</sup>	0,0758 <sup>**</sup>	0,0938 <sup>**</sup>	0,0133 <sup>ns</sup>	2,2602 <sup>ns</sup>	1,3774 <sup>ns</sup>	0,5804 <sup>ns</sup>	1,2893 <sup>ns</sup>
A * B	16	0,0481 <sup>ns</sup>	1,4049 <sup>ns</sup>	0,0211 <sup>ns</sup>	0,0328 <sup>*</sup>	0,0123 <sup>ns</sup>	1,4402 <sup>ns</sup>	1,9827 <sup>**</sup>	0,8534 <sup>ns</sup>	1,0938 <sup>ns</sup>
Resíduo	100	0,0486	1,5165	0,0196	0,0166	0,0094	1,1798	0,8916	1,5619	0,9424
Média	–	14,93	17,86	3,59	1,74	2,75	49,39	16,94	33,74	16,17
CV <sub>exp.</sub> (%)	–	18,05	26,57	23,02	30,54	17,85	58,54	52,64	69,23	58,65

<sup>ns</sup> valor não significativo em nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\* e \*\* valor significativo em nível de 5% e 1% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste F.

<sup>(1)</sup> dados transformados por  $[(n+0,5)/10]^{0,5}$  pelo teste de Bartlett em nível de 5% de probabilidade de erro. *n* = dado amostrado.

GL = graus de liberdade, CV<sub>exp.</sub> = coeficiente de variação experimental.

Aos 240 dias de cultivo, observou-se que houve significância da interação entre os sais de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> sobre o número de brotações (Figura 22) e a porcentagem de raízes finas (Figura 23). Já para o número de raízes (Figura 24), o número de folhas (Figura 25) e a porcentagem de ramificação da raiz (Figura 26), houve influência significativa do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, de maneira isolada. Para o número de raízes (Figura 27), houve influência significativa do KNO<sub>3</sub>, também isoladamente.

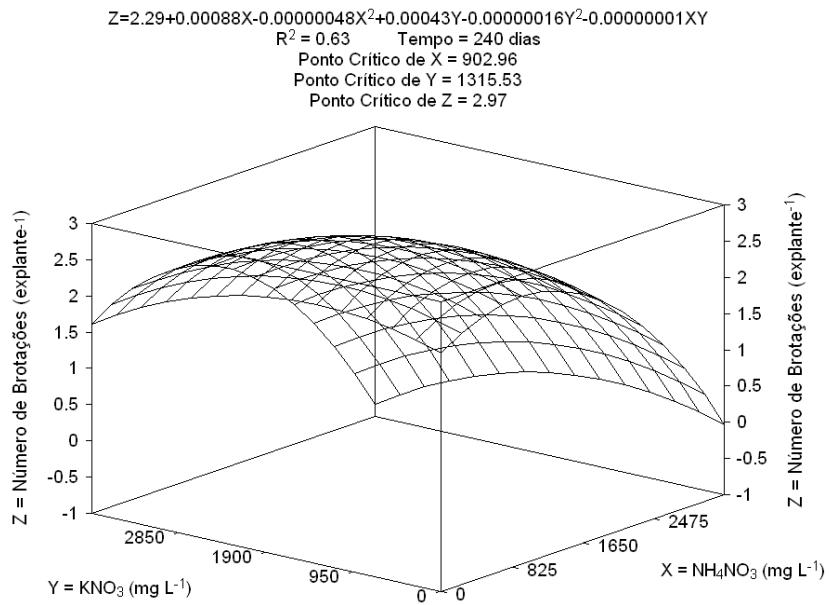


Figura 22 - Número de brotações de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 240 dias de cultivo

Pelos dados reais, as concentrações que mais favoreceram a formação de brotações aos 240 dias foram aquelas situadas entre 825 (50%) e 1650 (100%) mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e entre 1900 (100%) e 2850 (150%) L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.



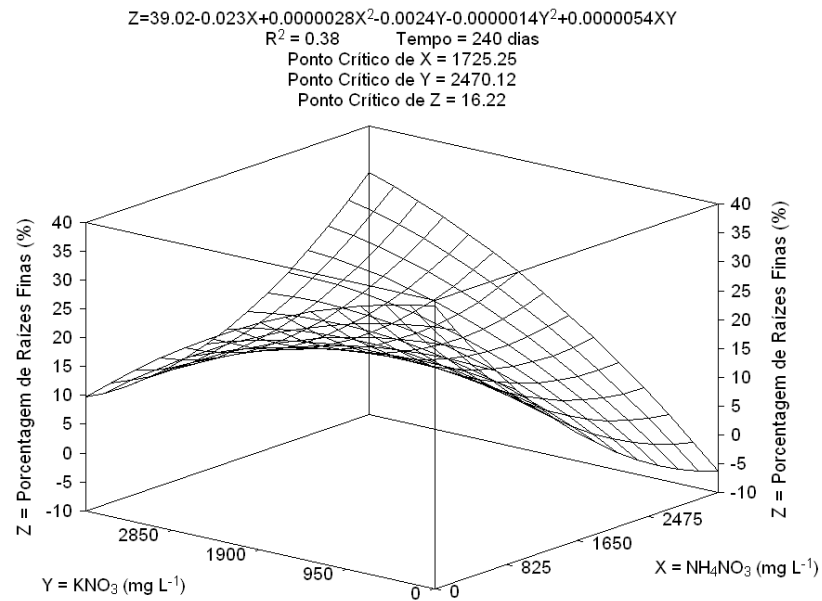


Figura 23 - Porcentagem de raízes finas (RF<1mm de diâmetro) de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub> aos 240 dias de cultivo

As raízes finas ocorreram em maior porcentagem nas interações mínimas e máximas das concentrações dos sais, ou seja, as concentrações intermediárias não favoreceram a formação de raízes finas.

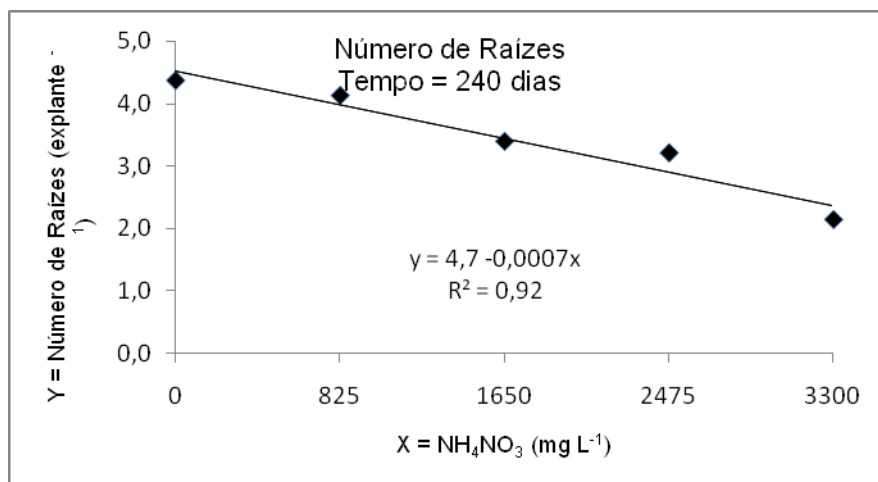


Figura 24 - Número de raízes microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 240 dias de cultivo

Os resultados obtidos evidenciaram uma tendência de diminuição do número de raízes com o aumento da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

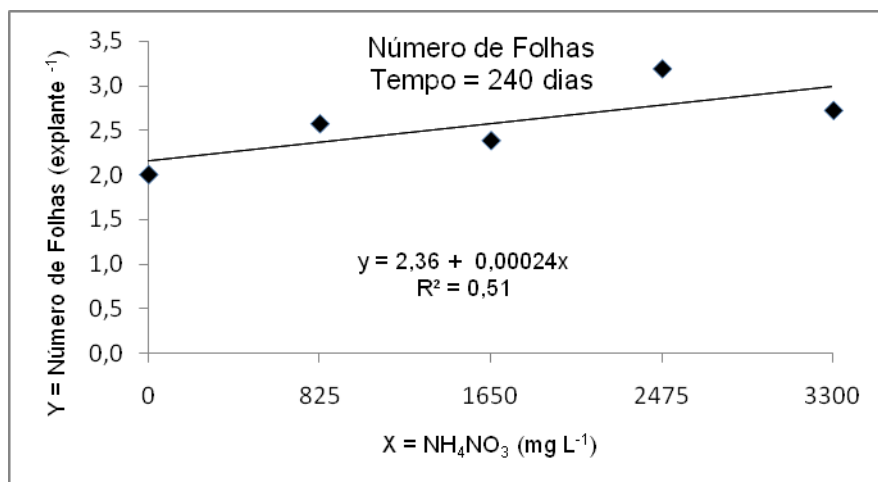


Figura 25 - Número de folhas de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

Observou-se tendência de aumento do número de folhas com o aumento da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 240 dias.

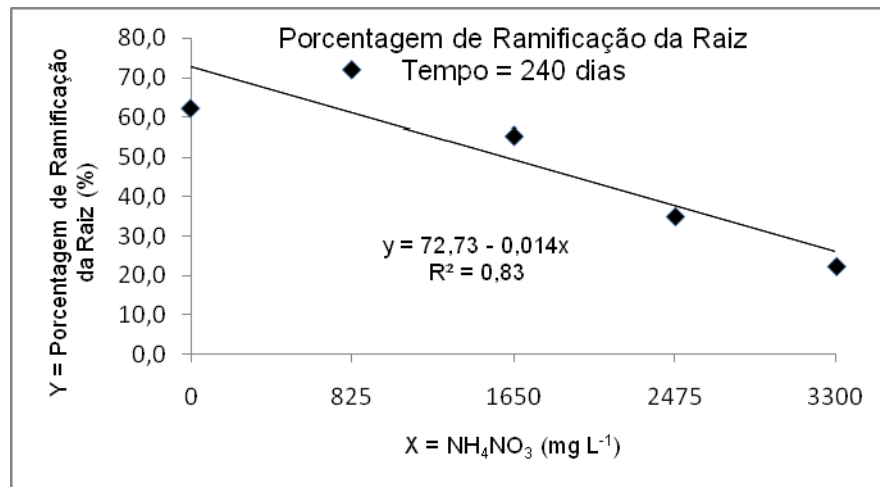


Figura 26 - Porcentagem de ramificação da raiz de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 240 dias de cultivo

Houve tendência de decréscimo da porcentagem de ramificação da raiz com o aumento da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> aos 240 dias.

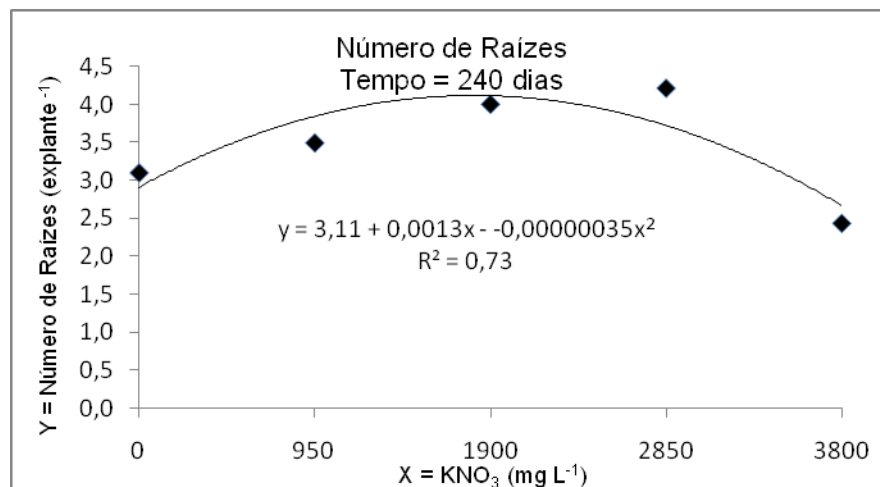


Figura 27 - Número de raízes de microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função das concentrações de KNO<sub>3</sub> aos 240 dias de cultivo

Quanto ao número de raízes, verificou-se que houve tendência de aumento até a concentração de 2850 mg L<sup>-1</sup> (150%) de KNO<sub>3</sub>, como pode ser observado na figura 28a, seguido de diminuição nas concentrações superiores.

Aos 240 dias, a redução do número de raízes de acordo com o aumento das concentrações dos sais foi mantido e observou-se que houve significância dos tratamentos sobre a formação de folhas (Figura 28b), de brotações (Figura 28c) e raízes finas (Figura 28d), confirmando que após 240 dias as microplantas estariam de fato investindo na formação de parte aérea.

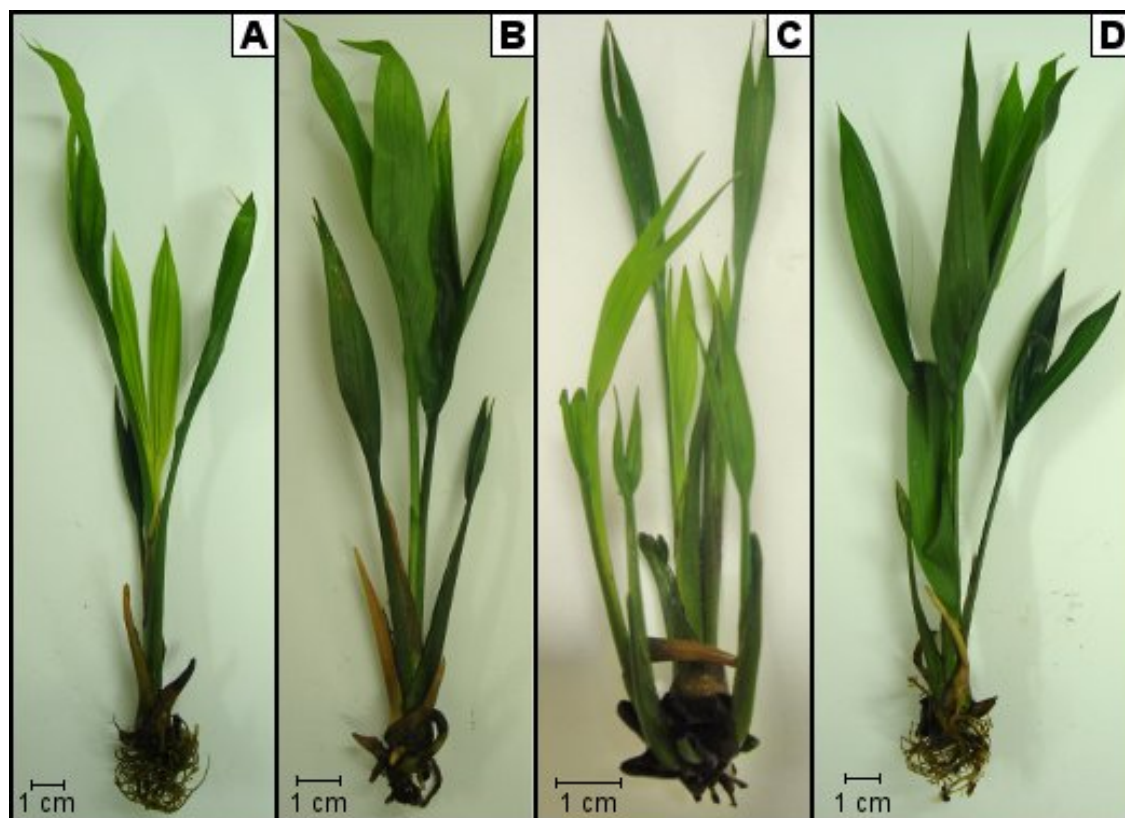


Figura 28 – Microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo. A. Elevado número de raízes, submetidas ao tratamento T24. B. Elevado número de folhas, submetidas ao tratamento T17. C. Elevado número de brotações, submetidas ao tratamento T8. D. Raízes com diâmetro fino (RF<1mm de diâmetro), submetidas ao tratamento T7

### 5.1.2 Quantificação de Proteínas Totais Solúveis

Pelo resultado da análise de variância (ANOVA) pôde-se observar que não houve interação entre  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ . Contudo, ocorreu efeito significativo para o  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  sobre a produção de proteínas totais solúveis, quando avaliados de maneira isolada, conforme se verifica na tabela 6.

Tabela 6 - Resumo da análise de variância para os valores de proteínas totais solúveis em função das soluções de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  em microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos

Causas da Variação	GL	Quadrado médio PTS ( $\text{mg.g}^{-1}$ )
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	4	0,000737*
$\text{KNO}_3$	4	0,000767*
$\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$	16	0,000436 <sup>ns</sup>
Resíduo	56	0,00032
Média		0,523
$\text{CV}_{\text{exp}}$ (%)		34,22

\*valor significativo em nível de 7% de probabilidade de erro, pelo teste F  
 ns = valor não significativo em nível de 7% de probabilidade de erro, pelo teste F  
 GL= grau de liberdade,  $\text{CV}_{\text{exp}}$  = coeficiente de variação experimental

Observou-se uma tendência de aumento do teor de proteínas totais solúveis (PTS) com o aumento das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , até os valores máximos nas concentrações de  $2475 \text{ mg L}^{-1}$  (150%) de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $2850 \text{ mg L}^{-1}$  (150%) de  $\text{KNO}_3$ , ocorrendo queda nos valores de PTS para as concentrações superiores, conforme as figuras 29 e 30, respectivamente.

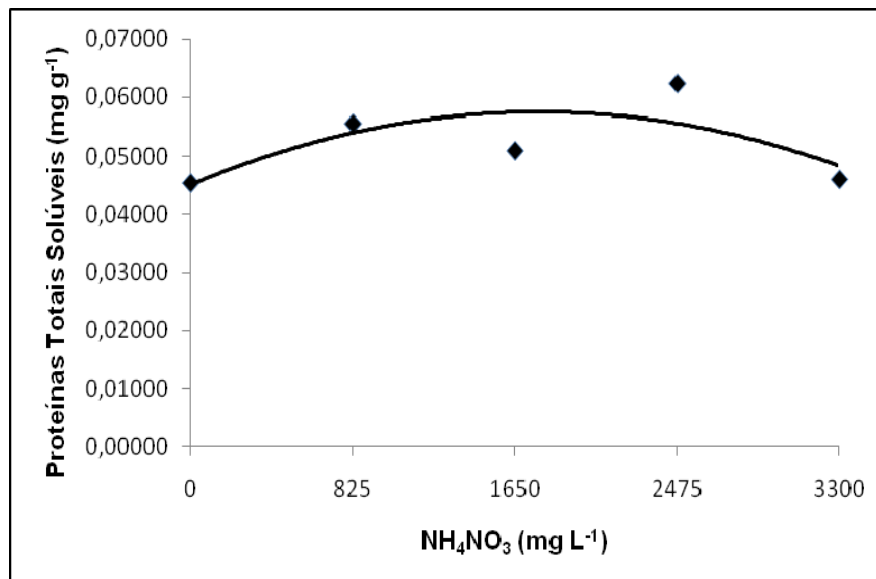


Figura 29 – Concentração de proteínas totais solúveis em microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , aos 240 dias de cultivo

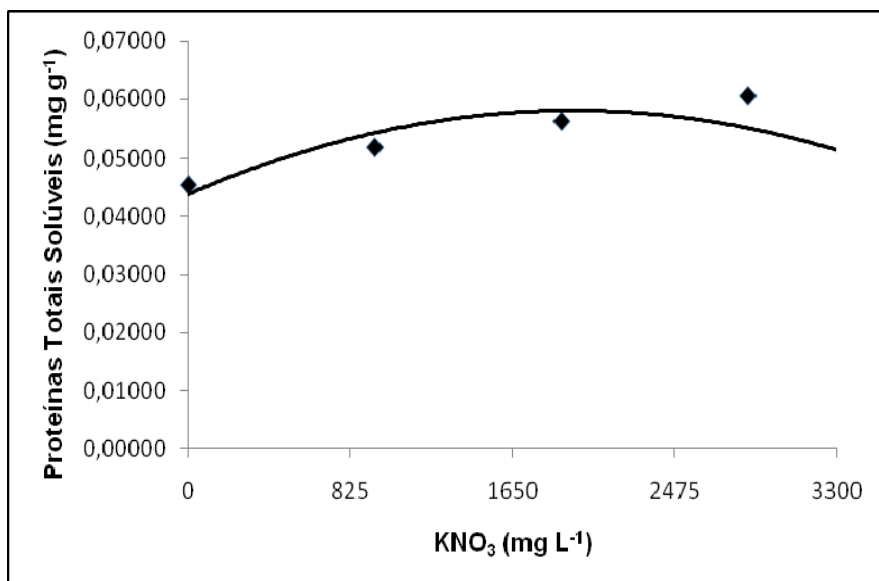


Figura 30 – Concentração de proteínas totais solúveis em microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos em função da concentração de KNO<sub>3</sub>, aos 240 dias de cultivo

De acordo com as equações, os pontos críticos de máximo estimados foram de 2224,74 mg L<sup>-1</sup> para o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e de 2340,45 mg L<sup>-1</sup> para o KNO<sub>3</sub>, o que corresponde, respectivamente, a 0,061 mg g<sup>-1</sup> e 0,059 mg g<sup>-1</sup> de PTS. Assim, pode-se inferir que as concentrações mais adequadas para a formação de PTS foram aquelas situadas entre 1650 (100%) e 2475 (150%) mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e entre 1900 (100%) e 2850 (150%) mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.

### 5.1.3 Avaliação indireta do teor de clorofila

Os dados obtidos pela análise de variância (ANOVA) para o índice SPAD mostram que houve interação entre NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e KNO<sub>3</sub>, conforme a tabela 7.

Tabela 7 – Resumo da análise de variância para os valores do índice SPAD em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  em microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos

<b>Causas da Variação</b>	<b>GL</b>	<b>Quadrado médio SPAD</b>
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	4	5,541 **
$\text{KNO}_3$	4	2,145**
$\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$	16	1,094**
Resíduo	174	0,037
Total	198	
Média		6,79
$\text{CV}_{\text{exp}}$ (%)		2,86

\*\* valor significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

GL = graus de liberdade,  $\text{CV}_{\text{exp}}$  = coeficiente de variação experimental.

De acordo com a equação ajustada (Figura 31), o ponto ótimo seria a combinação das concentrações de 940,79  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 1407,90  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{KNO}_3$ , resultando em estimativa do valor do Índice SPAD de 51,27.

Os valores dos eixos “X” e “Y” da figura 31, correspondentes às concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , foram apresentados de maneira decrescente para facilitar a visualização dos dados.

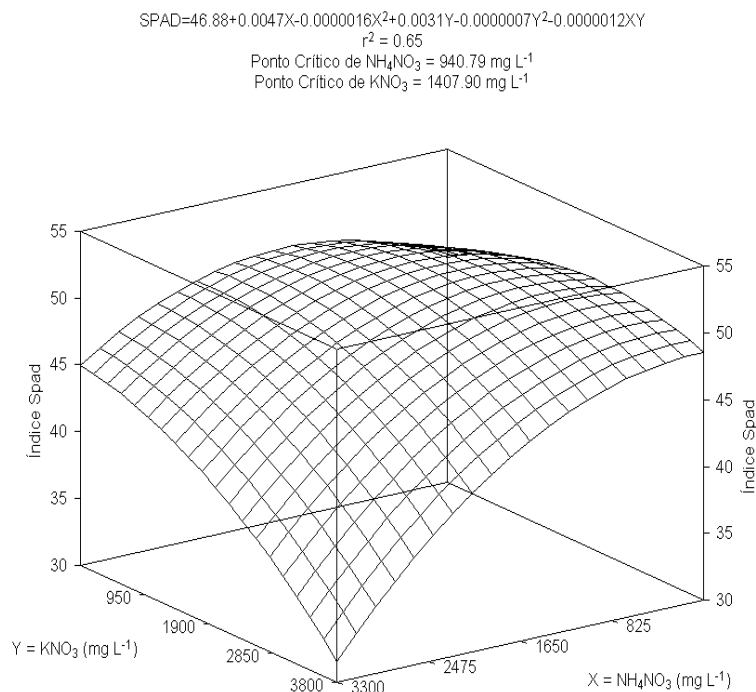


Figura 31 - Valor estimado do índice SPAD em microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, conforme equação ajustada, em função das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , aos 240 dias de cultivo

Ao comparar os valores ajustados com os dados reais, os melhores valores esperados para o índice SPAD estariam situados entre as concentrações até 1650 (100%)  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e até 1900 (100%)  $\text{mg L}^{-1}$  para o  $\text{KNO}_3$ .

Assim, pode-se inferir que houve o favorecimento da formação de clorofila nas concentrações de 50 a 100% de ambos os sais, ao passo que quando um deles foi fornecido acima dessa porcentagem, a formação da clorofila foi prejudicada.

#### 5.1.4 Avaliação do teor de macro e micronutrientes

As interações observadas referem-se à microplanta inteira. Para avaliar a interação do  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e do  $\text{KNO}_3$  sobre os macro e micronutrientes, foi confeccionada uma matriz de correlação de Pearson, apresentada no Anexo A. As interações onde houve correlação significativa estão mostradas nas figuras de 32 a 41.



Ocorreu correlação negativa entre as concentrações de  $\text{KNO}_3$  no meio MS e de zinco nas microplantas (Figura 32).

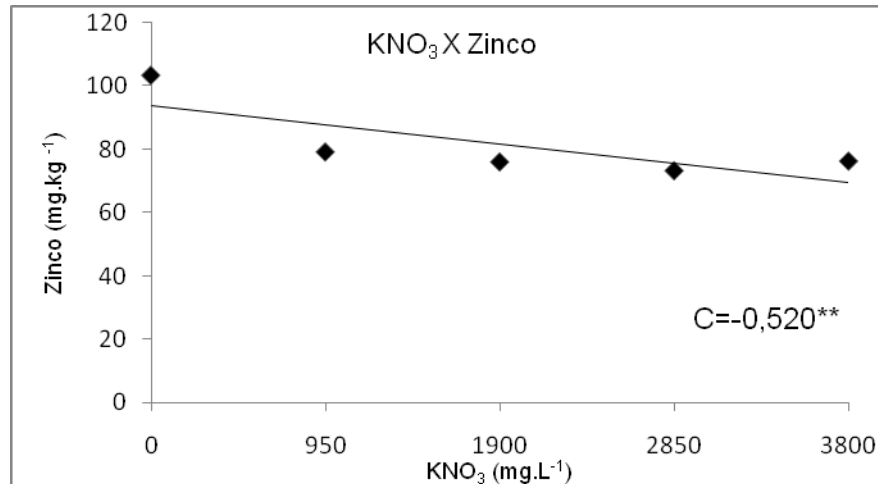


Figura 32 - Variação da concentração de zinco nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de  $\text{KNO}_3$ . C = coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste F

Ocorreu correlação positiva entre as concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio MS e de cobre nas microplantas (Figura 33).

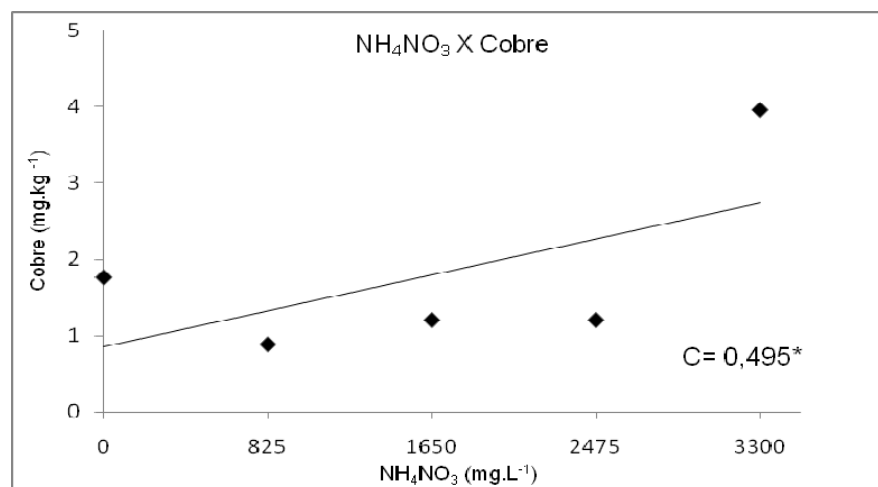


Figura 33 - Variação da concentração de cobre nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . C = coeficiente de correlação. \* 5% de probabilidade de erro pelo teste F

Também foi verificada correlação negativa entre as concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  no meio MS e de manganês nas microplantas (Figura 34).

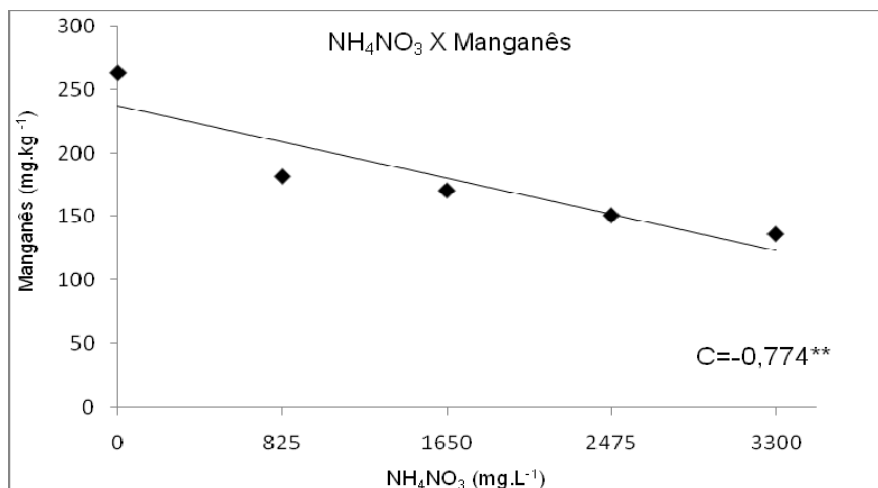


Figura 34 - Variação da concentração de manganês nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . C = coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste F

Observou-se correlação negativa entre as concentrações isoladas de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  no meio MS e a concentração de fósforo nas microplantas (Figuras 35 e 36).

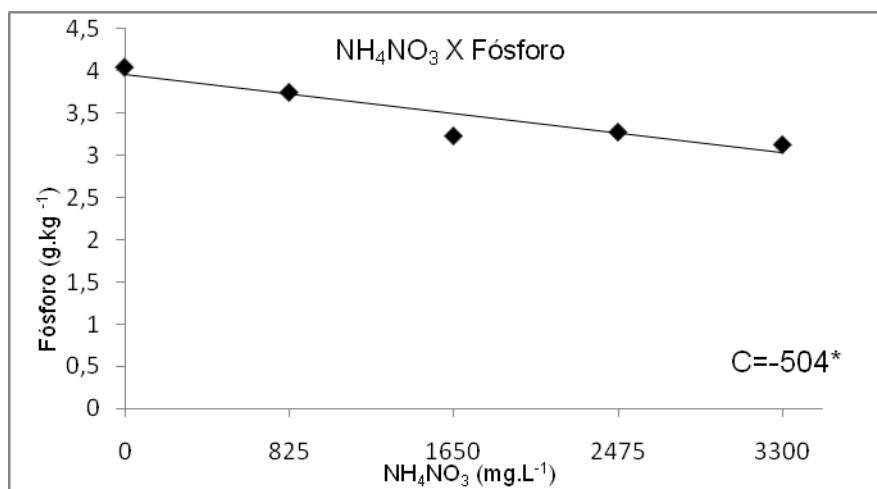


Figura 35 - Variação da concentração de fósforo nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . C = coeficiente de correlação. \* 5% de probabilidade de erro pelo teste F

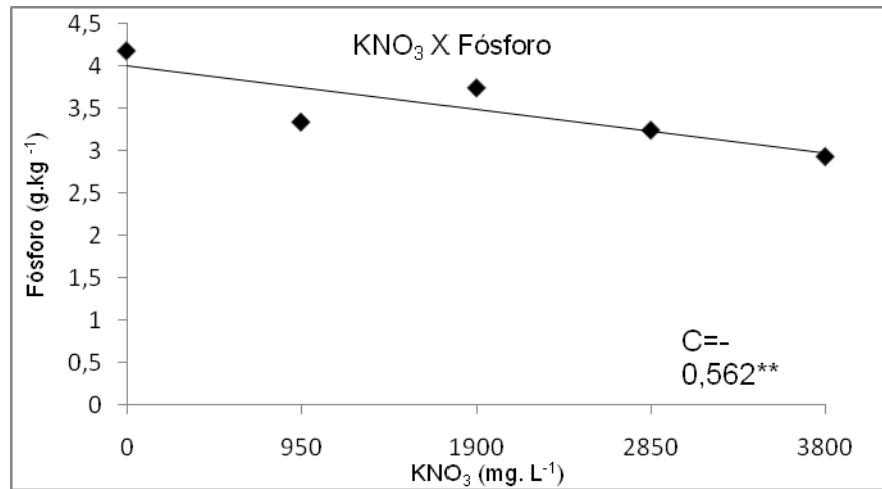


Figura 36 - Variação da concentração de fósforo nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de KNO<sub>3</sub>. C= coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste F

Ocorreu correlação positiva entre as concentrações de KNO<sub>3</sub> no meio MS e de potássio nas microplantas (Figura 37).

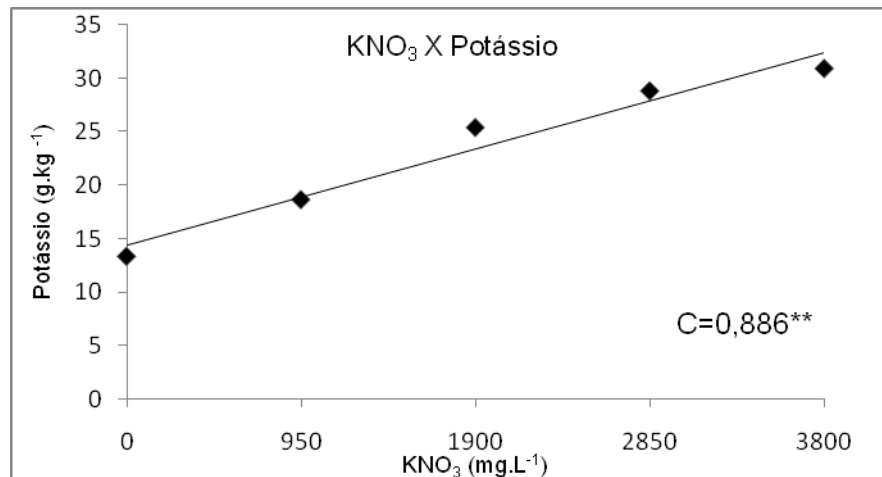


Figura 37 - Variação da concentração de potássio nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de KNO<sub>3</sub>. C = coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste F

Ocorreu correlação negativa entre as concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> no meio MS e de cálcio nas microplantas (Figura 38).

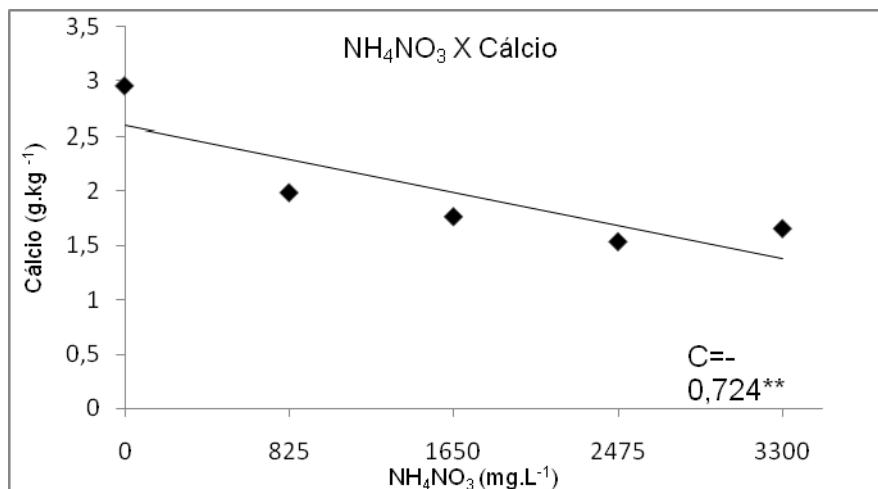


Figura 38 - Variação da concentração de cálcio nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. C = coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste F

Ocorreu correlação negativa entre as concentrações isoladas de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e de KNO<sub>3</sub> no meio MS e a concentração de magnésio nas microplantas (Figuras 39 e 40).

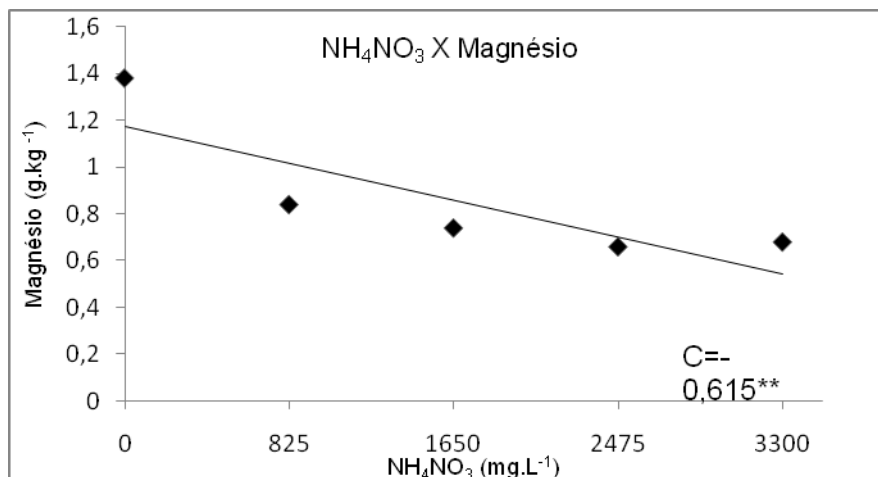


Figura 39 - Variação da concentração de magnésio nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. C = coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste

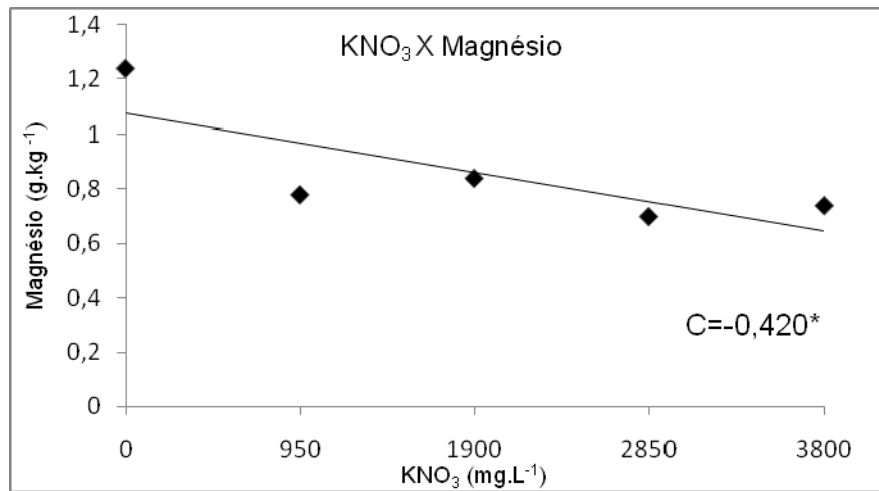


Figura 40 - Variação da concentração de magnésio nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de KNO<sub>3</sub>. C = coeficiente de correlação. \* 5% de probabilidade de erro pelo teste F

Ocorreu correlação positiva entre as concentrações de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> no meio MS e de nitrogênio nas microplantas (Figura 41).

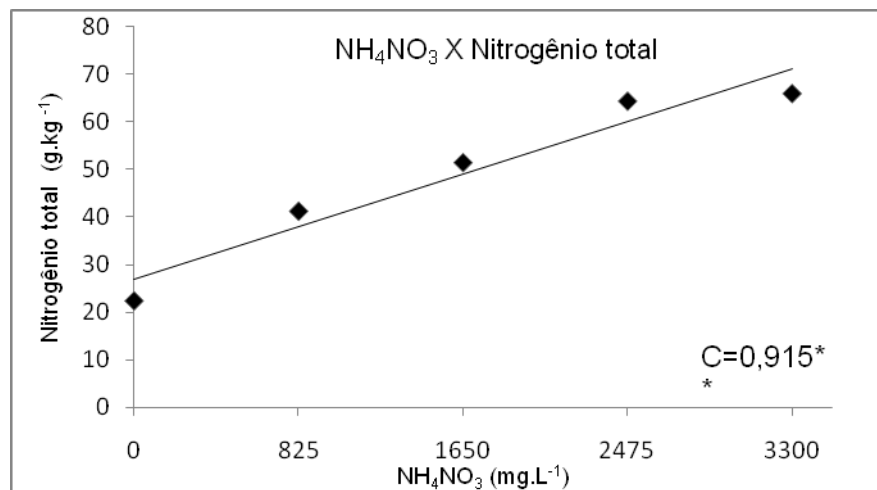


Figura 41 - Variação da concentração de nitrogênio total nas microplantas de *B. gasipaes* desenvolvidas a partir de embriões somáticos, aos 240 dias de cultivo, em função da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. C = coeficiente de correlação. \*\* 1% de probabilidade de erro pelo teste F

Nota-se que a concentração de nitrogênio na massa seca das microplantas aumentou linearmente com o suprimento de nitrato de amônio.



## 6 DISCUSSÃO

No metabolismo do nitrogênio, ocorre um gatilho através da presença de nitrato, que desencadeia mudanças na expressão genética, resultando em uma reprogramação do metabolismo de carbono e de nitrogênio para facilitar a captura e assimilação de nitrato e também para iniciar as mudanças associadas no metabolismo de carbono. Esses sinais derivados do nitrato interagem com os sinais gerados mais adiante no metabolismo do nitrogênio. Sinais derivados do nitrato interno e externo também ajustam o crescimento e a arquitetura da raiz ao estágio fisiológico da planta, e a distribuição do nitrato no ambiente (STITT, 1999).

Além disso, sabe-se que níveis altos de fertilização com nitrogênio levam a alterações no metabolismo de carbono e mudanças na alocação e fenologia da planta, com alteração da arquitetura radicular (MARSCHNER, 1995; SCHEIBLE et al., 1997; STITT; FEIL, 1997).

Sabe-se ainda que a alocação de recursos durante o crescimento vegetativo depende da disponibilidade do nitrogênio e de outros nutrientes (MARSCHNER, 1995). A deficiência moderada de nitrogênio inibe o crescimento da parte aérea e até estimula o crescimento da raiz, o que poderia justificar o fato de a raiz ter crescido no início do experimento mesmo sob baixas concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , corroborando com os dados obtidos por Illenser e Paulilo (2002), que verificaram que em plantas de *Euterpe edulis* deficientes em nitrogênio, a taxa de crescimento relativo foi diminuída.

Nas concentrações mais baixas de nitrogênio, há estímulo do crescimento da raiz, pois a deficiência moderada de nitrogênio inibe o crescimento da parte aérea e até estimula o crescimento da raiz (SCHEIBLE et al., 1997). E mesmo um maior suprimento de nitrogênio leva a uma inibição geral do crescimento, mas o crescimento da raiz é menos reduzido que o da parte aérea. Essa mudança na alocação permite a produção foliar e fotossíntese aumentar quanto há nitrogênio em quantidade adequada e permite que o investimento no crescimento da raiz aumente para melhorar a aquisição de nutrientes quando o nitrogênio é limitante (BLOOM; CHAPIN; MOONEY, 1985; SCHULZE; CHAPIN, 1987).

O nitrato de potássio é um importante componente do meio de cultura justamente por ter o nitrogênio e o potássio controlando o crescimento e desenvolvimento das raízes e por regular o potencial osmótico das células vegetais, respectivamente (RIBEIRO; TEIXEIRA, 2008).

A maior ramificação radicular dependeu do balanço entre baixas concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e altas de  $\text{KNO}_3$ , pois o potássio é necessário para o crescimento em geral da planta e em baixas concentrações o estaria inibindo, pois a deficiência do potássio leva ao mau desenvolvimento do sistema radicular (RIBEIRO; TEIXEIRA, 2008).

Sabe-se que níveis altos de fertilização com nitrogênio levam ao aumento da produção de aminoácidos e proteínas e do crescimento (MARSCHNER, 1995; CRAWFORD, 1995; Von WIREN; GAZZARRINI; FROMMER, 1997; FORDE; CLARKSON, 1999; BERNIER et al., 1993) e também a alterações no metabolismo de carbono como altos níveis de ácidos orgânicos e decréscimo no nível de amido (SCHEIBLE et al., 1997) e de reguladores vegetais (MARSCHNER, 1995; CRAWFORD, 1995). Além disso, podem ocorrer mudanças na alocação e fenologia, incluindo um aumento da relação parte aérea/raiz (SCHEIBLE et al., 1997). Isso ocorre porque com altos níveis de nitrogênio a planta pode investir seus carboidratos na formação da parte aérea, sem necessidade de grande amplificação do seu sistema radicular, uma vez que o suprimento nutricional não está deficiente.

Considerando-se que a fertilização por nitrogênio pode modificar a arquitetura radicular, altos níveis de nitrato geralmente inibem o crescimento radicular, bem como a quantidade de raízes laterais (MARSCHNER, 1995; GRIME et al., 1991). Exemplos da diminuição das raízes laterais em decorrência do excesso de nitrato foram observados em *Arabidopsis*, especialmente em mutantes deficientes da enzima nitrato redutase (ZHANG; FORDE, 1998; ZHANG et al., 1999).

De maneira geral, pôde-se perceber que na fase inicial de cultivo (60 dias), os tratamentos tiveram maior influência sobre o crescimento e a ramificação da raiz, permitindo inferir que as microplantas absorveram melhor os nutrientes do meio de cultura, porém com maior número de raízes com diâmetro mediano e grosso, a ainda menos funcionais. Após 120 dias de cultivo, houve desenvolvimento da parte aérea e maior quantidade de raízes finas foi formada, seguindo a mesma tendência aos 180



dias. Ao final do experimento (240 dias), observou-se muito mais influência dos tratamentos sobre o desenvolvimento da parte aérea (crescimento, formação de brotações e de folhas) e as raízes prevaletentes foram as mais finas e mais funcionais, sendo que o crescimento da raiz não foi tão intenso.

Quanto ao teor de proteínas totais solúveis, os resultados corroboram com os obtidos por Ruiz e Romero (1999), que observaram que níveis adequados de  $\text{NO}_3^-$  derivados da fertilização com nitrogênio aumentam a atividade da enzima nitrato redutase (NR) em pepino, o que leva a um aumento no potencial de redução de  $\text{NO}_3^-$  e confere uma grande capacidade para a síntese de aminoácidos, proteínas, ou assimilação de N total (BARNEIX; CAUSIN, 1996).

Além disso, sabe-se que a assimilação de N pelas plantas requer a absorção de  $\text{NO}_3^-$ , sua redução a  $\text{NO}_2^-$ , a conversão de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  e a incorporação do  $\text{NH}_4^+$  a compostos orgânicos (SIVASANKAR; OAKS, 1996; STITT, 1999). Portanto, o nitrato é a principal forma de assimilação do nitrogênio inorgânico disponível para as plantas e a nitrato redutase, cuja síntese e atividade são induzidas pelo substrato (BEEVERS; HAGEMAN, 1969), é a primeira enzima da rota de assimilação do nitrogênio inorgânico, assumindo papel essencial no metabolismo das plantas (DELÚ-FILHO; OLIVEIRA; ALVES, 1998).

No trabalho de Ruiz e Romero (1999), como esperado, a menor assimilação de  $\text{NO}_3^-$  no tratamento com menor aplicação de nitrato ( $5\text{gNO}_3^-/\text{m}^2$ ) levou às menores concentrações tanto de aminoácidos quanto de proteínas. No entanto, as maiores concentrações desses compostos foram registradas no tratamento com  $40\text{gNO}_3^-/\text{m}^2$  (maior concentração). Isso sugere que inicialmente a assimilação foliar de  $\text{NO}_3^-$  nessas plantas foi maior que nos tratamentos com concentrações de  $\text{NO}_3^-$  inferiores, aumentando significativamente a síntese e acúmulo de aminoácidos e proteínas. Contudo, o acúmulo de compostos nitrogenados, juntamente com o excesso foliar de  $\text{NO}_3^-$  no tratamento com  $40\text{gNO}_3^-/\text{m}^2$  pôde inibir ou diminuir a atividade da NR, como mostrado em diversos trabalhos (BARNEIX; CAUSIN, 1996). O mesmo pode ter ocorrido com as microplantas de pupunheira, ou seja, com o aumento das concentrações de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , a concentração de PTS (proteínas totais solúveis)

aumentou, devido ao fato de o maior fornecimento de nitrato levar à maior produção de proteínas.

No entanto, nas concentrações de 1650 mg L<sup>-1</sup> (200%) de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e de 1900 mg L<sup>-1</sup> (200%) de KNO<sub>3</sub>, houve decréscimo da produção de proteínas, o que também corrobora com os experimentos de Quirellé et al. (1994), onde verificou-se que o excesso do suprimento de nitrogênio pode ser prejudicial, e o acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em muitas culturas pode ser um problema (QUIRELLE et al., 1994). O acúmulo de nitrato em plantas ocorre quando há desequilíbrio entre a absorção e a assimilação do íon, sendo que as quantidades excedentes são armazenadas nos vacúolos (MANTOVANI; FERREIRA; CRUZ, 2005). De acordo com diferentes autores, diversos fatores podem influenciar no acúmulo de nitrato nas plantas, tais como a adubação nitrogenada, o genótipo, a disponibilidade de molibdênio, o sistema de cultivo, a intensidade de luz, a temperatura e a umidade do solo (MAYNARD et al., 1976; MONDIN, 1996).

Embora em plantas ainda não estejam totalmente claros os metabólitos envolvidos na sinalização do nitrogênio, sabe-se que em folhas os níveis endógenos de amônio ou glutamina freqüentemente estão negativamente relacionados com o nível de transcritos de nitrato redutase (SCHEIBLE et al., 1997; MIGGE et al., 1997; GEIGER et al., 1998), e a adição de amônio e glutamina tipicamente leva ao decréscimo dos transcritos para o sistema de alta afinidade (KRAPP et al., 1998; FILLEUR.; DANIELLE-VEDELE, 1998; AMARASINGH et al., 1998), baixa afinidade (LEJAY et al., 1999; LAUTER et al., 1998), nitrato redutase (MIGGE et al., 1997; SCHEIBLE et al., 1997; VINCENTZ et al., 1993) e nitrito redutase (VINCENTZ et al., 1993). Alguns experimentos indicam que a glutamina, preferencialmente ao amônio, é o metabólito responsável pela repressão da nitrato redutase (SIVASKAR; ROTHSTEIN; OAKS, 1997).

Assim, uma justificativa para a diminuição da produção de proteínas nos tratamentos com alta concentração de nitrato poderia ser a de que a planta estaria acumulando o nitrato, pelo excesso de fornecimento de nitrogênio, e não o reduzindo, dessa forma inibindo a produção de aminoácidos e proteínas.

Com relação à clorofila, sua determinação geralmente é realizada via extração dos solutos foliares e seguida pela determinação em espectrofotômetro. No entanto,

apesar de eficiente, esse tipo de análise é destrutivo e, por isso, metodologias alternativas não destrutivas têm sido desenvolvidas.

Nesse contexto, o medidor indireto de clorofila SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) (MINOLTA, 1989) tem sido considerado uma boa alternativa para obtenção do teor de clorofila de maneira indireta e não destrutiva.

Sabe-se que existe forte correlação entre o conteúdo de clorofila foliar e o índice SPAD (DWYER; TOLLENAAR; HOUWING, 1991; VOS; BOM, 1993; KAPOTIS et al., 2003; MADEIRA et al., 2003). No entanto, essa relação varia entre diferentes espécies e condições de cultivo (PINKARD; PATEL; MOHAMMED, 2006). A diferença entre espécies pode ser atribuída a distintas propriedades ópticas das folhas (MONJE; BUGBEE, 1992; THOMPSON; SCHWEITZER; NELSON, 1996), uma vez que o equipamento SPAD-502 mede justamente a transmitância de dois comprimentos de onda (660 e 940nm) sobre a lâmina foliar avaliada. No comprimento de onda de 660nm há absorção pela molécula de clorofila, ao passo que no comprimento de 940nm isso não ocorre. Através da leitura diferencial desses valores, o equipamento calcula um número ou índice SPAD (PINKARD; PATEL; MOHAMMED, 2006), que é proporcional à quantidade de clorofila foliar.

Alguns fatores, tais como posição das folhas, estágio de desenvolvimento e fertilização por nitrogênio podem influenciar o índice SPAD (ANAND; BYJU, 2008). Como as microplantas utilizadas no experimento eram clones e portanto estavam no mesmo estágio de desenvolvimento e foram cultivadas nas mesmas condições laboratoriais, atribui-se a variação do índice SPAD às modificações no suprimento de nitrogênio.

Em diferentes espécies, foram obtidas correlações lineares entre o valor do SPAD e o teor de clorofila (CAMPBELL et al., 1990; SCHAPER; CHACKO, 1991; BARRACLOUGH; KYTE, 2001; CATE; PERKINS, 2003) e curvilíneas (PINKARD; VATEL; MOHAMMED, 2006).

Para *B. gasipaes*, Batagin (2008) verificou que há correlação linear entre o teor de clorofila total e o índice SPAD em plantas *in vivo* aos nove meses de cultivo, cujos valores podem ser obtidos através da equação de calibração. Uma vez que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos valores do índice SPAD para

plantas *in vivo* e *in vitro*, considerou-se que os valores obtidos para o índice SPAD podem ser extrapolados para a espécie também *in vitro*.

Em condições de cultivo *in vitro* com presença de sacarose, muitas espécies apresentam folhas que não desenvolvem capacidade fotossintética, tendo assim caráter heterotrófico (GROUT, 1988). Logo, quando o suprimento de nitrogênio no meio foi excessivo (acima de 100%), o teor de clorofila (e conseqüentemente o nível fotossintético) das microplantas não acompanhou o aumento da concentração de nitrogênio, provavelmente por não haver necessidade de tanta produção de carboidratos, uma vez que poderiam ser utilizados diretamente do meio de cultura. Avila (1998), ao diminuir a concentração de nitrogênio do meio MS à metade, para o cultivo de batata (*Solanum tuberosum* cv. "Spunta"), atribuiu o aumento do número de segmentos nodais, do comprimento das brotações e da biomassa à maior eficiência do uso do carbono, corroborando a hipótese de que para as concentrações de até 100% as microplantas estariam otimizando o uso do carbono e, portanto, seu índice SPAD estariam entre os valores mais altos. Illenseer e Paulilo (2002) também encontraram maior eficiência do uso do nitrogênio quando esses se encontraram em doses mais baixas em plantas jovens de *Euterpe edulis*.

A maior parte dos aspectos do desenvolvimento das plantas depende do metabolismo energético (WILSON et al., 2006) e a plasticidade adaptativa das espécies a diferentes condições ambientais depende do ajuste do aparato fotossintético, de modo a garantir maior eficiência na conversão de energia radiante em carboidratos e conseqüentemente maior crescimento (NAVES; ALVARENGA; OLIVEIRA, 1994; DIAS-FILHO, 1997; VILELA; RAVETTA, 2000; CAMPOS; UCHIDA, 2002). De fato, fatores ambientais afetam a morfologia foliar, que por sua vez afeta as propriedades ópticas da folha, e podem influenciar no teor de clorofila (MONJE; BUGBEE, 1992).

Uma vez determinado, o equipamento SPAD-502 pode ser utilizado como medidor no monitoramento de variáveis fisiológicas que refletem a saúde das plantas (HAWKINS; GARDINER; COMER, 2009).

Como a relação entre o índice SPAD e o teor de nitrogênio foliar também varia entre espécies (GULER et al., 2006; PINKARD; PATEL; MOHAMMED, 2006), os

valores obtidos com o SPAD não foram extrapolados para teor de nitrogênio total, tendo este sido avaliado por digestão sulfúrica e destilação pelo método micro-kjedahl, apresentados no item 4.

O estudo do acúmulo de nutrientes na matéria seca através da análise química fornece indicações úteis quanto à nutrição de plantas, evidenciando a importância relativa dos nutrientes e sua dinâmica dentro do vegetal, indicando ainda a quantidade total de nutrientes extraídos pelas plantas (COELHO; TELLA, 1967).

De acordo com Malavolta, Boaretto e Paulino (1991), o zinco está relacionado com o metabolismo de fenóis, à formação de amido, ao aumento no tamanho e multiplicação celular e à fertilidade do grão de pólen. No trabalho de Oliveira (2007), houve decréscimo dos teores de manganês e zinco dos 180 aos 270 dias de cultivo de *Aloe vera* com o aumento das doses de nitrogênio.

Robson (1993) relata que sais de nitrogênio aumentaram severamente as deficiências de zinco. Por outro lado, o zinco em excesso também inibe a absorção de cobre, da mesma forma, espera-se que quando o Zn estiver em menores quantidades, as plantas apresentem elevados teores de cobre, o que pôde ser verificado no experimento, onde, com o aumento no fornecimento de nitrogênio, o teor de zinco foi diminuído e o de cobre aumentado.

O cobre tem papel importante na redução e fixação de nitrogênio, metabolismo de proteínas e da parede celular. No caso de fornecimento de amônio em maiores quantidades no meio de cultura, pode ter ocorrido acidificação da rizosfera, provocada pela nitrificação ou absorção do íon amônio, levando à maior absorção e translocação do cobre. A correlação linear crescente do nitrato de amônio com o teor de cobre nas microplantas corrobora com os dados obtidos por Ferreira et al. (2001), para milho.

Segundo Malavolta (2006), plantas deficientes em N evidenciam teores mais elevados de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, ferro e manganês. No trabalho de Oliveira (2007), houve decréscimo do teor de manganês dos 180 aos 270 dias de cultivo de *Aloe vera* com o aumento das doses de nitrogênio. Efeito semelhante foi encontrado aos 240 dias de cultivo em *B. gasipaes*.

Já o fósforo influencia na formação de compostos orgânicos, produção de energia, divisão celular e vários outros processos metabólicos, como nas substâncias

de reserva. Os resultados evidenciados pela figura 32 corroboram as observações de Malavolta (2006), em que as plantas deficientes em N evidenciam teores mais elevados de fósforo, ao passo que teores tóxicos de N levam a teores mais baixos de fósforo e também de potássio. O mesmo foi relatado por Oliveira (2007), que a deficiência de nitrogênio promove aumento no teor de fósforo, ao passo que teores tóxicos de N levam à diminuição do P nas folhas.

A possibilidade de interação do nitrogênio e do potássio é reconhecida há muito tempo (HEATHCOTE, 1972; DIBB; THOMPSON JUNIOR, 1985). A resposta de uma cultura ao potássio depende, em grande parte, do nível em que se encontra a nutrição nitrogenada. Logo, quanto maior o suprimento de nitrogênio, maior o aumento da produtividade devido ao potássio (VIANA, 2007).

Quando há baixo fornecimento de potássio, a resposta à adubação nitrogenada é limitada (CARVALHO et al., 1991). Porém, como em geral o efeito positivo da aplicação do nitrogênio depende da aplicação de potássio (COLOZZA, 1998) e como juntamente com o nitrogênio o potássio também foi adicionado em doses crescentes, na forma de  $KNO_3$ , verificou-se um aumento linear da concentração de potássio na massa seca das microplantas seguindo o aumento das doses de nitrogênio. Os resultados corroboram com os observados em milho por Ferreira et al. (2001), em que houve correlação positiva da aplicação de nitrogênio com o teor de potássio.

Além disso, o potássio, juntamente com o nitrogênio, é um dos nutrientes mais consumidos pelas plantas, favorecendo a formação de raízes. Os tecidos meristemáticos são ricos em potássio, uma vez que este possui papel ativador de enzimas e também na manutenção da turgidez celular.

O aumento do suprimento nitrogenado pode levar ao aumento da absorção de potássio, que por sua vez pode competir com o cálcio, diminuindo sua absorção (FERNANDES; ROSSIELLO, 1995), pois tanto o cálcio quanto o potássio competem pelo mesmo sítio de absorção. Assim, com o aumento do nitrato de amônio, houve tendência de diminuição do cálcio na massa seca das microplantas. Oliveira (2007) observou que dos 180 aos 270 dias de cultivo de babosa, os teores de cálcio decresceram simultaneamente ao aumento das doses de nitrogênio. Alguns estudos

evidenciam que quando se aplica amônio, a necessidade de fósforo na planta aumenta, diminuindo assim a possibilidade de absorção de cálcio e potássio (OLIVEIRA, 2007).

Da mesma maneira que para o cálcio, a elevada adubação nitrogenada leva à maior absorção do potássio e este por sua vez compete com o magnésio (FERNANDES; ROSSIELLO, 1995), podendo-se inferir que o aumento das doses de nitrogênio estariam prejudicando a absorção de magnésio pelas microplantas. Além disso, o magnésio acompanha o fósforo, então seria realmente esperado que da mesma forma que os teores de fósforo diminuíram com o aumento do nitrogênio, o magnésio também diminua (MALAVOLTA, 1980).

Assim, pode-se inferir que tanto o aumento das doses de nitrato quanto o aumento do fornecimento do potássio, na forma de  $KNO_3$ , estariam prejudicando a absorção de magnésio pelas microplantas, justificando a tendência decrescente de absorção desse elemento.

Evidentemente, quanto maior o suprimento de  $NH_4NO_3$  no meio, maior a absorção de nitrogênio pelas microplantas, o que justifica a alta correlação positiva encontrada. No trabalho de Chang e Robinson (2003), foi verificado que a fertilização com nitrogênio aumentou as concentrações de N foliar em vários graus, dependendo da taxa de aplicação. Oliveira (2007) encontrou que doses crescentes de nitrogênio favoreceram o incremento contínuo nos teores de nitrogênio em babosa, explicado pelo aumento da disponibilidade desse nutriente no meio de cultura.

De acordo com Marschner (1995) o suprimento de nutrientes pode alterar intensamente o crescimento e a morfologia das raízes e o efeito é mais marcante para o fornecimento de nitrogênio e, além disso, seu efeito no aumento da área das raízes é com frequência mais acentuado com o suprimento de amônio do que apenas do nitrato. Manarin e Monteiro (2002) verificaram que a concentração de nitrogênio nas raízes do capim-Mombaça aumentou linearmente com o aumento desse nutriente na solução nutritiva.

Segundo Bonfim-da-Silva (2005) a concentração de nitrogênio nas raízes de capim-Braquiária que receberam a maior dose de nitrogênio foi 1,44 mais elevada que a das plantas não supridas com nitrogênio. Viana (2007) observou que a concentração de nitrogênio nas raízes de plantas de trigo que receberam a maior dose de nitrogênio

foi 1,84 vezes maior que a das plantas não adubadas com N. De acordo com Colozza (1998), na presença de maior quantidade de nitrogênio no solo, as raízes também passam a funcionar como órgão armazenador desse nutriente, justificando os altos teores encontrados nas microplantas.

Considera-se, portanto, que as plantas possuem mecanismos de resistência ao baixo suprimento de nitrogênio, como sistemas sensíveis e seletivos de absorção e transporte e também a possibilidade de crescimento utilizando diferentes fontes de nitrogênio. Tais estratégias, afirma Tischner (2000), envolvem o desenvolvimento de um sistema de passos regulatórios na via de assimilação de nitrogênio e sua integração com a assimilação do carbono, a fim de manter um balanço carbono/nitrogênio adequado ao crescimento da planta.



## 7 CONCLUSÕES

- Até 120 dias, as combinações de 825 a 1650 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> em conjunto com as concentrações de 2850 a 3800 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> favoreceram o crescimento, a ramificação e o número de raízes das microplantas desenvolvidas.

- Aos 240 dias, o KNO<sub>3</sub> parece ter maior importância na ramificação que o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, sendo que as concentrações de 1900 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> favoreceram o crescimento e a ramificação radicular e as concentrações acima de 2850 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub> aumentaram o número de raízes e a porcentagem de raízes finas, ao passo que abaixo dessa concentração há o favorecimento de raízes grossas.

- O maior desenvolvimento da parte aérea foi observado a partir dos 180 dias, sendo que tanto o crescimento da parte aérea quanto a formação de folhas foram favorecidos pelas concentrações de 2475 a 3300 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Já o número de brotações foi estimulado pela combinação de 825 a 1650 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> e 1900 a 2850 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.

- A formação de proteínas foi favorecida pela concentração de 2475 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, independente da concentração de KNO<sub>3</sub>, ou então de 2850 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>, independente da concentração de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

- O índice SPAD foi maior nas concentrações combinadas de no máximo 1650 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> com até 1900 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>.

- Uma vez que o meio de cultura pode induzir diferentes respostas dos explantes, concluiu-se que os resultados obtidos no trabalho podem contribuir com a melhoria dos protocolos de micropropagação de *B. gasipaes*, na medida em que permitem estabelecer o melhor tratamento para a maximização de uma resposta específica desejada, para cada momento do processo de cultivo dos embriões somáticos de pupunheiras, como enraizamento, crescimento da parte aérea, formação de proteínas e formação de brotações, facilitando dessa forma, a otimização da produção de microplantas com características desejáveis e conseqüentemente, sua aclimatização e desenvolvimento *ex vitro*.



## REFERÊNCIAS

- ABOBOREIRA NETO, M.; PIMENTEL, J.M.O. Produção e comercialização de palmito pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) *in natura* no sistema de integração da ináceres agrícola. In: SEMANA DO FAZENDEIRO, 27., 2005, Uruçuca. p. 208-220. Disponível em: < www.ceplac.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2009.
- AGRELL, D.; LARSSON, C.M.; LARSSON, M.; MACKOWN, C.T.; RUFTY, T.W. Jr. Initial Kinetics of <sup>15</sup>N-nitrate labeling of root and shoot N fractions of barley cultured at different relative addition rates of nitrate-N. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 35, p. 923-931, 1997.
- AGUIAR, J.P.L.; MARINHO, H.A.; REBELO, Y.S.; SHRIMPTON, R. Aspectos nutritivos de alguns frutos da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 10, n. 4, p. 755-758, 1980.
- AL-HARBI, A.R. Growth and nutrient composition of tomato and cucumber seedlings as affected by sodium chloride salinity and supplemental calcium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 18, n. 7, p. 1403-1416, 1995.
- ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p. 467-470, 2005.
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R.; TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 1757-1764, 2009.
- ALMEIDA, M. **Emprego da Cultura “in vitro” para multiplicação vegetativa em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) Palmae**. 1994. 79 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ALMEIDA, M.; ALMEIDA, C.V. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration from pejibaye adultplant leaf primordial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1449-1452, 2006.
- ALMEIDA, M.; KERBAUY, G.B. Micropropagation of *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae) through flower bud culture. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 8, p. 215-217, 1996.
- ALMEYDA, N.; MARTIN, F.W. The pejibaye. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. **Cultivation of neglected tropical fruits with promises**. Mayaguez, 1980. pt. 8, 10 p.
- ALVARADO, A.; SMITH, F.; SMYTH, T. J. **Baseline study of land use management and decision making processes with a focus on non-traditional crops, small farmer, agro-industry, and development policy in Costa Rica**. Decision Aids for Integrated Soil Nutrient Management Project, Soil Management Collaborative Research

Support Program. Raleigh: University of Costa Rica; North Carolina State University, 1998. 27 p.

ALVES JÚNIOR, J.; LOPES, A.S.; HERNANDEZ, F.B.T.; SANTOS, R.A.; BERGAMASCHINE, A.F. Produção de matéria verde em pupunheira irrigada. **Irriga**, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 349-356, 2005.

AMARAL, A.F.C. **Comportamento *in vitro* de explantes de matrizes de cenoura (*Daucus carota* L.) tratadas com variáveis níveis de potássio**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

AMARASINGH, B.H.R.R.; BRUXELLES, G.L. de; BRADDON, M.; ONYEOCHA, I.; FORDE, B.G.; UDVARDI, M.K. Regulation of GmNRT2 expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*). **Planta**, Berlin, v. 206, p. 44-52, 1998.

AMMIRATO, P.V. Embriogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V. (Ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1983. p. 82-123.

ANAND, M.H.; BYJU, G. Chlorophyll meter and leaf colour chart to estimate chlorophyll content, leaf colour, and yield of cassava. **Photosynthetica**, Praga, v. 46, n. 4, p. 511-516, 2008.

ANEFALOS, L.C.; TUCCI, M.L.S.; MODOLO, V.A. Uma visão sobre a pupunheira no contexto do mercado do palmito. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 2, n.7, jul. 2007. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=9012>>. Acesso em: 13 mar 2009.

ARIAS, O.; HUETE, F. Propagación vegetativa *in vitro* de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Revista Interamericana de Ciências Agrícolas**, Turrialba, v. 33, p. 103-108, 1983.

ARKCOLL, D. Algumas considerações adicionais sobre adubação na Amazônia. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO SOBRE FERTILIDADE DE SOLOS - AMAZÔNIA OCIDENTAL, 1982. Manaus: EMATER, 1982. 8 p. Mimeografado.

ASHBURNER, G.R.; FAURE, M.G.; TOMLINSON, D.R.; THOMPSON, W.K. **A guide to the zygotic embryo culture of coconut palms (*Cocos nucifera* L.)**. Canberra: ACIAR, 1995. 16 p. (ACIAR. Technical Report Serie, 36).

ASSY-BAH, B.; DURAND-GASSELIN, T.; PANNETIER, C. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, v. 71, p. 4-10, 1987.

AVILA, A.L. Nitrogen concentration and proportion of  $\text{NH}_4^+$ -N affect potato cultivar response in solid and liquid media. **HortScience**, Alexandria, v. 33, n. 2, p. 336-238, 1998.

BARNEIX, A.J.; CAUSIN, H.F. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 149, p. 358-362, 1996.

BARRACLOUGH, P.B.; KYTE, J. Effect of water stress on chlorophyll meter readings in winter wheat. In: HORST, W.J.; SCHENK, M.K.; BURKET, A. (Ed.). **Plant nutrition: food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research**. Hannover: Developments in Plant and Soil Sciences, 2001. p. 722-723.

BASSO, C.; SUZUKI, A. Solos e nutrição. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL. **Nashi, a pêra japonesa**. Florianópolis: EPAGRI; JICA, 2001. p. 139-160.

BATAGIN, K.D. **Análises anátomo-fisiológicas de folhas de pupunheiras cultivadas *in vitro*, *ex vitro* e *in vivo* visando otimizar o protocolo de aclimatização**. 2008. 107 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

BEACH, J.H. The reproductive biology of the peach or "pejibaye" palm (*Bactris gasipaes*) and a wild congener (*B. porschiana*) in the Atlantic lowlands of Costa Rica. **Principes**, San Jose, v. 28, n. 3, p.107-119, 1984.

BEEVERS, I.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plant. **Annual Review of Plant Physiology**, Saskatchewan, v. 20, p. 495-522, 1969.

BEHR, U.; WIEBE, H.J. Relation between photosynthesis and nitrate content of lettuce cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 49, p. 175-179, 1992.

BERECZKY, Z.; WANG, H.Y.; SCHUBERT, V.; GANAL, M.; BAUER, P. Differential regulation on *Nramp* and *IRT* metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, p. 24697-24704, 2003.

BERNIER, G.; HAVELANGE, A.; HOUSSA, C.; PETITJEAN, A.; LEJEUNE, P. Physiological signals that induce flowering. **Plant Cell**, Rockville, v. 5, p. 1147-1155, 1993.

BLOM-ZANDSTRA, M.; LAMPE, J.E.M. The role of nitrate in the osmoregulation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown at different light intensities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1043-1052, 1985.

BLOOM, A.J.; CHAPIN, F.S.; MOONEY, H.A. Resource limitation in plants: an economic analogy. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.16, p. 363-392, 1985.

BONFIM-DA-SILVA, E.M. **Nitrogênio e enxofre na recuperação de pastagem de capim-Braquiária em degradação em Neossolo Quartzarênico com expressiva matéria orgânica**. 2005. 123 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005.

BOVI, M.L.A. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura brasileira**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 183-185, 1997.

\_\_\_\_\_. **Palmito de pupunha: informações básicas para o cultivo**. Campinas: Instituto Agronômico, 1998. 50 p. (IAC. Boletim Informativo, 173).

\_\_\_\_\_. O agronegócio palmito de pupunha. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 2, 2003.

BOVI, M.L.A.; CANTARELLA, H. Pupunha para extração de palmito. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; CANGIANI, A.M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 285 p.

BOVI, M.L.A.; BASSO, L.C.; TUCCI, M.L.S. Avaliação da atividade “in vivo” da fosfatase ácida em *Bactris gasipaes* cultivada em dois níveis de nitrogênio e fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 427-434, 1998.

BOVI, M.L.A.; MARTINS, C.C.; SPIERING, S.H. Desidratação de sementes de quatro lotes de pupunheira: efeitos sobre a germinação e o vigor. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n.1, p. 109–112, 2004.

BOVI, M.L.A.; LAMBAIS, M.R.; TUCCI, M.L.S.; SPIERING, S.H. Biomass accumulation and vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization in pejobaye (*Bactris gasipaes*) as a function of NPK fertilization. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 513, p. 153-168, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAKEMEIER, C. Adubação foliar: a complementação nutricional da macieira. **Jornal da Fruta**, Lajes, p. 7, 1999.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen total. In: PAGE, A.L. (Ed.). **Methods of soil analysis**. 2<sup>nd</sup> ed. Madison: SSSA, 1982. pt. 2, p. 595-624.

BRITTON, G. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. (Ed.). **Methods in plant pigments**. London: Academic Press, 1991. v. 7, p. 473-515.

BRIVE, A.; SENGUPTA, A.K.; BEUCHIE, D.; LARSSON, J.; KENNISON, J.A.; RASMUSON-LESTANTES, A.; MULLER, J. *Su (Z)*, a novel *Drosophila* Polycomb-group gene that is conserved in vertebrates and plants. **Development**, Umeå, v. 128, p. 3371-3379, 2001.

BROWN, P.H.; BELLALOU, N.; WIMMER, M.A.; BASSIL, E.S.; RUIZ, J.; HU, H.; PFEFFER, H.; DANIEL, F. R. MHELD, V. Boron in plant biology. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 4, n.2, p. 205-223, 2002.

CAMACHO, V.E. El pejibaye (*Guilielma gasipaes* H.B.K.) L.H. Bailey). In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PLANTAS DE INTERÉS ECONÓMICO DE LA FLORA AMAZONICA, 1976, Belém. Belém: IICA -Trópicos, 1976. p. 101-106. (Informes de Conferencias, Cursos y Reuniones, 93).

CAMARGOS, L.S. **Análise das interações no metabolismo de nitrogênio em *Canavalia ensiformes* (L.) em resposta a variações na concentração de nitrato fornecida.** 2002. 113 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CAMPBELL, R.J.; MOBLEY, K.N.; MARINI, R.P.; PFEIFFER, D.G. Growing conditions alter the relationship between SPAD-502 values and apple leaf chlorophyll. **Hortscience**, Alexandria, v. 25, p. 330-331, 1990.

CAMPOS, M.A.A.; UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 281-288, 2002.

CARRERA, L. Isolation and Characterization of Pejibaye Starch. **Journal of Applied Botany**, Göttingen, v. 73, n. 3/4, p. 122-127, 1999.

CARVALHO, A.R.V. **Associação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) e de dendezeiro (*Elaeis guineensis* JACK.).** 1997. 262 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

CARVALHO, D.C.; BIASI, L.A.; TELLES, C.A. Organogênese do Caquizeiro 'Fuyu' a partir de ápices meristemáticos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 3, p. 303-307, 2004.

CARVALHO, M.M.; MARTINS, C.E.; VERNEQUE, R.S.; SIQUEIRA, C. Respostas de uma espécie de *Brachiaria* à fertilização com nitrogênio e potássio em um solo ácido. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 15, p. 195-200, 1991.

CATE, T.M.; PERKINS, T.D. Chlorophyll content monitoring in sugar maple (*Acer caccharum*). **Tree Physiology**, Victoria, v. 23, p. 1077-1079, 2003.

CHAIMSOHN, P.F. Cultivo de pupunha para palmito. Importância, Mercado e aspectos biológicos e agrônômicos. In: CURSO SOBRE CULTIVO, PROCESSAMENTO E COMERCIALIZAÇÃO DE PALMITO DE PUPUNHA, 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 7-69.

CHANG, S.X.; ROBINSON, D.J. Nondestructive and rapid estimation of hardwood foliar nitrogen status during the SPAD-502 chlorophyll meter. **Forest Ecology and Management**, Leuven, v. 181, p. 331-338, 2003.

CHRISPEELS, M.J.; CRAWFORD, N.M.; SCHROEDER, J.I. Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 661-675, 1999.

CLARKSON, D.T.; LUTTGE, U. Mineral nutrition: Inducible and repressible nutrient transport systems. **Progress in Botany**, Berlin, v. 52, p. 61–83, 1991.

CLEMENT, C. R. Preliminary observations on the developmental curve of peijibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) inflorescences. **Revista Biologia Tropical**, San José, v. 35, n.1, p.151-153, 1987.

CLEMENT, C.R.; HABTE, M. Effect of soil solution phosphorus on seedling growth of the peijibaye palm in an oxisol. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, p. 639–655, 1994.

\_\_\_\_\_. Genotypic variation in vesicular-arbuscular mycorrhizal dependence of the peijibaye palm. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 18, n. 9, p. 1907-1916, 1995.

COELHO, F.A.S.; TELLA, R. Absorção de nutrientes pela planta de amendoim em cultura de primavera. **Bragantia**, Campinas, v. 26, n. único, p. 409-421, 1967.

COLOZZA, M.T. **Rendimento e diagnose foliar dos capins Aruana e Mombaça cultivados em Latossolo Vermelho – Amarelo com doses de nitrogênio**. 1998. 127 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1998.

COSTA NETO, P.Q. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares**. 2002. 86 p. Dissertação (Mestrado em PPGGEv/UFSCar Convênio UFAM) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2002.

COUTO, L.; DANIEL, O.; ALMEIDA, A.E.; PINHEIRO, A.L.; VERVLOT, F.B.; SOUZA, A.C.G. **A cultura de pupunha para produção de palmito: sistema de produção e processamento industrial**. Viçosa: UFV, Sociedade de Investigações Florestais, 1999. 34 p. (Documento, 20).

CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 859-868, 1995.

CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends Plant Science**, London, v. 3, p. 389–395, 1998.



- DANNEL, F.; PFEFFER, H.; RÖMHELD, V. Update on boron in higher plants-uptake, primary translocation and compartmentation. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 4, p. 193-204, 2002.
- DATE, R.A. Nitrogen, a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the Pacific area. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 5-18, 1973.
- De GUZMAN, E.V.; Del ROSÁRIO, A.G. The growth and development of Makapuno coconut *in vitro*. **Philippine Agriculturist**, Laguna, v. 48, p. 82-94, 1964.
- DECHEN, A.R.; HAAG, H.P.; CARMELLO, Q.A.C. Funções dos micronutrientes nas plantas. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. (Ed.). **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: Potafos; CNPq, 1991. cap. 3, p.65-78.
- DEENIK, J.; ARES, A.; YOST, R.S. Fertilization response and nutrient diagnosis in peach palm (*Bactris gasipaes*): a review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Amsterdam, v. 56, p. 195-207, 2000.
- DELL, B. Male sterility and anther wall structure in copper-deficient plants. **Annals of Botany**, London, v. 48, p. 599-608, 1981.
- DELÚ-FILHO, D.N.; OLIVEIRA, L.E.M.; ALVES, J.D. Atividade da redutase de nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.): otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 21, p. 329-336, 1998.
- DIAS-FILHO, M.B. Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. to contrasting light environments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 8, p. 789-796, 1997.
- DIBB, D.W.; THOMPSON JUNIOR, W.R. Interaction of potassium with other nutrients. In: MUNSON, R.D. (Ed.). **Potassium in agriculture**. Madison: ASA; CSSA; SSSA; 1985. p. 515-533.
- DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G.; CÂMARA, T.R. Variedades de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* com diferentes fontes de nitrogênio. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 1289-1292, 1999.
- DWYER, L.M.; TOLLENAAR, M.; HOUWING, L.; A nondestructive method to monitor leaf greenness in corn. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 71, p. 505-509, 1991.
- EMPRAÇA ACRE. **Cultivo de pupunha para palmito no Acre**. Rio Branco, 2000. 15 p. (Circular técnica, 31).

EMBRAPA FLORESTAS. **As doenças da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): antracnose e podridão da medula.** Colombo, 2001. 3 p. (Comunicado Técnico, 63).

EMBRAPA INFORMÁTICA AGROPECUÁRIA. **Programa SOC – software científico:** versão 2.1. Campinas, 1990.

EMBRAPA RONDÔNIA. **Pupunha será testada como fonte de energia para biodiesel.** Rondônia, 2007. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2007/dezembro/3a-semana/pupunha-sera-testada-como-fonte-de-energia-para-biodiesel/>>. Acesso em: 14 mar. 2009.

EMES, M.J.; FOWLER, M.W. The intracellular location of the enzymes of nitrate assimilation in the apices of seedling pea roots. **Planta**, Berlin, v. 144, p. 249-253, 1979.

EPSTEIN, E. Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plants. **Nature**, London, v. 212, p. 1324–1327, 1966.

\_\_\_\_\_. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas.** Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; EDUSP, 1975. 341 p.

FERNANDES, A.R.; CARVALHO, J.G. de; CURI, N.; PINTO, J.E.B.P.; GUIMARÃES, P.T.G. Nutrição mineral de mudas de pupunheira sob diferentes níveis de salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1613-1619, 2002.

FERNANDES, M.S.; ROSSIELLO, O.P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.14, p. 111-148, 1995.

FERREIRA, A.C.B.; ARAÚJO, G.A.A.; PEREIRA, P.R.G.; CARDOSO, A.A. Características agrônomicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n.1, p. 131-138, 2001.

FERREIRA, S.A.N. **Maturação fisiológica de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth).** 1996. 73 p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; Universidade do Amazonas, Manaus, 1996.

\_\_\_\_\_. Pupunha, *Bactris gasipaes* Kunth. In: FERRAZ, I.D.K.; CAMARGO, J.L.C. (Ed.) **Manual de sementes da Amazônia.** Manaus: INPA, 2005. v. 5, p. 1-12.

FERREIRA, S.A.N.; SANTOS, L.A. Viabilidade de sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 22, n. 3, p. 303-307, 1992.

FERREIRA, S.A.N.; CLEMENT, C.R.; RANZANI, G. Contribuição para o conhecimento do sistema radicular da pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K. = *Guilielma gasipaes* (H.B.K.) Bailey) I - Solo latossolo amarelo, textura média. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 10, n. 2, p. 245-249, 1980.

FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 275-297, 2002.

FILLEUR, S.; DANIELLE-VEDELE, F. Expression analysis of a high- affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. **Planta**, Berlin, v. 207, p. 461-489, 1998.

FINNEMANN, J.; SCHJOERRING, J.K. Translocation of  $\text{NH}_4^+$  in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 105, p. 469- 477, 1999.

FORDE, B.G.; CLARKSON, D.T. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. **Advances in Botany Research**, London, v. 30, p.1-90, 1999.

FRÁGUAS, C.B.; CHAGAS, E.A.; FERREIRA, M.M; CARVALHO, J.G.; PASQUAL, M. Micropropagação de gloxínia em diferentes concentrações de nitrato de amônio e uréia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 4, p. 811-815, 2003.

GABELMAN, W.H.; GERLOFT, G.C.; SCHETTINI, T.; COLTMAN, R. Genetic variability in root systems associated with nutrient acquisition and use. **HortScience**, Alexandria, v. 21, n. 4, p. 971-973. 1986.

GAMBORG, O.L; SHYLUK, J.P. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. **Plant Physiology**, Maryland, v. 45, p. 598-600, 1970.

GEIGER, M.; WALCH-PIU, L.; HARNECKER, J.; SCHULZE, E.D.; LUDEWIG, F; SONNEWALD, U.; SCHEIBLE, W.R.; STITT, M. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in higher plants. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 21, p. 253-268, 1998.

GILES, K.L.; VASIL, I.K. Nitrogen fixation and plant tissue culture. In: VASIL, I.K. (Ed.) **Perspectives in plant cell and tissue culture**. New York: Academic Press, 1980. p. 81-97.

GOMES, J.B.M.; MENEZES, J.M.T.; VIANA FILHO, P. Efeito de níveis de adubação e espaçamento na produção de palmito de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em solo de baixa fertilidade na região de Ouro Preto d'Oeste- RO. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISADORES DE PALMITO, 1. 1987, Curitiba. **Anais...** Curitiba: EMBRAPA, CNPF, 1988. p. 261–266. (EMBRAPA. CNPF. Documentos, 19).

GRAHAM, R.D. Male sterility in wheat plants deficient in copper. **Nature**, London, v. 254, p. 524-525, 1975.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Microprogagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCPT; EMBRAPA, 1990. p. 99-170.

GRIME, J.P.; CAMPBELL, B.D.; MACKEY, J.M.L.; CRICK, J.C. Root plasticity, nitrogen capture and competitive ability. In: ATKINSON, D. **Plant root growth: an ecological perspective**. Oxford: Blackwell Scientific, 1991. p. 381-397.

GROETHE, M.T. **Efeito de várias fontes de nitrogênio na multiplicação *in vitro* de clones de *Eucaliptus grandis* HILL ex MAIDEN**. 1992. 86 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1992.

GROSSNIKLAUS, U.; VIELLE-CALZADA, J.P.; HOEPPNER, M.A.; GAGLIANIO, W.B. Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a Polycomb-group gene in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 280, p. 446-450, 1998.

GROUT, B.W.W. Photosynthesis of regenerated plantlets “in vitro” and the stresses of transplanting. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 230, p. 129-134, 1988.

GULER, S.; MACIT, I.; KOÇ, A.; IBRIKCI, H. Monitoring nitrogen status of organically-grown strawberry cultivars by using chlorophyll meter reading. **Asian Journal of Plant Sciences**, Faisalabad, v. 5, n. 5, p. 753-757, 2006.

GUNES, A.; POST, W.N.K.; KIRBY, E.A.; AKTAS, M. Influence of partial replacement of nitrate by amino acid nitrogen or urea in the nutrient medium on nitrate accumulation in NFT grown winter lettuce. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, n. 11, p. 1929-1938, 1994.

GUPTA, A.S.; WEBB, R.P.; HOLADAY, A.S.; ALLEN, R.D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress: induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants. **Plant Physiology**, Maryland, v. 103, p. 1067-1073, 1993.

GUPTA, V.C.; LIPSET, J. Molybdenum in soil, plants and animals. **Advances in Agronomy**, Newark, v. 34, p. 73-109, 1981.

GUZMÁN, P. **Nutrición y fertilización del pejibaye (Repuesta del pejibaye para palmito a la aplicación de N-P-K)**. San José: ASBANA, 1985. p. 41-46. (Informe de Labores de Diversificación Agrícola, 7).

HALBLEIB, C.M.; LUDDEN, P.W. Regulation of biological nitrogen fixation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 1081-1084, 2000.

HALPERIN, W.; WETHERELL, D.F. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. **Nature**, London, v.205, p.519-520, 1965.

HARDY, R.W.F.; HAVELKA, V.P. Nitrogen fixation research: a key to world food. **Science**, Washington, v. 188, p. 633-643, 1975.

HARTLEY, C.W.S. **The oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Longman, 1977. 806 p.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T., Jr. **Propagación de plantas: principios y prácticas**. 5. ed. México: Continental, 1997. 760 p.

HAWKINS, T.S.; GARDINER, E.S.; COMER, G.S. Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. **Journal of Nature Conservation**, Amsterdam, v. 17, p. 123-127, 2009.

HEATHCOTE, R.C. **Fertilization with potassium in the Savanna zone of Nigeria**. Bern: Potash and Phosphate Institute, 1972. p. 45-49.

HENDERSON, A. *Bactris* (Palmae). **Flora Neotropica Monograph**, New York, n. 79, p. 1-181, 2000.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field guide to the palms of the Americas**. Princeton: Princeton University Press, 1995. 352 p.

HERRERA, B. W. **Fertilización del pejibaye para palmito**. San Jose: Universidad de Costa Rica, 1989. n. 2, p. 4-10 (Serie Técnica Pejibaye. Boletín informativo, 1).

HOPKINS, W.G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Wiley, 1995. 464 p.

HU, Y.; SCHMIDHALTER, U. Interactive effects of salinity and macronutrient level on wheat - part II: composition. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 20, n. 9, p. 1169-1182, 1997.

HUANG, L.; PANT, J.; DELL, B.; BELL, R.W. Effect of boron deficiency on anther development and floral fertility in wheat (*Triticum aestivum* L. 'Wilgoyne'). **Annals of Botany**, London, v. 85, p. 493-500, 2000.

IKEDA, H.; OSAWA, T. Lettuce growth as influenced by N source and temperature of the nutrient solution. In: INTERNATIONAL CONGRESS IN SOILESS CULTURE, 6., 1984, Lunteren. **Proceedings...** Lunteren: International Society of Soiless Culture, 1984. p. 273-284.

ILLENSEER, R.; PAULILO, M.T.S. Crescimento e eficiência na utilização de nutrientes em plantas jovens de *Euterpe edulis* Mart. sob dois níveis de irradiância, nitrogênio e fósforo. **Acta Botânica Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 385-394, 2002.

JANOS, D.P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect the growth of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Principes**, Miami, v. 21, n. 1, p. 12-18, 1977.

JIAO, G.; BARABAS, N.K.; LIPS, S.H. Nitrate uptake, storage and reduction along the root axes of barley seedlings. In: MARTINS-LONCAO, M.A. (Ed.). **Nitrogen in a sustainable ecosystem: from the cell to the plant**. Amsterdam: Kluwer, 2000. p. 1-8.

JONGSCHAAP, R. **Palmito (*Bactris gasipaes* H.B.K) growth and management in the humid lowlands of the Atlantic zone of Costa Rica**. Wageningen: CATIE, 1993. 52 p. (Boletim Técnico, 60).

KAJIKI, F.O. **Estudo das condições para indução de calos e produção de compostos secundários em *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen**. 1996. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

KAPOTIS, G.; ZERVOUDAKIS, G.; VELTSISTAS, T.; SALAHAS, G. Comparison of chlorophyll meter readings with leaf chlorophyll Concentration in *Amaranthus vlitus*: correlation with physiological processes. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscou, v. 50, n. 3, p. 395-397, 2003.

KATO, A.K.; MULLER, C.H.; MATOS, A.O.; KAGAWA, O.N.C.; MENEZES, A.J.M. Influência da adubação química NPK no crescimento e na produção de matéria seca de mudas de pupunheiras (*Bactris gasipaes*, H.B.K.) cultivadas no estado do Pará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. **Informação, globalização, uso do solo**: resumos... Rio de Janeiro: SBCS, 1997. p. 26-27.

KERBAUY, G. B. Competência e determinação celular em culturas de células e tecidos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI, 1999. v. 2, p. 519-531.

KIRBY, E.G.; LEUSTEK, T.; LEE, M.S. Nitrogen nutrition. In: BONGA, J.M.; DURZAN, D.J. (Ed.). **Cell and tissue culture in forestry**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. v. 1, p. 237.

KRAPP, A.; FRAISIER, V.; SCHEIBLE, W.R.; QUESADA, A.; GOJON, A.; STITT, M.; CABOCHE, M.; DANIEL-VEDELE, F. Expression studies of Nrt2:1Np, a putative high affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 723-732, 1998.

LAUTER, F.R.; NINNEMAN, O.; BUCHER, M.; RIESMEIER, J.; FROMMER, W.B. Preferential expression of an ammonium transporter and two nitrate transporters in root hairs of tomato. 1998. Washington. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, v. 88, p. 8139-8144, 1998.

LAZOF, D.B.; RINCON, M.; RUFTY, T.W.; MACKOWN, C.T.; CARTER, T.E. Aluminium accumulation and associated effects on  $^{15}\text{NO}_3$  influx in roots of two soybean genotypes differing in Al tolerance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 164, p. 291-297, 1994.

LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. (Ed). **Plant biochemistry and molecular biology**. New York: Wiley, 1993. p. 155-180.

LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F.D.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Molecular and functional characterization of two NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, p. 509-519, 1999.

LIMA-FILHO, O.F. **Distúrbios nutricionais, marcha de absorção de nutrientes, análise do crescimento e teor de esteviosídeo em estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni)**. 1995. 212 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 1995.

LOPES REIS, E. Respostas da pupunheira ao NPK na produção de palmito no sul da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, 1997, Rio de Janeiro. **Informação, globalização, uso do solo: resumos...** Rio de Janeiro: SBCS, 1997. p. 180.

MADEIRA, A.C.; FERREIRA, A.; VARENNE, A.; VIEIRA, M.I. SPAD meter versus tristimulus colorimeter to estimate chlorophyll content and leaf color in sweet pepper. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 34, p. 2461-2470, 2003.

MAGAT, S.S.; PADRONES, G.D.; ALFORJA, L.M. Residual effects of three chloride fertilizers on yield and leaf nutrient levels of coconuts grown on an inland soil of Davao (Mindanao, Philippines). **Oleagineux**, Paris, v. 48, p. 237-242, 1993.

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

\_\_\_\_\_. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 231 p.

MALAVOLTA, E. BOARETTO, A.E.; PAULINO, V.T. Micronutrientes: uma visão geral. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: POTAFOS, 1991. p. 1-34.

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

MANARIN, C.A.; MONTEIRO, F.A. Nitrogênio na produção e diagnose foliar do capim-Mombaça. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 59, p. 115-123, 2002.

MANTOVANI, J.R.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. Produção de alface e acúmulo de nitrato em função da adubação nitrogenada. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 758-762, 2005.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, B.; ASSIS, S.M.P.; GOMES, A.M.A.; NASCIMENTO, A.R.P.; DONATO, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MARTIN-PRÉVEL, P.; GAGNARD, J.; GAUTIER, P. **Plant analysis**: as a guide to the nutrient requirements of temperate and tropical crops. New York: Lavoisier, 1987. 722 p.

MATTOS-SILVA, L.A.; MORA URPI, J. **Descripción morfológica general del pejibaye cultivado [*Bactris (Guilielma) gasipaes* Kunth], Arecaceae**. San José: Universidad de Costa Rica, 1996. v. 1, 260 p. (Serie Técnica Pejibaye, Boletín Informativo, 1).

MATTSON, M.; SCHJOERRING, J.K. Ammonia emission from young barley plants: influence of N-source, light/dark cycles and inhibition of glutamine synthetase. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 477-484, 1996.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V. Nitrate content of vegetables crops. **HortScience**, Alexandria, v. 7, n. 3, p. 224-226, 1972.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. **Advances in Agronomy**, New York, v. 28, p. 71-118, 1976.

MCELHANNON, W.S.; MILLS, H.A. Influence of percent  $\text{NO}_3/\text{NH}_4^+$  on growth, N absorption, and assimilation by lima beans in solution culture. **Agronomy Journal**, Madison, v. 70, n. 4, p. 1027-1032, 1978.

MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogen. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 467-472, 1994.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 4<sup>th</sup> ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 687 p.

MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and Cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 10, n. 3, p. 225-228, 1998.

MIFLIN, B.J.; LEA, P.J. Ammonia assimilation. In: MIFLIN, B.J. (Ed.). **The biochemistry of plants**: amino acids and derivatives. New York: Academic Press, 1980. p. 169-202.

MIGGE, A.; CARRAYOL, E.; KUNZ, C.; HIREL, B.; FOCK, H.; BECKER, T. The expression of the tobacco genes encoding plastidic glutamine synthetase of ferredoxin-dependent glutamate synthase does not depend on the rate of nitrate reduction, and is unaffected by suppression of photorespiration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 1175-1184, 1997.

MILLS, H.A.; MCELHANNON, W.S. Nitrogen uptake by sweet corn. **HortScience**, Alexandria, v. 17, n. 5, p. 743-744, 1982.



MINOLTA, C. **Manual for chlorophyll meter SPAD-502**. Osaka: Minolta Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22 p.

MOLINA, E. **Fertilización de pejibaye para palmito**. San Jose: Universidad de Costa Rica; Centro de Investigaciones Agronómicas, 1997. 26 p.

MONDIN, M. **Efeito de sistemas de cultivo na produtividade e acúmulo de nitrato em cultivares de alface**. 1996. 88 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1996.

MONJE, O.A.; BUGBEE, B. Inherent limitations of nondestructive chlorophyll meters: a comparison of two types of meters. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, p. 69-71, 1992.

MORA URPI, J. El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.): origem, biologia floral y manejo agronômico. In: CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA. **Palmeras poco utilizadas de America Tropical**. San José: FAO; CATIE, 1984. p. 118-160.

MORA-URPI, J. CLEMENT, C.R. Aspectos taxonômicos relativos al pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) {Taxonomic aspects of pejibaye}. **Revista de Biología Tropical**, San José, v. 29, n. 1, p. 139-142, 1981.

MORA URPI, J.; SOLÍS, E.M. Polinización em *Bactris gasipaes* H.B.K. (Palmae). **Revista Biología Tropical**, San José, v. 28, n. 1, p. 153-174, 1980.

MORA URPI, J.; WEBER, J.C.; CLEMENT, C.R. **Peach palm *Bactris gasipaes* Kunth {Pupunha}**: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: IPK; IPGRI, 1997. 83 p.

MORA URPI, J.; VARGAS, E.; LOPEZ, C. A.; VILLAPLANA, M.; ALLON, G.; BLANCO, C. **El pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. San José: Banco Nacional de Costa Rica, 1982. 15 p.

MORO, J.R. **Produção de palmito de pupunha**: manual. Viçosa: CPT, 1996. 28 p. (CPT. Agricultura, manual, 87).

MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura**: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1993. p. 19-40.

MURASHIGE, T. Plant Cell and organ culture as horticultural practices. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 78, p. 17-30, 1977.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.15, p. 473-497, 1962.

NAVES, V.L.; ALVARENGA, A.A.; OLIVEIRA, L.E.M.; Comportamento estomático de mudas de três espécies florestais submetidas a diferentes níveis de radiação fotossinteticamente ativa. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 18, n. 4, p. 408-414, 1994.

OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, p. 345-365, 1985.

OLIVEIRA, E.T. **Micropropagação e acompanhamento bioquímico, fisiológico e nutricional de babosa (*Aloe vera* (L.) Burm.f.) cultivada *ex vitro* em doses de nitrogênio**. 2007. 93 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, M.A.J.; BOVI, M.L.A.; MACHADO, E.C.; RODRIGUES, J.D. Atividade da redutase de nitrato em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 515-522, 2005.

O'NEILL, M.A.; EBERHARD, S.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Requirement of borate cross-linked of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. **Science**, Washington, v. 294, p. 846- 849, 2001.

O'NEILL, M.A.; ISHII, T.; ALBUSHEIM, P.; DARVILL, A.G. Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 55, p. 109-139, 2004.

ONO, F.; FROMMER, W.B.; WIRE, N., von. Coordinated diurnal regulation of low-and high-affinity nitrate transporters in tomato. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, p. 17-23, 2000.

PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEM, P.W.; TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, p. 135-142, 1996.

PANDEY, N.; SHARMA, C.P. Copper effect on photosynthesis and transpiration in safflower. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 34, p. 821-822, 1996.

PEREIRA, J.E.S.; MATTOS, M.L.T.; FORTES, G.L.R. Identificação e controle com antibióticos de bactérias endofíticas contaminantes em explantes de batata micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 827-834, 2003.

PEREZ, J.M.; DAVEY, C.B.; MCCOLLUM, R.E.; PASHANASHI, B.; BENITES, J.R. **Peach palm as a soil management option on Ultisols**. Raleigh: North Carolina State University, 1987. p. 26-27. (Tropsoils Technical Report).

PERL, A.; PERL-TREVES, R.; GALILI, S.; AVIV, D.; SHALGI, E.; MALKIN, S.; GALUN, E. Enhanced oxidative stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu, Zn

superoxide dismutase. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 568-576, 1993.

PINKARD, E.A.; PATEL, V.; MOHAMMED, C. Chlorophyll and nitrogen determination for plantation-grown *Eucalyptus nitens* and *E. globulus* using a non-destructive meter. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 223, p. 211-217, 2006.

PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; SPIERING, S.H.; BINOTTI, C.S. Patogenicidade de cinco espécies de *Fusarium* a plantas de pupunheira (*Bactris gasipaes*). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, p. 272-275, 2001.

PODDAR, K.; VISHNOI, R.K.; KOTHARI, S.L. Plant regeneration from embryogenic callus of finger millet *Eleusine coracana* (L.) Gaertn, on higher concentrations of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  as a replacement of NAA in the medium. **Plant Science**, Dublin, v. 129, p. 101-106, 1997.

POZZA, E.A.; SOUZA, P.E.; CASTRO, H.A.; POZZA, A.A.A. Frequência da ocorrência de doenças de plantas na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 4, p. 1002-1006, 1999.

PREECE, J. E. Can nutrient salts partially substitute for plant growth regulators? **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, Dhaka, v. 1, p. 26-37, 1995.

QUIRELLE, I.; DUFOSSE, C.; ROUX, Y.; FOYER, C.H.F.; CABOCHE, M.; MOROT-GAUDRY, J.F. The effects of deregulation of NR genes expression on growth and nitrogen metabolism of *Nicotiniana plumbaginifolia* plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 1205-1211, 1994.

RAZDAN, M.K. **An introduction to plant tissue culture**. Hampshire: Andover, 1993. 398 p.

REINERT, J.; TOZAWA, M.; SEMEROFF, S. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis *in vitro*. **Nature**, London, v. 216, p. 1215-1216, 1967.

RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, S. Substituição de nitrato de potássio (PA) por salitre potássico no preparo de meio de cultura de tecidos vegetais esterilizado com hipoclorito de sódio. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1209-1213, 2008.

RILLO, E.P.; PALOMA, M.B.F. *In vitro* culture of Makapuno coconut embryos. **Coconuts Today**, Albay, v. 9, p. 90-108, 1992.

ROBSON, A.D. (Ed.). **Zinc in soils and plants**. Perth: Kluwer Academic, 1993. 133 p.

ROBSON, A.D.; PITMANN, M.G.; Interactions between nutrients in higher plants. In: LAUHLIM, A.; BIELESKIM, R.L. (Ed). **Inorganic plant nutrition**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. chap. I.5, p. 147-180.

ROMAO, M.J.; ARCHER, M.; MAURA, I.; MOURA, J.J.G.; LE GALL, J.; ENGH, R.; SCHVEIDER, M.; HOF, P.; HUBER, R. Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *D. gigas*. **Science**, Washington, v. 270, p. 1170-1176, 1995.

RUIZ, J.M.; ROMERO, L. Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 82, n. 3/4, p. 309-316, 1999.

RUIZ, P.O. El rol de la micorrizas en pijuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K). In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE BIOLOGIA, AGRONOMIA Y INDUSTRIALIZACIÓN DEL PIJUAYO, 1993. Iquitos. **Anais...** Iquitos: UFCR, 1993. v. 4, p. 127-134.

RUSCHEL, J. **Acúmulo de nitrato, absorção de nutrientes e produção de duas cultivares de alface cultivadas em hidroponia, em função de doses conjuntas de nitrogênio e potássio**. 1998. 76 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SANTOS, A.F. dos; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B.; NUNES, W.M.C. **As doenças da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): antracnose e podridão da medula**. Colombo: EMBRAPA, 2001. 3 p. (Circular Técnica, 63).

SANTOS, A.F.dos; LUZ, E.D.M.N.; FINATO, P.D.; TESSMANN, D.J.; VIDA, J.B. Primeiro Relato da Podridão da Estipe da Pupunheira, Causada por *Phytophthora palmivora*, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 680-682, 2004.

SARAVITZ, C.H.; DEVIENNE-BARRET, F.; RAPER, C.D.; CHAILLOU, S.; LAMAZE, T. Nitrate uptake rate by soybean and wheat plants determined by external nitrate concentration and shoot mediated demand. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 159, p. 305-312, 1998.

SARGENT, P.A; KING, J. Investigations of growth promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 52, p. 1747-1755, 1974.

SCHAPER, H.; CHACKO, E.K. Relation between extractable chlorophyll and portable chlorophyll meter readings in leaves of eight tropical and subtropical fruit tree species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 138, p. 674-677, 1991.

SCHARPF, H.C. Nutrient influences on the nitrate content of vegetables. In: THE INTERNATIONAL FERTILIZER SOCIETY: NITROGEN, inc. NITRATES & HEALTH, 1991, London: **Proceedings...** London: The Fertilizer Society, 1991. v. 1, n. 313, 24 p.

SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E.D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 11, 671-691, 1997.

SCHULZE, E.D.; CHAPIN, F.S. Plant specialization to environments of different resource availability. In: SCHULZE, E.D.; ZWOLFER, H. (Ed.) **Potentials and limitations of ecosystems analysis**. Berlin: Springer Verlag, 1987. p. 120-148.

SHARMA, C.P. (Ed.). **Deficiency and critical concentration of micronutrients in crop plants**. Lucknow: Lucknow University Centre, 1996. p. 1-12. (Micronutrients Project (ICAR), 1)

\_\_\_\_\_. **Plant micronutrients**. Enfield: Science Publ., 2006. 265 p.

SHARMA, C.P.; SHARMA, P.N.; CHATTERJEE, C.; AGARWALA, S.C. Manganese deficiency in maize affects pollen viability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 138, n. 1, p. 139-142, 1991.

SHARMA, P.N.; RAMCHANDRA, T. Water relations and photosynthesis in mustard plants subjected to boron deficiency. **Indian Journal of Plant Physiology**, New Delhi, v. 33, p. 150-154, 1990.

SHARMA, P.N.; KUMAR, N.; BISHT, S.S. Guard cell carbonic anhydrase. **The Journal of Experimental Biology**, Oxford, v. 34, p. 560-564, 2006.

SILVA, A.L.L.; FRANCO, E.T.H.; BISOGNIN, D.A.; DORNELLES, E.B.; WALTER, J.M. Efeitos de nitrato de amônia na multiplicação e regeneração de gemas laterais de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 369-371, 2005.

SILVA, E.M.R.; SUDO, A.; ALMEIDA, D.L. de; MATOS, R.M.B.; PEREIRA, M.G.; BOVI, M.L.A.; MACHADO, C.T.T. **Ocorrência e efetividade de fungos micorrízicos arbusculares em espécies cultivadas**. Rio de Janeiro; Seropédica, EMBRAPA Agrobiologia, 1998. 16 p.

SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. **Plant Physiology**, Rockville, v. 34, p. 609-620, 1996.

SIVASKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 583-589, 1997.

SLOOTEN, L.; CAPIAU, K.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; SYBESMA, C.; INZE, D. Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco over expressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 107, p. 735-750, 1995.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. San Diego: Academic Press, 1997. 605 p.

SOBRAL, L.F.; LEAL, M.L.S. Resposta do coqueiro à adubação com uréia, superfosfato simples e cloreto de potássio em dois solos do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 23, p. 85-89, 1999.

STEIN, M.; STEPHENS, C. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* H.B.K. **Revista Interamericana de Ciências Agrícolas**, Turrialba, v. 41, p. 196-201, 1991.

STEINMACHER, D.A.; CLEMENT, C.R.; GUERRA, M. P. Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 89, p. 15-22, 2007.

STITT, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, n. 3, p. 178-186, 1999.

STITT, M.; FEIL, R. Lateral root frequency decreases when nitrate accumulates in tobacco transformants with low nitrate reductase activity: consequences for the regulation of biomass partitioning between shoots and roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.215, p. 143-153, 1997.

STURZ, A.V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, p. 257-263, 1995.

SUDO, A.; SILVA, E.M.R.; BOVI, M.L.A; ALMEIDA,D.L.; COZZOLINO, K. Produção de mudas de pupunheira colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 20, p. 529-532, 1996.

SUN, T.P.; GUBLER, F. Molecular mechanism of gibberelin signaling in plants. **Annual Review in Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 197-224, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

TAKAHASHI, M.; TERADA, Y.; NAKAI, I.; NAKANISHI, H.; YOSHIMURA, E.; MORI, S. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 1263-1280, 2003.

TAKATSUJI, H. Zinc finger proteins: The classical zinc finger emerges in contemporary plant science. **Plant Molecular Biology**, Fort Collins, v. 39, p. 1073-1078, 1999.

THOMPSON, J.A.; SCHWEITZER, L.E.; NELSON, R.L. Association of specific leaf weight, an estimate of chlorophyll, and chlorophyll concentration with apparent photosynthesis in soybean. **Photosynthesis Research**, Amsterdam, v. 49, p. 1-10, 1996.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 23, p. 1005-1024, 2000.

TISCHNER, R.; PEUKE, A.; GODBOLD, D.L.; FEIG, R.; MERG, G. HUTTERMANN, A. The effect of NO<sub>2</sub>-fumigation on aseptically grown spruce seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Revue, v. 133, n.2, p. 243-246, 1988.

TOMBOLATO, A.F.C.; COSTA, A.M.M. (Ed.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72 p. (IAC. Boletim técnico, 174).

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: EMBRAPA; ABCTP, 1990. 433 p.

ULLRICH, W.R. Nitrate and ammonium uptake in green algae and higher plants: mechanism and relationship with the nitrate metabolism. In: ULLRICH, W.R.; APARÍCIO, P.J.; SYRETT, P.J.; CASTILLO, F. (Ed.). **Inorganic nitrogen metabolism**. New York: Springer, 1987. p. 32-38.

UTTI, G.C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: FUNEP, 1988. 37 p.

Van CAMP, W.; CAPIAU, K.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; SLOOTEN, L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutases in chloroplasts. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 1703-1714, 1996.

VAVRINA, C.S.; OBREZA, T.A., Response of Chinese cabbage to nitrogen rate and source in sequential plantings. **HortScience**, Alexandria, v. 28, n. 12, p. 1164-1165, 1993.

VERÍSSIMO, V.; HERTER, F.G.; RODRIGUES, A.C.; TREVISAN, R.; MARAFON, A.C. Níveis de cálcio e boro de gemas florais de pereira (*Pyrus* sp.) no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 28-31, 2006.

VIANA, E.M. **Interação de nitrogênio e potássio na nutrição, no teor de clorofila e na atividade da redutase do nitrato em plantas de trigo**. 2007. 95 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

VILELA, A.E.; RAVETA, D.A.; The effect of radiation on seedling growth and physiology in four species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). **Journal of Arid Environments**, London, v. 44, n. 4, p. 415-423, 2000.

VILLALOBOS, V.M.; THORPE, T.A.; Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Ed.). **Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones**. Cali: CIAT, 1993. p. 19-40.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiniana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant Journal**, Oxford, v. 3, p. 315-324, 1993.

Von WIREN, N.; GAZZARRINI, S.; FROMMER, W.B. Regulation of mineral nitrogen uptake in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 196, p. 191–199, 1997.

Von WIREN., N.; KLAIR, S.; BNSAL, S.; BRIAT, J.F.; KHODR, H.; SHIOIRI, T.; LEIGH, R.A.; HIDER, R.C. Nicotianamine chelates both Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup>: Implications for metal transport in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 1107-1114, 1999.

VOS, J.; BOM, M. Hand-held chlorophyll meter: a promising tool to assess the nitrogen status of potato foliage. **Potato Research**, Amsterdam, v. 36, p. 301-308, 1993.

WELCH, R.M. Micronutrient nutrition of plants. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, p. 49-82, 1995.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 659-688, 2001.

WILSON, K.E.; IVANOV, A.G.; OQUIST, G.; GRODZINSKI, B.; SARHAN, F.; HUNER, N.P.A. Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stresses. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84. p. 1355-1370, 2006.

WOLF, M.A. **Accumulation of biomass and nutrients in the aboveground organs of four local tree species in monoculture and polyculture systems in central Amazônia**. 1997. 299 p. Thesis. (Doctorate) - Diplomarbeit Universität Bayreuth, Bayreuth, 1997.

YATAZAWA, M.; FURUHASHI, K. Nitrogen sources for the growth of rice callus tissue. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v.14, p.73-79, 1968.

YOKOTA, S.; OJIMA, K. Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminum stress in water culture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 163-165, 1995.

YUYAMA, L.K.O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J.P.L.; SOUSA, R.F.S. Biodisponibilidade de vitamina A da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) em ratos. **Acta amazônica**, Manaus, v. 29, n. 3, p. 497-500, 1999.

YUYAMA, Q.; HLAVACKA, A.; MATOH, T.; VOLKMANN, D.; MENZEL, D.; GOLDBACH, H.E.; BALUSKA, F. Short-term boron deprivation inhibits endocytosis of wall pectins in meristematic cells of maize and wheat root apices. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 415-421, 2003.

ZHANG, H.; FORDE, B.G. An *Arabidopsis* MADS-box gene controlling nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, Washington, v. 279, p. 407-409, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/279/5349/407>>. Acesso em: 12 out. 2009. Acesso em: 12 jul. 2009.



ZHANG, H.; JENNINS, A.; BARLOW, P.; FORDE, B.G. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, v. 96, p. 6529-6534, 1999.



**ANEXO**

## Anexo A – Matriz de Correlação de Pearson

Matriz de correlação de Pearson entre nitrato de amônio, nitrato de potássio e o teor dos nutrientes determinados.

	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	Cu	Fe	Mn	Zn	N	P	K	Ca	Mg	N
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	0,00 <sup>ns</sup>	0,495*	0,013 <sup>ns</sup>	0,774**	0,058 <sup>ns</sup>	0,915**	0,504*	0,110 <sup>ns</sup>	0,724**	0,615**	1
KNO <sub>3</sub>	0,00 <sup>ns</sup>	1	0,023 <sup>ns</sup>	0,356 <sup>ns</sup>	0,337 <sup>ns</sup>	0,520**	0,045 <sup>ns</sup>	0,562**	0,886**	0,142 <sup>ns</sup>	0,420*	1

ns = valores não significativos

\* valores significativos ao nível de 5% de probabilidade de erro, pelo teste F.

\*\* valores significativos ao nível de 1% de probabilidade de erro, pelo teste F.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)