

EDSON MARCIO MATTIELLO

**ESTADO NUTRICIONAL E ASPECTOS FISIOLÓGICOS E
ANATÔMICOS EM MILHO SOB OMISSÃO DE
MICRONUTRIENTES CATIÔNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL

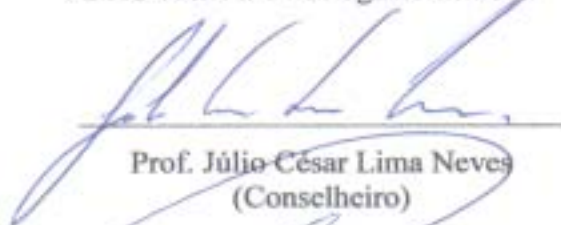
2004

EDSON MARCIO MATTIELLO

**ESTADO NUTRICIONAL E ASPECTOS FISIOLÓGICOS E
ANATÔMICOS EM MILHO SOB OMISSÃO DE
MICRONUTRIENTES CATIÔNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 04 de agosto de 2004



Prof. Júlio-César Lima Neves
(Conselheiro)



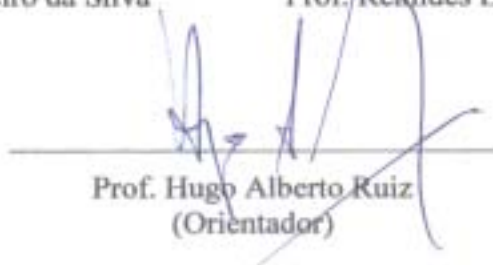
Prof.ª Marília Contin Ventrella
(Conselheira)



Prof. Ivo Ribeiro da Silva



Prof. Renildes Lúcio Ferreira Fontes



Prof. Hugo Alberto Ruiz
(Orientador)

A toda a minha família, pelo incentivo e pela confiança durante todos esses anos.

À minha mãe *Elzinha* e ao meu pai *Alfredo*, pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos *Carlos, Marlene, Hilário, Luis, Gorete, Genilza, Roberto e Eraldo*, pelo incentivo.

Aos meus sobrinhos *Fabiana, Dioenís, Adriano, Aline, Janismar, Lucélia, Jocimar, João Antônio, Cristina, Giliane, Leandro, Tiago, Tatiane, Taís, Geovane, Caroline, Alice* e ao pequeno *Vinícius*, meu primeiro afilhado, pelo carinho.

Aos cunhados e cunhadas *Arlete, Antônio, Angela, Marilene, Carlos, Geovana e Vânia*, pela amizade.

Ao meu grande amigo *Robson*, pela amizade e pelos momentos compartilhados.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade, palavras não retribui.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Ao professor Hugo Alberto Ruiz, pela orientação durante a realização deste trabalho.

Aos professores Júlio Cesar Lima Neves e Marília Contin Ventrella, pela participação valiosa no trabalho realizado.

Aos professores Ivo Ribeiro da Silva e Renildes Lúcio Ferreira Fontes e a todos os demais professores do Departamento de Solos, pela atenção recebida e pela participação em minha formação.

A todos os funcionários do Departamento de Solos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos laboratoristas Cláudio, Carlos Fonseca e João Lelis.

Ao Departamento de Biologia Geral, em particular aos professores, funcionários e estudantes do Laboratório de Anatomia Vegetal, e aos

professores Adilson Ariza Zacaro e Sérgio Luis Pinto da Matta, do Laboratório de Biologia Estrutural, pelo apoio e pela colaboração.

Ao Departamento de Fisiologia Vegetal, pelo empréstimo dos equipamentos e pela realização das medições, em especial ao professor Marco Antônio Oliva Cano e ao doutorando Alan Carlos Costa.

Ao colega Evander, pelo apoio recebido durante a realização das análises.

Aos estudantes de graduação em Agronomia Grasielle, Patrícia e Ivan, pela ajuda na condução dos experimentos e realização das análises.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, em especial à pesquisadora Vera Maria Carvalho Alves, pela colaboração no trabalho.

Aos amigos André, Eduardo, Celso e Uberlando, pela amizade, pelas conversas enriquecedoras e pelo apoio recebido.

A todos os colegas de Pós-Graduação, pela amizade e pelos momentos compartilhados.

BIOGRAFIA

EDSON MARCIO MATTIELLO, filho de Alfredo Waldemar Mattiello e Elzinha Pavani Mattiello, nasceu em 3 de janeiro de 1978, em São Gabriel da Palha, ES.

Em fevereiro de 2003, concluiu o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se em maio do mesmo ano.

Em março de 2003, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, na Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do professor Hugo Alberto Ruiz.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ferro	3
2.2. Cobre	5
2.3. Manganês	6
2.4. Zinco	7
2.5. Fluorescência de clorofila	9
2.6. Trocas gasosas	11
2.7. Anatomia e nutrição de plantas	12

3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material vegetal e condições experimentais	13
3.2. Estudo fisiológico	15
3.3. Estudo anatômico	16
3.4. Características fitotécnicas e teores foliares	18
3.5. Análise dos resultados	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Ferro	19
4.2. Cobre	25
4.3. Manganês	32
4.4. Zinco	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
6. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE	55

RESUMO

MATTIELLO, Edson Marcio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2004. **Estado nutricional e aspectos fisiológicos e anatômicos em milho sob omissão de micronutrientes catiônicos.** Orientador: Hugo Alberto Ruiz. Conselheiros: Júlio César Lima Neves e Marília Contin Ventrella.

Com o objetivo de caracterizar e diagnosticar a deficiência de micronutrientes catiônicos, foram realizados quatro ensaios independentes, cultivando plantas de milho em soluções nutritivas com restrições de ferro, cobre, manganês ou zinco. Foram avaliados aspectos fisiológicos, anatômicos e teores foliares nas plantas em diferentes tempos de omissão desses micronutrientes. No estudo fisiológico foram quantificadas as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila. O estudo anatômico foi feito na região mediana da lâmina foliar, montando-se lâminas a partir de material incluído em historresina ou com impressão da epiderme com cola instantânea. Foi evidenciada a produção de amido na bainha do feixe vascular e, como coloração de contraste, foi utilizado o azul-de-toluidina. Foram obtidas imagens digitalizadas por meio de fotomicroscópio, sendo a proporção dos diferentes tecidos quantificada pelo software Image Pro-

Plus. O mesmo software foi utilizado para quantificar a produção de amido. Os teores foliares de ferro, cobre, manganês e zinco foram determinados por meio de espectrofotômetro de emissão óptica com plasma acoplado por indução. Todas as características foram avaliadas na segunda folha acima da última com lígula visível. Os sintomas visuais da deficiência nutricional surgiram aos 5, 12 e 16 dias, nos ensaios com ferro, manganês e zinco, respectivamente. No ensaio com cobre não foram observados sintomas visuais de deficiência até o vigésimo segundo dia. A deficiência de ferro, cobre, manganês e zinco promoveu redução na taxa de assimilação de CO₂ e na produção de amido, porém apenas a deficiência de manganês e de zinco afetou o crescimento da planta. A deficiência de ferro afetou etapas iniciais da fase fotoquímica, principalmente a absorção e transferência de energia pelo complexo coletor. O estudo anatômico mostrou que as deficiências de manganês e zinco foram as que promoveram maiores alterações nas proporções dos tecidos, com menor efeito para o ensaio com ferro e cobre. Em todos os ensaios, os teores foliares apresentaram reduções com o tempo de omissão; no entanto, no ensaio com ferro, houve tendência de estabilidade com o tempo de omissão, principalmente após o aparecimento dos sintomas visuais. A indução da deficiência levou à diminuição dos teores foliares na ordem de cobre > zinco \cong manganês > ferro. O teor de ferro na folha do milho mostrou-se ineficiente no diagnóstico do estado nutricional deste nutriente. Mesmo com reduções acentuadas nos teores de cobre, não foi verificado efeito sobre o crescimento da planta ou estresse nutricional.

ABSTRACT

MATTIELLO, Edson Marcio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2004. **Nutritional status and physiological and anatomical aspects in maize under cationic micronutrient Omission.** Adviser: Hugo Alberto Ruiz. Committee Members: Júlio César Lima Neves and Marília Contin Ventrella.

In order to characterize and diagnose the deficiency of cationic micronutrients, four independent experiments were carried out with maize plants cultivated in nutritive solutions with iron, copper, manganese or zinc omission. Physiological and anatomical aspects and leaf micronutrient content were evaluated at different times of omission of these nutrients. In the physiological study, gaseous exchanges and chlorophyll fluorescence were quantified. The anatomical study was conducted in the median region of the leaf blade, with glass slides being assembled from material embedded in Histo-resin or epidermis print with instant glue. Starch production was determined in the sheath of the vascular bundle with toluidine blue being used as contrast dye. Digital images were obtained with a photomicroscope, with the proportion of the different tissues being quantified with the software Image Pro-Plus, which

was also used to estimate starch production. iron, copper, manganese and zinc leaf contents were determined in a optical emission inductive-coupled plasma spectrophotometer (ICP-OES). All the characteristics evaluated were studied in the second leaf above the last with visible ligule. The visual symptoms of nutritional deficiency were observed on days 5, 12 and 16, in the iron, manganese, and zinc experiments, respectively. No visual symptoms of deficiency were observed in the copper experiment until day 22. Iron, copper, manganese and zinc deficiency decreased the CO₂ assimilation rate and starch production, but only manganese and zinc deficiency affected plant growth. Fe deficiency affected the initial stages of the photochemical phase, mainly the absorption and transference of energy. The anatomical study showed that manganese and zinc deficiencies promoted the highest alterations in the tissue proportions, with a smaller effect being observed on the iron and copper experiments. In all the experiments, the leaf content of micronutrient decreased along the omission time; however, in the iron experiment there was a tendency for stabilization with omission time, mainly after the appearance of deficiency symptoms. Induced deficiency led to a decrease in the leaf contents in the following order: copper > zinc \cong manganese > iron. Iron content in maize leaf was shown to be inefficient in diagnosing the nutritional status of this nutrient. Even with pronounced copper content reductions, no effect on plant growth or nutritional stress was verified.

1. INTRODUÇÃO

Os micronutrientes têm sido, em muitos casos, limitantes para a produtividade das culturas. As freqüentes observações de sintomas visuais de deficiência em áreas de produção agrícola, principalmente em condições de alta produtividade, refletem a diminuição da reserva do solo ao longo dos anos de cultivo, conseqüência da maior exportação desses micronutrientes na parte colhida e também das perdas por lixiviação. Além disso, a prática da calagem nestas áreas de cultivo tem acentuado o problema de deficiência de micronutrientes catiônicos em plantas cultivadas. Isso, juntamente com a evolução de equipamentos e melhoria de métodos de determinação, tem estimulado maior interesse na pesquisa com esses elementos.

A diagnose do estado nutricional das plantas é de grande importância para a produtividade das culturas e a qualidade dos alimentos produzidos. Diversos procedimentos podem ser utilizados na avaliação do estado nutricional das plantas, sendo mais freqüentes a diagnose visual, a análise do teor do nutriente em tecidos vegetais, a análise da seiva, os testes bioquímicos e o teor de clorofila na folha. Mesmo sem observação

de sintomas visuais, a carência dos nutrientes pode afetar a produtividade das culturas e a qualidade dos alimentos. Assim, métodos diagnósticos que detectem precocemente a carência nutricional são desafios para a pesquisa. Certamente, a disponibilidade de informações de diferentes métodos leva a um diagnóstico mais preciso e seguro do estado nutricional das plantas.

Em se tratando dos micronutrientes, o diagnóstico das deficiências nutricionais a eles relacionadas ainda não é satisfatório. Assim, por exemplo, a análise de tecidos vegetais, empregada com frequência, apresenta dificuldades quanto à interpretação dos resultados obtidos. Em muitos casos, os teores totais dos nutrientes, principalmente dos micronutrientes, não refletem o estado nutricional das plantas, verificando-se ausência de correlação entre a concentração em tecido e o crescimento e/ou a produção vegetal. Também as implicações fisiológicas, as diferenças varietais, as formas totais e ativas e as interações com outros elementos são alguns exemplos dessas dificuldades. Estudos que associem aspectos visuais, fisiológicos, anatômicos e concentração do nutriente nos tecidos vegetais são escassos, podendo ser de fundamental importância para a caracterização e o diagnóstico do estado nutricional das plantas.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar aspectos visuais, anatômicos, fisiológicos e a concentração de nutrientes em plantas de milho cultivadas em solução nutritiva com restrição de ferro, zinco, cobre ou manganês.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nutrientes são elementos de específica e essencial função fisiológica no metabolismo de plantas (Epstein, 1965; Marschner, 1995). Comparados com os macronutrientes, os micronutrientes são requeridos em pequenas quantidades e, de modo geral, participam como constituintes de grupos prostéticos em complexos metal-proteínas e como ativadores de numerosas reações enzimáticas. Como constituintes de grupos prostéticos, os micronutrientes catalisam reações redox de transferência de elétrons, formam complexos enzima-substrato e promovem a mudança da configuração molecular de proteínas.

2.1. Ferro

O ferro é constituinte de várias proteínas do tipo heme, presentes nos citocromos, nas catalases e nas peroxidases, sendo a atividade da catalase em folhas um bom indicador do *status* nutricional deste nutriente (Marschner, 1995). A catalase facilita a desmutação da H_2O_2 em H_2O e O_2 , evitando a toxicidade de radicais livres do oxigênio, enquanto a

peroxidase catalisa processos oxidativos usando H_2O_2 . O ferro está presente na leg-hemoglobina, exercendo a função de controle de O_2 em nódulos radiculares de leguminosas. É constituinte de certas proteínas contendo enxofre, como a ferredoxina, que atua no transporte de elétrons em vários processos metabólicos. Participa, também, das etapas de redução do SO_4^- a SO_3^- e do ciclo dos ácidos carboxílicos (Marschner, 1995).

Durante o transporte de elétrons na membrana dos tilacóides dos cloroplastos, no processo fotossintético, o ferro participa de grupos heme e proteínas contendo enxofre e ferro. A deficiência de ferro promove uma diminuição acentuada na concentração de clorofila e outros pigmentos fotossintetizantes (caroteno e xantofila), bem como a diminuição no transporte de elétrons dos fotossistemas I e II. Isso indica que a deficiência nutricional afeta, primariamente, a função dos cloroplastos, mais que a estrutura e a função das mitocôndrias (Pushnik & Miller, 1989).

A deficiência de ferro, normalmente, não afeta o crescimento da folha, o número de células por unidade de área foliar ou o número de cloroplastos por célula. No entanto, tem-se observado diminuição no volume e na concentração de proteínas dos cloroplastos (Terry & Abadia, 1986). Baixas concentrações de carboidratos em plantas deficientes em ferro não são, geralmente, expressão do limite da capacidade enzimática para fixação e redução de CO_2 , mas sim da diminuição do transporte de elétrons durante a fotossíntese (Terry & Abadia, 1986).

A inibição da síntese de proteínas distintas dos tilacóides, em condições de deficiência de ferro, provavelmente é resultado da diminuição de RNA ribossômico e mensageiro nos cloroplastos. Aproximadamente 80% do ferro localizado nas folhas encontra-se nos cloroplastos (Terry & Abadia, 1986). A concentração e a composição de lipídios nos tilacóides, em particular os galactolipídios, são afetadas pela deficiência (Nishio et al., 1985). Mudanças na matriz lipídica dos tilacóides podem ser alterações iniciais associadas à deficiência de ferro (Abadia et al., 1988).

Os sintomas visuais da deficiência de ferro, em milho, iniciam-se com cloroses internervais em toda a extensão da lâmina foliar, permanecendo verdes apenas as nervuras. Devido à remobilização limitada de ferro, a clorose induzida pela deficiência aparece, preferencialmente, em folhas mais novas (Dechen et al., 1991).

2.2. Cobre

O cobre desempenha papel importante em diversos processos fisiológicos, como fotossíntese, respiração, distribuição de carboidratos, fixação e redução do nitrogênio, metabolismo de proteínas e formação de paredes celulares. Controla também as relações hídricas nos vasos do xilema (Dechen et al., 1991).

A deficiência de cobre resulta em mudanças na composição lipídica da membrana do tilacóide, em particular nos polipeptídeos, afetando a eficiência da plastoquinona na transferência de elétrons entre os fotossistemas (Ayala & Sandmann, 1988).

O principal fator para a baixa produção de matéria seca em plantas deficientes em cobre, durante a fase vegetativa, é a diminuição no transporte de elétrons (Botrill et al., 1970; Mizumo et al., 1982).

O acúmulo de compostos fenólicos e a diminuição da lignificação ocorrem em função da redução das atividades das enzimas fenolase e lacase, mesmo com moderada deficiência de cobre (Marziah & Lam, 1987). Os compostos fenólicos inibem a atividade do ácido indol acético oxidase (AIA oxidase), aumentando a concentração do AIA, podendo ser a causa do atraso na floração e senescência observadas em plantas deficientes em cobre (Robson et al., 1982). Em geral, a deficiência de cobre deprime o desenvolvimento reprodutivo mais que o vegetativo. Além da inviabilidade do pólen, outras causas da macho-esterilidade podem estar envolvidas, como a falta de rigidez do pólen e o não-desprendimento dos estames, em resposta à diminuição da lignificação da parede celular da antera (Römheld & Marschner, 1991).

Em milho, o sintoma inicial da deficiência de cobre é o amarelecimento das folhas novas logo que começam a se desenrolar e, em seguida, o encurvamento das pontas com sinais de necrose. As folhas tornam-se amarelas, com faixas semelhantes às provocadas pela carência de ferro. As margens apresentam-se necrosadas e o colmo macio, dobrando-se com facilidade. Os sintomas são mais evidentes em tecidos jovens de parte aérea, consequência da baixa redistribuição de cobre no floema de plantas deficientes (Loneragan, 1981).

2.3. Manganês

O manganês desempenha funções importantes no metabolismo da planta, associadas com a ativação de enzimas, a participação na reação de fotólise da água e a evolução do oxigênio no sistema fotossintético. Também tem participação na síntese da clorofila, na multiplicação e funcionamento dos cloroplastos e no metabolismo do nitrogênio e de compostos cíclicos, como precursor de aminoácidos, hormônios, compostos fenólicos e ligninas (Römheld & Marschner, 1991).

O teor de carboidratos solúveis é reduzido na deficiência de manganês, particularmente nas raízes, devido, principalmente, à inibição da fotossíntese (Brown et al., 1984). A exigência de Mn por enzimas para síntese de carboidratos não é claramente identificada em plantas C3. Em plantas C4 atua em, pelo menos, duas enzimas: a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase. Essas enzimas têm uma exigência absoluta por Mn, que não pode ser substituído por magnésio (Römheld & Marschner, 1991).

A deficiência de manganês promove uma inibição na biossíntese de lipídios e carotenóides e uma progressiva desorganização da estrutura lamelar nos cloroplastos. A divisão celular é reduzida, e mais drasticamente o alongamento da célula, sendo este efeito em parte

indireto, devido à redução no suprimento de carboidratos e à redução de AIA (Neumann & Steward, 1968). Em plantas deficientes em Mn, ocorre menor concentração de metabólitos (aminoácidos, compostos fenólicos, lignina, flavonóides e AIA), causando decréscimo na resistência a doenças (Burnell, 1988).

A mobilidade do Mn no interior da planta é baixa, sem indícios de translocação; por essa razão, os sintomas de deficiência surgem primeiramente nas folhas jovens (Camargo & Silva, 1990). O aspecto visual inicial da deficiência de manganês em milho é a clorose internerval das folhas mais novas. Em casos mais severos, aparecem faixas longas e brancas no tecido foliar e os colmos apresentam-se finos. Aspectos citológicos da deficiência de manganês evidenciam cloroplastos vacuolados e, com relação aos aspectos químicos, observa-se redução no teor de amido (Malavolta et al., 1997).

2.4. Zinco

A deficiência de zinco é uma das mais freqüentes na agricultura, podendo afetar significativamente a produção das culturas. Entre as adubações com micronutrientes nos solos brasileiros, a de zinco é a que proporciona as maiores respostas na produção de grãos em milho (Galvão & Mesquita Filho, 1981).

O zinco tem sido identificado em mais de 70 metalproteínas funcionais. É um componente e ativador enzimático, com destaque para as desidrogenases (alcoólica, glutâmica e láctica), sintetases, carboxilases e isomerases (Faquin, 1997). Na planta, o zinco exerce função de co-fator funcional, estrutural e regulatório de grande número de enzimas, formando complexos de alta estabilidade com radicais de grupos polares contendo O, N e S (Williams, 1989).

A concentração de carboidratos, em folhas de plantas deficientes em zinco, é inalterada ou aumentada (Marschner & Cakmak, 1989). Excreção de açúcares na superfície foliar pode ser observada em situações de extrema deficiência de zinco. Portanto, o efeito no metabolismo de carboidratos não é, primariamente, responsável pelo retardamento do crescimento e pelos sintomas visuais da deficiência de zinco (Marschner, 1995). Outros mecanismos podem estar envolvidos, como, por exemplo, alterações na álcool desidrogenase, que catalisa a redução do acetaldeído para etanol.

A concentração de proteínas em plantas deficientes em zinco é reduzida, ocorrendo aumento na concentração de aminoácidos e amidas (Cakmak et al., 1989). Essa inibição na síntese de proteínas é causada, principalmente, pela redução na produção de RNA, pela baixa atividade da RNA polimerase (Soloiman & Wu, 1985), pela redução da integridade estrutural dos ribossomos (Obata & Umebayshi, 1988) ou pela elevada degradação do RNA (Cakmak et al., 1989).

O zinco desempenha papel importante na detoxicação de radicais superóxidos, protegendo as membranas e proteínas contra a oxidação. A atividade da superóxido-desmutase e da catalase é reduzida com a deficiência de zinco. Elevados níveis de radicais livres de oxigênio causam a destruição de ácidos graxos insaturados e fosfolipídeos nas membranas, promovendo o vazamento de solutos como potássio, açúcares e aminoácidos. Adicionalmente, o aumento da oxidação de lipídios em folhas pode levar à degradação da clorofila e, também, a necroses e a atrofia do crescimento, particularmente sob altas intensidades luminosas (Marschner & Cakmak, 1989).

Plantas deficientes em zinco apresentam baixas concentrações de fito-hormônios, particularmente AIA, decorrentes da sua degradação oxidativa. Isso é resultado do aumento da atividade das peroxidases e de radicais de oxigênio livre (Cakmak & Marschner, 1988) ou, ainda, da

diminuição da síntese deste fito-hormônio. Altas concentrações de triptofano, em folhas jovens de plantas deficientes em zinco, indicam diminuição na síntese de proteína e menor conversão do triptofano para AIA (Cakmak et al., 1989).

Os sintomas da deficiência de zinco em milho são faixas brancas ou amareladas entre a nervura principal e as bordas, podendo progredir para necrose e também adquirir tons arroxeados. As folhas novas tornam-se esbranquiçadas ou de cor amarelo-pálida, ocorrendo, também, um encurtamento dos internódios.

2.5. Fluorescência de clorofila

A redução da eficiência quântica do fotossistema II (FS II), tradicionalmente conhecida como fotoinibição, pode ser facilmente determinada por medidores de fluorescência da clorofila (Krause & Veis, 1991). A emissão de fluorescência das clorofilas dos sistemas fotossintéticos torna possível a realização de ensaios não-destrutivos para examinar os eventos fotoquímicos da fotossíntese e pode ser usada, efetivamente, para monitorar as variações na atividade e organização do aparelho fotossintético, quando as plantas são expostas ao estresse ambiental (Baker et al., 1983). Aproximadamente 2,5 a 5% da energia absorvida da luz pelos pigmentos de clorofila são reemitidos do primeiro estado excitado na forma de fluorescência (Bolhar & Oquist, 1993). A Figura 1 representa a curva da fluorescência da clorofila relacionada com as reações da cadeia de transporte de elétrons. A fluorescência inicial (F_0), em folhas previamente adaptadas à ausência de luz, representa a intensidade da fluorescência quando as moléculas de quinona A (Q_A) encontram-se totalmente oxidadas. O aumento de F_0 parece estar associado à redução na eficiência de captura e transferência de energia pelo complexo coletor de luz do aparato fotossintético (Krause & Weis, 1991).

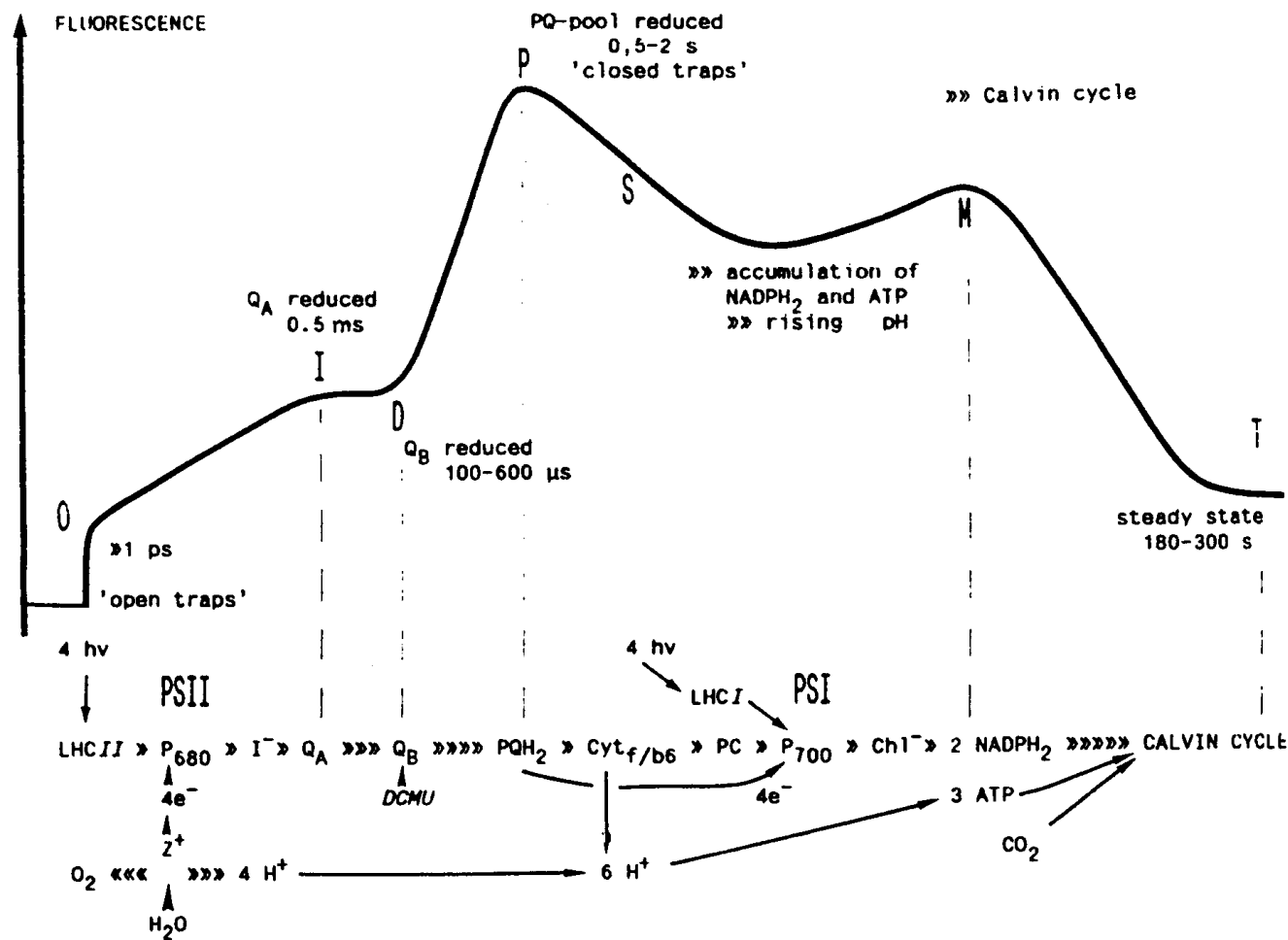


Figura 1. Curva de indução da fluorescência da clorofila relacionada com as reações da cadeia de transporte de elétrons: OI D P S M T.

A redução parcial de Q_A , após a iluminação, resulta no aumento da intensidade da fluorescência, que chega ao nível F_m (fluorescência máxima) quando o centro de reação encontra-se bloqueado (todas as moléculas de Q_A reduzidas). A diferença $F_m - F_0$ representa a fluorescência variável (F_v). A razão F_v/F_m é um importante indicador do estado funcional do aparato fotossintético, sendo uma estimativa da máxima eficiência quântica do FSII (Björkman & Demmig, 1987). Fatores ambientais que resultam na diminuição da eficiência quântica do FSII causam redução na razão F_v/F_m , que, para a maioria das espécies, encontra-se em torno de $0,832 \pm 0,0004$, quando as condições ambientais são favoráveis (Björkman & Demmig, 1987).

2.6. Trocas gasosas

A nutrição mineral influencia direta e indiretamente o metabolismo do carbono, devido aos seus efeitos no desenvolvimento. Os efeitos bioquímicos sobre a fotossíntese e a respiração acontecem porque os elementos minerais são componentes integrantes de enzimas e pigmentos ou, ainda, ativadores diretos do processo fotossintético (Prado, 2000).

Adicionalmente, a nutrição mineral afeta as trocas gasosas por meio dos efeitos sobre o crescimento, o tamanho e a espessura das folhas e, sobretudo, no tempo de duração dos órgãos fotossintéticos (Prado, 2000).

Medições diretas da assimilação de CO_2 são vantajosas por se tratar de método instantâneo e não-destrutivo. Além disso, possibilita a quantificação da assimilação de CO_2 em diferentes órgãos fotossintetizantes da planta, expressando valores de fotossíntese líquida.

O analisador portátil de gases no infravermelho (IRGA) tem sido utilizado na medição de trocas gasosas diretamente no campo, em casa de vegetação ou em câmaras de crescimento (Long & Hallgren, 1993).

2.7. Anatomia e nutrição de plantas

A disponibilidade de nutrientes tem sido um dos principais fatores que afetam o crescimento e o desenvolvimento normal das plantas. Plantas carentes em um ou mais nutrientes apresentam sintomas específicos, que se manifestam, principalmente, em folhas, como clorose e amarelecimento provocado pela redução dos teores de clorofila. Geralmente o crescimento é reduzido, a área foliar é menor e a espessura da folha é afetada, podendo ocorrer modificações importantes nos tecidos.

Diversos autores têm observado modificações anatômicas das folhas e de outros órgãos, relacionadas à deficiência nutricional. Bussler (1981) conclui que a deficiência de cobre em eucalipto pode ser diagnosticada por meio de teste para lignina na parede celular, visto a importância deste nutriente na fenolase, enzima responsável pela síntese da lignina. Van Arendonk et al. (1997), trabalhando com diversas espécies de gramíneas do leste europeu, observaram que a deficiência de nitrogênio promove uma compactação celular, aumentando a massa específica da folha; além disso, aumenta a proporção de tecidos esclerenquimáticos e diminui o volume das células epidérmicas.

Dickison (2000), numa revisão sobre alterações anatômicas relacionadas à deficiência nutricional, relata que plantas crescendo em ambientes pobres em nitrogênio apresentam folhas com alta densidade de tricomas, cutícula espessa, alta proporção de tecidos vasculares e esclerenquimáticos. Baixa concentração de potássio no tecido afeta a expansão celular, promovendo maior compactação dos tecidos. Essa resposta está associada à redução na espessura da folha, degradação de cloroplastos e deformação na ultra-estrutura da célula. A deficiência de um ou mais micronutrientes (cobre, zinco, manganês), produz, de modo geral, nanismo, bem como mudanças específicas na estrutura da folha, com alterações na coloração, podendo desenvolver necrose. Deficiência de boro em eucalipto tem apresentado injúrias no meristema três a quatro dias após a indução da deficiência, enquanto os aspectos visuais da planta apresentam-se normais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições experimentais

Sementes de milho (*Zea mays*), híbridas (BRS 1010), foram germinadas em estufa a 27 °C, utilizando-se papel germitest previamente umedecido. Após cinco dias, as plântulas foram transferidas para casa de vegetação e colocadas em recipientes de plástico com capacidade de 1,5 L, contendo solução nutritiva específica para milho (Ruiz, 1997) (Quadro 1). Foi utilizada água deionizada com condutividade elétrica inferior a 3 $\mu\text{S m}$ para o preparo das soluções nutritivas. Os ensaios foram conduzidos no período de janeiro a fevereiro de 2004.

Foram induzidas deficiências de ferro, cobre, zinco ou manganês por omissão do nutriente em solução. Previamente, determinaram-se as concentrações dos micronutrientes em estudo, tanto na solução com presença quanto naquela caracterizada pela omissão do nutriente (Quadro 1). Os resultados mostraram contaminação na solução com omissão de zinco e cobre, especialmente deste último elemento. As plantas foram mantidas sob arejamento constante e o pH da solução ajustado no intervalo de 5,2 a 5,5 com NaOH ou HCl. No decorrer do ensaio, as plantas foram visualmente observadas, anotando-se o dia em que apresentaram os primeiros sintomas de deficiência.

Quadro 1. Concentração de nutrientes na solução nutritiva específica para milho e concentração dos micronutrientes em estudo nas soluções com omissão do elemento

Nutriente	Fonte	Solução completa	Solução com omissão do elemento
Nitrogênio (mmol L ⁻¹)	KNO ₃	2,55	
Potássio (mmol L ⁻¹)		1,00	
Fósforo (mmol L ⁻¹)	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,33	
Cálcio (mmol L ⁻¹)	Ca(NO ₃) ₂	0,66	
Magnésio (mmol L ⁻¹)	MgSO ₄	0,12	
Enxofre (mmol L ⁻¹)		0,12	
Ferro (μmol L ⁻¹)	Fe EDTA	66,59	0,00
Cobre (μmol L ⁻¹)	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,58	0,12
Manganês (μmol L ⁻¹)	MnCl ₂ .4H ₂ O	6,73	0,07
Zinco (μmol L ⁻¹)	ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,40	0,10
Boro (μmol L ⁻¹)	H ₃ BO ₃	19,00	
Molibdênio (μmol L ⁻¹)	NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,09	

Fonte: Ruiz (1997).

No ensaio com indução de deficiência de ferro, todas as plantas foram mantidas, por três dias, em solução nutritiva completa. No quarto dia, uma unidade experimental de cada bloco recebeu a solução nutritiva sem ferro, mantendo-se o procedimento até completar nove períodos de omissão do nutriente (Quadro 2). Para os demais micronutrientes, a indução inicial da deficiência foi feita a partir do momento do transplantio, sendo oito períodos de omissão para o Mn e sete para o Cu e Zn (Quadro 2).

Nos experimentos, independentes para cada nutriente, foi adotado delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições.

Quadro 2. Períodos de omissão de ferro, manganês, cobre ou zinco nos ensaios com plantas de milho em solução nutritiva

Tratamento	Período			
	Fe	Cu	Mn	Zn
Coleta	d			
_____	10			
_____	9		21	
_____	8	22	18	22
_____	7	18	15	18
_____	5	14	12	14
_____	4	10	9	10
_____	3	6	6	6
_____	2	2	3	2
_____	0	0	0	0

3.2. Estudo fisiológico

O estresse causado pela deficiência nutricional foi avaliado utilizando-se um medidor de fluorescência de clorofila não-modulado (Plant Efficiency Analyser-PEA, Hansatech, King's Lynn, UK). Foram quantificados valores de fluorescência mínima (F_0), de fluorescência máxima (F_m) e da razão F_v/F_m . Essas determinações foram realizadas na segunda folha acima da última com lígula visível, ao final do período experimental, anteriormente à coleta das plantas.

Paralelamente, na mesma folha, foram medidas as trocas gasosas, utilizando-se um analisador portátil de gases no infravermelho (IRGA, modelo LI 6400, Licor, Nebraska, EUA). Nessas medidas, determinou-se a taxa de assimilação de CO_2 ($TA\ CO_2$), a condutância estomática (g_s), a concentração interna de CO_2 (c_i), a taxa de transpiração por unidade de área foliar (E), a

concentração ambiente de CO₂ (c_a) e a relação entre a concentração interna e a concentração ambiente de CO₂(c_i/c_a). As determinações foram feitas sempre no período compreendido entre oito e onze horas.

3.3. Estudo anatômico

Previamente à coleta das plantas, separou-se a segunda folha acima da última com lígula visível, para utilização nos estudos anatômicos. Foram retiradas amostras de aproximadamente 2 cm da região mediana da lâmina foliar, compreendendo a nervura central, para a caracterização estrutural e histoquímica. O material utilizado no estudo anatômico foi fixado em FAA₅₀ (formol: ácido acético: álcool etílico_{50%}, na proporção de 5: 5: 90) e estocado em etanol 70%. As amostras foram incluídas em historresina (Historesin–Leica), de acordo com as recomendações do fabricante e de Carmello-Guerreiro (1995).

O material embocado foi cortado em micrótomo de avanço automático, com 8 µm de espessura. As lâminas com os cortes foram submetidas ao teste de PAS (ácido periódico/reagente de Schiff), para evidenciar amido (Maia, 1979), e ao reagente azul-de-toluidina, para as avaliações estruturais (O'Brien & McCully, 1981) (Figura 2). As lâminas foram montadas em resina sintética (Permount). Para a observação da superfície foliar e contagem de estômatos, nas faces adaxial e abaxial, foi empregada a técnica de impressão da epiderme com cola instantânea (Super Bonder[®]).

As imagens, correspondentes às seções transversais da lâmina foliar, foram obtidas por meio de um microscópio de luz (Olympus AX70) com sistema U-Photo, acoplado a uma filmadora e um microcomputador.

A produção de amido foi quantificada com auxílio do software Image Pro-Plus, a partir das imagens digitalizadas. Foi determinada a área com reação positiva para amido em relação à área da bainha do feixe vascular, juntamente com o feixe vascular. Para cada repetição, foram avaliados seis feixes de pequeno calibre da região mediana da lâmina foliar.

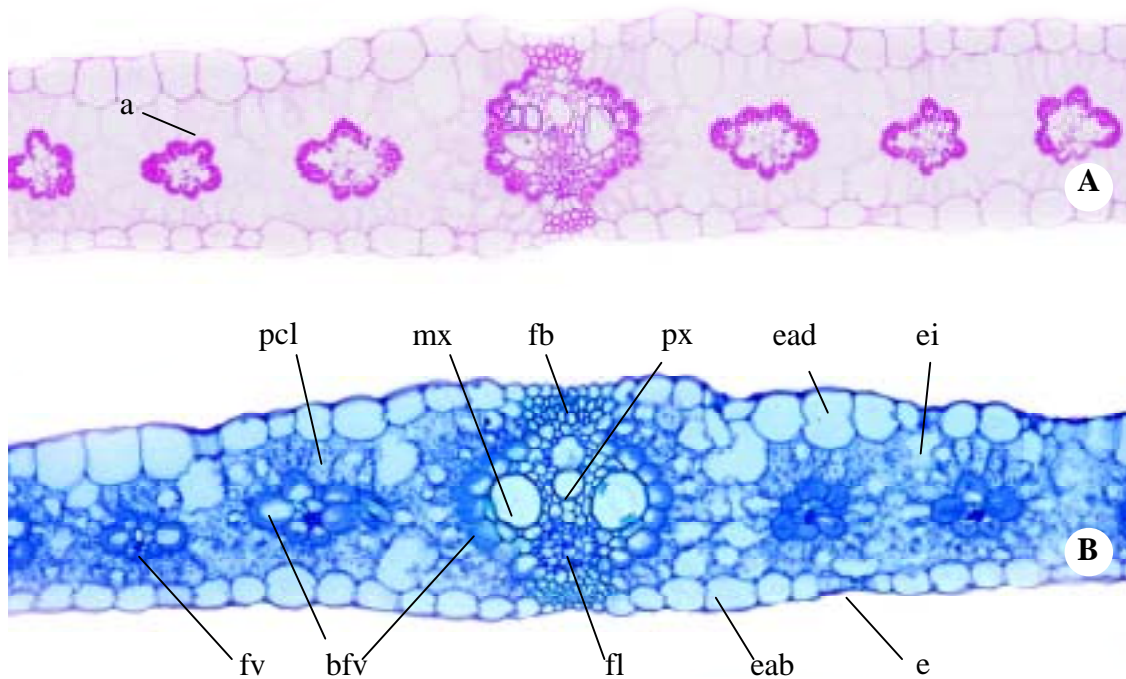


Figura 2. Seção transversal da folha do milho (*Zea mays* L.). A: corado com reagente de Schiff; B: corado com azul-de-toluidina; a: amido; ead: epiderme da face adaxial; eab: epiderme da face abaxial; e: estômato; px: protoxilema; mx: metaxilema; fl: floema, fb: esclerênquima (fibras); bfv: bainha do feixe vascular; fv: feixe vascular, pcl: parênquima clorofiliano; ei: espaço intercelular.

A área de cada tecido, assim como as medidas lineares, foram quantificadas com o auxílio do software Image Pro-Plus, alimentado pelas imagens digitalizadas. A partir da área total da seção transversal (μm^2), foram calculadas as percentagens de cada tecido, como: parênquima clorofiliano, epiderme das faces adaxial e abaxial, bainha do feixe vascular, feixe vascular, esclerênquima (fibras) e espaços intercelulares. Também foram determinadas a distância entre feixes (μm) e a espessura da lâmina foliar (μm). Para a contagem dos estômatos e o cálculo de densidade (n° estômatos mm^{-2}), em ambas as faces da folha, foram tomados cinco campos por repetição, utilizando câmara clara.

3.4. Características fitotécnicas e teores foliares

As plantas foram coletadas ao final do período experimental, no estágio vegetativo V5 (cinco folhas desenvolvidas) para o ensaio com ferro e V7 (sete folhas desenvolvidas) para os demais micronutrientes em estudo. Após a colheita, determinou-se a altura das plantas submetidas à omissão de ferro e a produção de matéria seca da parte aérea, nas omissões de cobre, manganês e zinco.

A porção da lâmina foliar, não utilizada no estudo anatômico, foi destinada às análises químicas. As amostras, com massa seca variando entre 0,085 e 0,225 g, foram submetidas à digestão nitro-perclórica, determinando-se os teores de ferro, cobre, manganês ou zinco, por meio de espectrofotômetro de emissão óptica com plasma acoplado por indução (Perkin-Elmer, modelo Optima 3300 DV).

3.5. Análise dos resultados

A resposta à omissão do nutriente foi avaliada pela observação dos aspectos visuais, fisiológicos e anatômicos e pela determinação dos teores foliares.

Os resultados experimentais foram submetidos à análise de variância, ajustando-se equações de regressão, considerando-se o tempo de omissão do nutriente em solução nutritiva como variável independente. Os modelos foram selecionados pela significância dos coeficientes a 5% de probabilidade pelo teste t.

Para comparar as modificações nas variáveis razão F_v/F_m , taxa de assimilação de CO_2 , altura de planta ou matéria seca de parte aérea, teores foliares e percentagem de amido, calcularam-se valores relativos, atribuindo 100% à maior média ajustada de cada uma delas. Assim, foram traçadas curvas de resposta ao tempo de omissão do nutriente, com os mesmos modelos definidos anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ferro

O surgimento dos sintomas visuais da deficiência de ferro ocorreu cinco dias após a omissão deste nutriente em solução nutritiva. As plantas deficientes apresentaram cloroses internervais em folhas jovens, permanecendo verdes apenas as nervuras.

Os valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 , da altura de planta, dos teores foliares e da percentagem de amido, com as respectivas equações de regressão, mostram a variação das características avaliadas com o tempo de omissão de ferro em solução nutritiva (Quadro 3). Pelas equações ajustadas, observa-se que a omissão de ferro, no período estudado, não afetou o crescimento das plantas. Todas as outras características declinaram progressivamente com a deficiência induzida do nutriente.

As equações apresentadas no Quadro 3 permitem estabelecer que o aparecimento dos sintomas visuais da deficiência, ocorrido cinco dias após a omissão de ferro em solução nutritiva, foi acompanhado por redução de 13% na razão F_v/F_m , de 9% na taxa de assimilação de CO_2 e de

24% na percentagem de amido. Concomitantemente, o teor foliar apresentou redução de 31%, em relação às plantas crescidas em solução nutritiva completa (0 dia de omissão). Como previamente indicado, a altura das plantas não sofreu alterações no período estudado.

Na Figura 3 é mostrada a produção de amido nas células da bainha do feixe vascular da folha do milho, sob diferentes tempos de omissão de ferro em solução nutritiva, em resposta ao teste PAS.

Quadro 3. Valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 ($TA\ CO_2$), da altura das plantas de milho, do teor foliar de Fe e da percentagem de amido e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de ferro na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)									
	0	2	3	4	5	7	8	9	10	
Razão F_v/F_m	0,761	0,750	0,762	0,714	0,658	0,570	0,476	0,449	0,335	
$TA\ CO_2$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	22,96	23,30	23,02	22,07	20,66	17,50	18,54	16,81	20,62	
Altura (cm planta ⁻¹)	58,33	50,83	58,50	54,67	55,50	59,00	56,33	55,00	51,00	
Teor de Fe (mg kg ⁻¹)	81,23	66,26	59,36	54,65	55,83	55,07	46,85	54,55	58,71	
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100$)	56,58	nd	47,53	nd	44,90	nd	nd	nd	29,05	
Equações de regressão										
Razão F_v/F_m	$\hat{y} = 0,765 + 0,00501 * x - 0,000476 * x^2$							$R^2 = 0,989$		
$TA\ CO_2$ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ^{1/}	$\hat{y} = 23,219 - 0,0843 * x^2$							$R^2 = 0,918$		
Altura (cm planta ⁻¹)	$\hat{y} = \bar{y} = 55,46$									
Teor de Fe (mg kg ⁻¹) ^{2/}	$\hat{y} = 81,760 - 17,209 * x^{0,5} + 2,628x$							$R^2 = 0,957$		
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100$)	$\hat{y} = 56,717 - 2,711 * x$							$R^2 = 0,988$		

*: significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

^{1/} Foi excluído no ajuste o valor determinado aos 10 d.

^{2/} Foram excluídos no ajuste os valores determinados aos 8 e 10 d.

nd: não determinado.

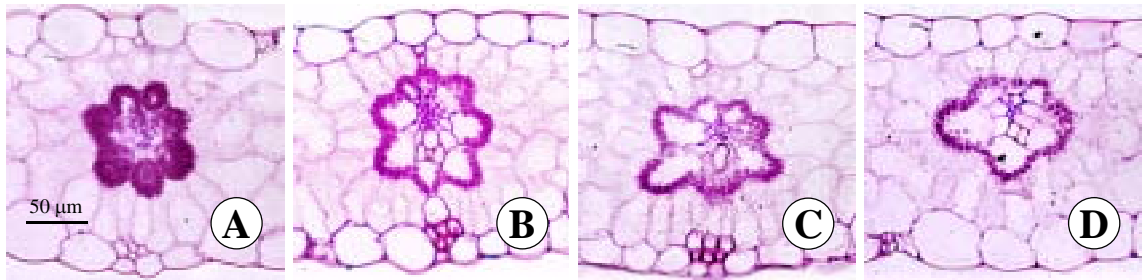


Figura 3. Detalhe da bainha do feixe vascular de folha de milho, submetida ao teste PAS em diferentes tempos de omissão de ferro em solução nutritiva. A: 0 dia; B: 3 dias; C: 5 dias; e D: 10 dias.

Os teores de ferro na folha apresentaram acentuado declínio nos primeiros dias da omissão, tendendo logo à estabilidade. Ao contrário, a taxa de assimilação de CO_2 e a razão F_v/F_m decresceram lentamente na fase inicial e marcadamente após o quinto dia de omissão, tempo no qual foram observados os primeiros sintomas visuais (Figura 4).

As variações nos teores foliares e nas características relacionadas à fotossíntese, como a TA CO_2 , a produção de amido e a razão F_v/F_m , antecederam o surgimento dos sintomas visuais da deficiência de ferro em milho. Isso mostra o caráter tardio do diagnóstico visual.

Os dados obtidos sugerem a não-correlação entre o teor de ferro na folha e a atividade fotossintética. Teores de ferro semelhantes corresponderam a valores de fotossíntese e níveis de estresse nutricional diferenciados, indicando que o teor total de ferro na folha não reflete o estado nutricional das plantas de milho, sob o ponto de vista fisiológico ou bioquímico.

No momento do aparecimento dos sintomas visuais de deficiência, os teores de ferro na folha (56 mg kg^{-1}) enquadraram-se na faixa de suficiência para a cultura do milho ($20\text{--}250 \text{ mg kg}^{-1}$) (Martinez et al., 1999). Trabalhos mostrando que teores supostamente adequados de Fe na planta não evitam, necessariamente, o aparecimento de sintomas de deficiência são freqüentes na literatura (Menard, 1956; Hue & Nakamura, 1988). Isso sugere que o teor total de ferro não reflete seu estado nutricional na planta (Pestana et al., 2003).

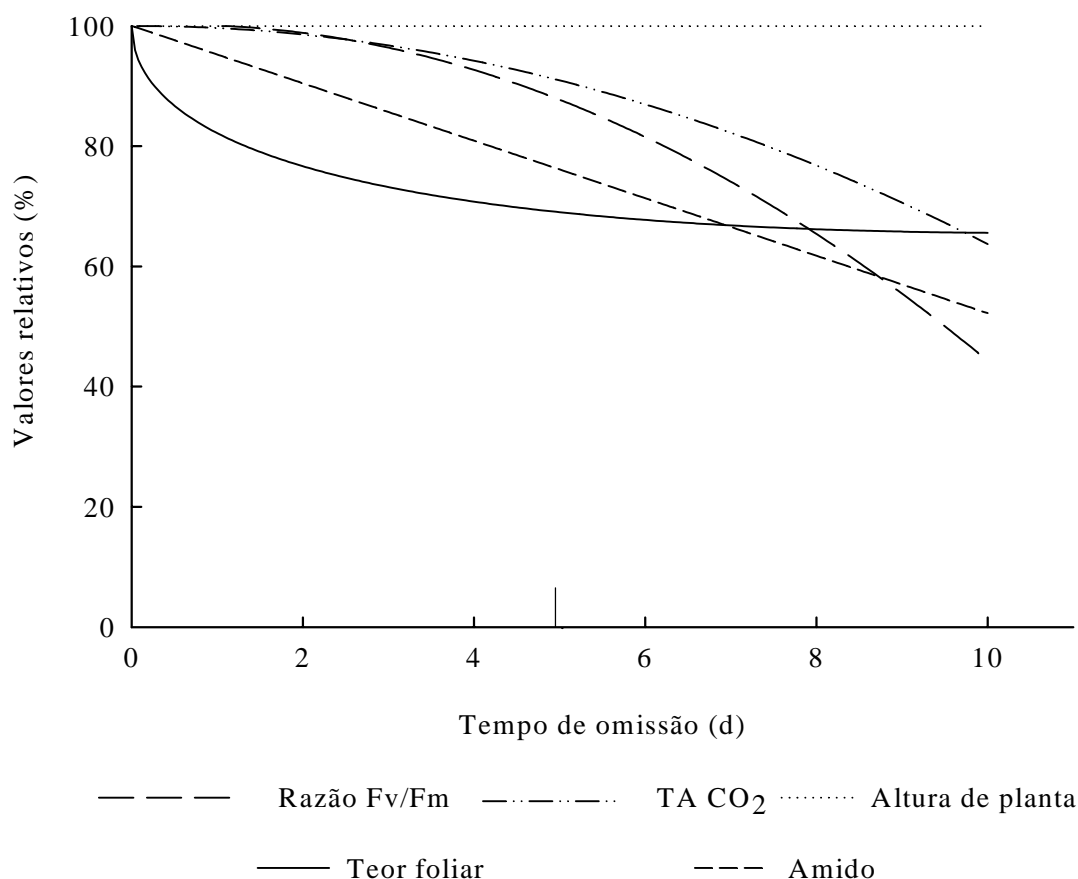


Figura 4. Valores relativos da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 ($TA\ CO_2$), da altura das plantas de milho, do teor foliar de Fe e da percentagem de amido, considerando o tempo de omissão de ferro na solução nutritiva. O traço (|) indica o tempo de aparecimento do sintoma visual da deficiência.

Diversos autores têm relacionado o excesso de fósforo na planta com reações de inativação do Fe em diferentes compartimentos (Brown et al., 1959; Welch, 1995; Hiradate. & Inoue, 1998). Kock (1955) mostrou que folhas de feijoeiro, deficiente em Fe, apresentavam uma relação Fe/P ($mg\ kg^{-1} / g\ kg^{-1}$) de 60 a 70, enquanto em folhas não-cloróticas essa relação ficava em torno de 40 a 50. O autor concluiu que o teor de Fe total não seria indicativo da deficiência de Fe em plantas com o sintomas e mostrou a importância da relação Fe/P para o diagnóstico dessa deficiência. No presente trabalho, os teores de fósforo na folha apresentaram-se aproximadamente constantes nos diferentes tempos de

omissão do ferro. No entanto, as causas para a inativação e/ou a reduzida biodisponibilidade do ferro na planta podem ser bem mais complexas, visto que, em muitos casos, não existe relação entre P e Fe.

A síntese e a distribuição de compostos orgânicos, principalmente ácidos orgânicos, também podem estar envolvidas com mecanismos de disponibilidade e inativação de ferro. Diversos autores têm observado aumento na concentração de ácidos orgânicos em plantas deficientes em ferro, principalmente ácido cítrico e ácido málico (Landsberg, 1986; Welkie & Miller, 1993; Schmidt, 1999). Contudo, estudos mais detalhados dos ácidos orgânicos associados a técnicas de isótopos, entre outros, são necessários para maior entendimento da biodisponibilidade e inativação do ferro na planta.

A razão F_v/F_m apresentou redução mais acentuada com o avanço do tempo de omissão, evidenciando que a eficiência quântica do FS II foi afetada. A elevação do valor de F_0 (Quadro 4) indica aumento da emissão de fluorescência pelos pigmentos fotossintetizantes e foi a principal causa da diminuição da razão F_v/F_m . Segundo Krause & Weis (1991), esse aumento pode estar relacionado com a redução da capacidade de absorção e da transferência de energia pelo complexo coletor. Os resultados obtidos no ensaio com omissão de ferro sugerem que a deficiência deste nutriente em milho limita etapas iniciais da fase fotoquímica da fotossíntese.

A clorose observada nas folhas é indício da redução da concentração de clorofila. Aspectos qualitativos, como a redução da eficiência de absorção e a transferência de energia pelos pigmentos fotossintetizantes, e aspectos quantitativos, como a redução da concentração de clorofila na folha com a deficiência de ferro, podem estar envolvidos na menor eficiência quântica do FS II. Estudos têm mostrado que a deficiência de ferro altera a proporção dos pigmentos relacionados à fotossíntese, principalmente clorofilas e carotenóides, com conseqüente redução da absorvância (Morales et al., 1991).

Quadro 4. Valores médios da fluorescência mínima (F_0), da fluorescência máxima (F_m), da condutância estomática (g_s), da concentração interna de CO_2 (c_i), da transpiração (E) e da relação entre a concentração interna e a concentração ambiente de CO_2 (c_i/c_a), considerando o tempo de omissão de ferro na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)									
	0	2	3	4	5	7	8	9	10	
F_0 (μV)	575	578	590	800	777	809	1061	1109	1161	
F_m (μV)	2415	2310	2482	2722	2284	1981	2070	2010	1795	
g_s ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	0,130	0,120	0,110	0,093	0,107	0,130	0,103	0,107	0,103	
c_i ($\mu mol\ mol^{-1}$)	199,9	197,4	199,7	203,2	215,8	230,5	229,4	238,0	218,3	
E ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	1,897	1,843	1,767	1,810	1,823	1,840	1,757	1,650	1,457	
c_i/c_a	0,616	0,610	0,616	0,628	0,658	0,708	0,695	0,725	0,658	

Os resultados da concentração interna de CO_2 , da condutância estomática, da transpiração e da relação entre a concentração interna e a ambiente de CO_2 (Quadro 4) mostram que a diminuição da fotossíntese não foi limitada pelo suprimento de CO_2 . O efeito da deficiência de ferro na fase fotoquímica da fotossíntese, com conseqüente redução na produção de ATP e $NADPH_2$, pode ser uma das principais causas da redução da taxa de assimilação de CO_2 e da percentagem de amido observadas (Figura 4). Observa-se, em beterraba, que a deficiência de ferro diminui a capacidade de carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), limitando, portanto, a fotossíntese (Taylor & Terry, 1986; Winder & Nishio, 1995). No entanto, a maior eficiência do milho (C4) na fixação do carbono pode minimizar os efeitos da deficiência de ferro sobre a RuBP, atribuindo maior importância à fase fotoquímica. A diminuição na fotossíntese como conseqüência da deficiência de ferro tem sido relatada em diversas culturas, como beterraba (Terry, 1983), soja (Davis et al., 1986) e pêssigo (Pérez et al., 1995).

Os resultados referentes ao estudo anatômico são apresentados no Quadro 5. As características que apresentaram variações com o tempo de omissão de ferro na solução nutritiva foram as proporções de feixe vascular e de espaço intercelular. Foi observado acréscimo linear da proporção de tecidos do feixe vascular com o prolongamento do Quadro de deficiência. Também os espaços intercelulares apresentaram resposta, tendendo a uma redução em estádios mais avançados da deficiência. Não foram observadas diferenças estatísticas nas distâncias entre feixes, na espessura, nem na densidade estomática nas faces adaxial e abaxial da lâmina foliar do milho com o tempo de omissão de ferro em solução nutritiva.

Apesar do efeito negativo da deficiência de ferro sobre a fotossíntese, as características anatômicas avaliadas mostram que a expansão foliar não foi afetada no período experimental adotado (Figura 4 e Quadro 5). Esse resultado coincide com o de Terry & Abadia (1986), os quais observaram que a deficiência de ferro, de modo geral, não afeta o crescimento da folha. Abbott (1967) salientou que a inibição da divisão celular ocorria somente quando a deficiência tornava-se extremamente severa, provocando, em consequência, diminuição do crescimento.

4.2. Cobre

As plantas de milho cultivadas em solução nutritiva com restrição de cobre não manifestaram sintomas visuais de deficiência deste nutriente durante o período experimental adotado.

Os valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 , da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Cu e da percentagem de amido, bem como as respectivas equações de regressões ajustadas, mostram o comportamento dessas características com o tempo de omissão de cobre na solução nutritiva (Quadro 6). Pelas equações ajustadas, observa-se que a omissão de cobre, no período estudado, não afetou o crescimento das plantas nem a razão F_v/F_m . As demais características apresentaram reduções com a deficiência induzida do nutriente e, de forma acentuada, para os teores foliares de cobre.

Quadro 5. Valores médios das características anatômicas analisadas em seção transversal da lâmina foliar do milho e da densidade estomática e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de ferro na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)			
	0	3	5	10
Área total (μm^2)	219249	232769	214144	196025
Parênquima clorofiliano (%)	45,08	40,38	44,30	43,21
Epiderme da face adaxial (%)	16,51	20,12	17,47	17,60
Epiderme da face abaxial (%)	12,17	12,25	12,35	12,54
Bainha do feixe vascular (%)	13,86	11,59	11,54	12,49
Feixe vascular (%)	5,63	6,13	6,08	7,72
Esclerênquima (%)	1,02	1,62	1,25	1,45
Espaço intercelular (%)	5,73	7,92	7,01	4,99
Distância entre feixes (μm)	175	182	177	190
Espessura da lâmina foliar (μm)	180	188	180	162
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	31	34	37	29
Face abaxial	47	54	50	45
Equações de regressão ^{1/}				
Área total (μm^2)	$\hat{y} = \bar{y} = 215300$			
Parênquima clorofiliano (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 43,24$			
Epiderme da face adaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 17,93$			
Epiderme da face abaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 12,33$			
Bainha do feixe vascular (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 12,37$			
Feixe vascular (%)	$\hat{y} = 5,462 + 0,206x$			$R^2 = 0,904$
Esclerênquima (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 1,33$			
Espaço intercelular (%)	$\hat{y} = 5,889 + 0,736x - 0,0833x^2$			$R^2 = 0,885$
Distância entre feixes (μm)	$\hat{y} = \bar{y} = 181$			
Espessura da lâmina foliar (μm)	$\hat{y} = \bar{y} = 177$			
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	$\hat{y} = \bar{y} = 33$			
Face abaxial	$\hat{y} = \bar{y} = 49$			

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.

Quadro 6. Valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 (TA CO_2), da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Cu e da percentagem de amido e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de cobre na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)						
	0	2	6	10	14	18	22
Razão F_v/F_m	0,776	0,765	0,783	0,749	0,776	0,769	0,757
TA CO_2 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	34,56	35,57	nd	22,30	nd	20,26	17,17
Matéria seca (g planta ⁻¹)	4,32	4,50	4,94	4,09	3,64	4,38	3,70
Teor de Cu (mg kg ⁻¹)	3,90	2,28	1,72	0,08	<0,004	<0,004	<0,004
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100\%$)	50,38	nd	40,47	nd	40,89	nd	29,11
Equações de regressão ^{1/}							
Razão F_v/F_m	$\hat{y} = \bar{y} = 0,776$						
TA CO_2 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$\hat{y} = \frac{1}{(0,0280 + 0,00133 x)}$					$R^2 = 0,960$	
Matéria seca (g planta ⁻¹)	$\hat{y} = \bar{y} = 4,21$						
Teor de Cu (mg kg ⁻¹)	$X \leq 10: \hat{y} = 3,905 - 0,363 x$					$R^2 = 0,999$	
	$X > 10: \hat{y} = \bar{y} = 0,002$						
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100\%$)	$\hat{y} = 49,119 - 0,848x$					$R^2 = 0,870$	

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.
nd: não determinado.

Na Figura 5 é apresentada a produção de amido nas células da bainha do feixe vascular da folha do milho, sob diferentes tempos de omissão de cobre em solução nutritiva, em resposta ao teste PAS.

A matéria seca de parte aérea apresentou-se constante com o tempo de omissão de cobre (Figura 6). O cobre é um nutriente exigido em pequenas quantidades pelas culturas, sendo um dos últimos a desenvolver sintomas visuais de deficiência, o que, possivelmente, veio contribuir para os resultados obtidos.

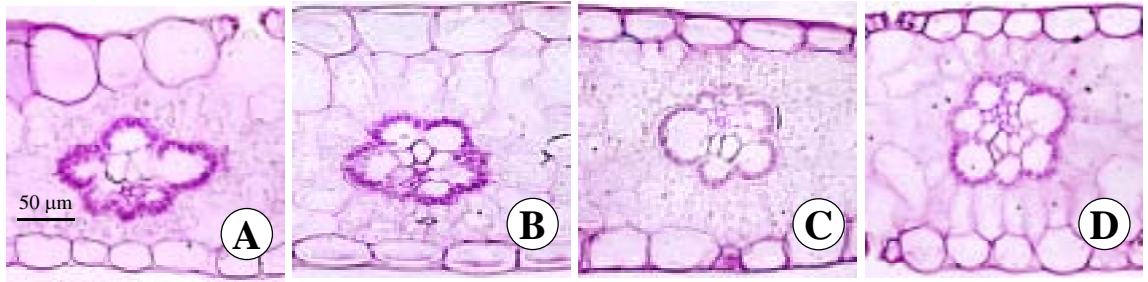


Figura 5. Detalhe da bainha do feixe vascular de folha de milho, submetida ao teste PAS em diferentes tempos de omissão de cobre em solução nutritiva. A: 0 dia; B: 6 dias; C: 14 dias; e D: 22 dias.

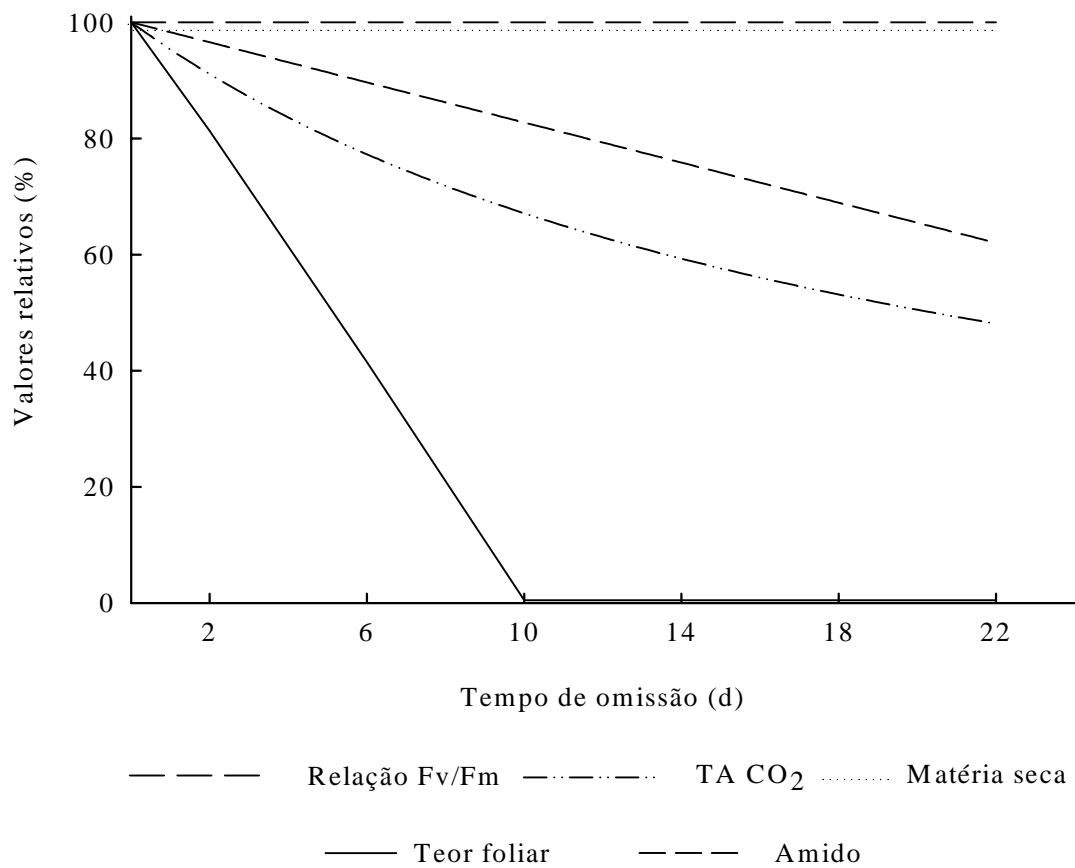


Figura 6. Valores relativos da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 (TA CO_2), da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Cu e da percentagem de amido, considerando o tempo de omissão de cobre na solução nutritiva.

Os teores de cobre na folha foram drasticamente reduzidos, apresentando valores menores que $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$ a partir do décimo dia de omissão (Figura 6). Essa redução pode ser atribuída à menor absorção de cobre pelas raízes, visto que o nutriente foi omitido da solução nutritiva, e, também, ao crescimento da planta no decorrer do período de omissão.

Os valores constantes da razão F_v/F_m mostram que a eficiência quântica do FS II não foi afetada pela omissão de cobre em solução nutritiva. A fase fotoquímica da fotossíntese, a princípio, não foi responsável pela redução na taxa de assimilação de CO_2 e de amido observada na Figura 6.

O cobre é constituinte da plastocianina, enzima componente do transporte de elétron vinculada ao fotossistema I. Trabalhos têm mostrado que a deficiência de cobre reduz a concentração de plastocianina, afetando o transporte de elétrons entre os fotossistemas (Ayala & Sandmann, 1988). Nas condições experimentais, os resultados da razão F_v/F_m , especificamente os valores constantes da fluorescência máxima (F_m) (Quadro 7), não apresentaram indícios de que o transporte de elétrons entre os fotossistemas esteja sendo afetado pela omissão de cobre na solução nutritiva. Isso sugere que a omissão de cobre em solução nutritiva, nas condições experimentais, não afetou o transporte de elétrons entre os fotossistemas.

Os valores da condutância estomática, da concentração interna de CO_2 , da transpiração e da relação concentração interna e ambiente de CO_2 são apresentados no Quadro 7. Os resultados mostram que a omissão de cobre em solução nutritiva reduziu a condutância estomática e a transpiração das plantas de milho. No entanto, os valores constantes da concentração interna de CO_2 e da relação C_i/C_a revelam que o controle estomático também não foi limitante para a fotossíntese das plantas deficientes em cobre. Assim, outros fatores podem estar envolvidos.

O cobre é importante componente das superóxido desmutases (CuZnSOD), enzimas responsáveis pela detoxicação de radicais livres de oxigênio produzidos durante a fotossíntese. A atividade destas enzimas é notadamente reduzida em plantas deficientes em cobre (Ayala &

Sandmann, 1988; Yu & Rengel, 1999), podendo ocorrer danos oxidativos à ultra-estrutura dos cloroplastos (Casimiro et al., 1990) e, portanto, afetar a fotossíntese. Entretanto, tal fato tem sido observado em condições de deficiência mais severa de cobre (Henriques, 1989); além disso, dados de literatura indicam que existe uma compensação dessas enzimas por outras que têm função similar, como as MnSOD e FeSOD, o que minimizaria o estresse oxidativo decorrente da deficiência de cobre (Yu & Rengel, 1999).

Os resultados referentes ao estudo anatômico são apresentados no Quadro 8. Houve diferença estatística apenas para as proporções dos espaços intercelulares e das distâncias entre feixes vasculares, não sendo possível discutir de forma isolada tal fato, visto que outras características de grande importância não apresentaram variações estatísticas com o tempo de omissão de cobre. Foi observado decréscimo linear nas distâncias entre feixes vasculares com o prolongamento do Quadro de deficiência (Quadro 8).

Quadro 7. Valores médios da fluorescência mínima (F_0), da fluorescência máxima (F_m), da condutância estomática (g_s), da concentração interna de CO_2 (c_i), da transpiração (E) e da relação entre a concentração interna e a concentração ambiente de CO_2 (c_i/c_a), considerando o tempo de omissão de cobre na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)						
	0	2	6	10	14	18	22
F_0 (μV)	432	443	404	432	430	427	444
F_m (μV)	1903	1880	1860	1720	1925	1871	1847
g_s ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	0,363	0,380	nd	0,237	nd	0,221	0,185
c_i ($\mu mol\ mol^{-1}$)	167,4	150,6	nd	175,5	nd	178,3	183,0
E ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	4,135	4,000	nd	3,059	nd	2,875	2,611
c_i/c_a	0,458	0,408	nd	0,473	nd	0,485	0,498

nd: não determinado.

Quadro 8. Valores médios das características anatômicas analisadas em seção transversal da lâmina foliar do milho e da densidade estomática e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de cobre na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)			
	0	6	14	22
Área total (μm^2)	228176	228520	238412	225560
Parênquima clorofiliano (%)	39,87	36,52	36,35	39,72
Epiderme da face adaxial (%)	14,20	15,40	14,95	14,75
Epiderme da face abaxial (%)	10,72	9,95	9,70	9,93
Bainha do feixe vascular (%)	12,27	12,80	11,90	13,21
Feixe vascular (%)	9,82	9,20	9,24	9,21
Esclerênquima (%)	1,89	1,93	1,89	1,74
Espaço intercelular (%)	11,23	14,21	16,18	11,45
Distância entre feixes (μm)	171	167	165	153
Espessura da lâmina foliar (μm)	189	185	186	185
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	33	34	34	34
Face abaxial	54	53	56	50
	Equações de regressão ^{1/}			
Área total (μm^2)	$\hat{y} = \bar{y} = 230167$			
Parênquima clorofiliano (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 38,06$			
Epiderme da face adaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 14,83$			
Epiderme da face abaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 10,07$			
Bainha do feixe vascular (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 12,54$			
Feixe vascular (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 9,37$			
Esclerênquima (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 1,86$			
Espaço intercelular (%)	$\hat{y} = 10,980 + 0,868x - 0,0382x^2$			$R^2 = 0,956$
Distância entre feixes (μm)	$\hat{y} = 171,9 - 0,760x$			$R^2 = 0,887$
Espessura da lâmina foliar (μm)	$\hat{y} = \bar{y} = 186$			
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	$\hat{y} = \bar{y} = 33$			
Face abaxial	$\hat{y} = \bar{y} = 53$			

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.

A baixa exigência de cobre pela maioria das culturas, associada ao menor requerimento na fase vegetativa em relação à fase reprodutiva, pode justificar a pouca variação das características anatômicas avaliadas.

4.3. Manganês

O surgimento dos sintomas visuais da deficiência de manganês ocorreu doze dias após a omissão deste nutriente em solução nutritiva. As plantas deficientes apresentaram cloroses em folhas jovens, sem a evidência de nervuras esverdeadas, como acontece com a deficiência de ferro, e redução no crescimento.

Os valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 , da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Mn e da percentagem de amido, assim como as respectivas equações de regressões ajustadas, mostram o comportamento dessas características com o tempo de omissão de manganês na solução nutritiva (Quadro 9). Pelas equações ajustadas, observa-se que a omissão de manganês reduziu os teores foliares de Mn, a percentagem de amido e a taxa de assimilação de CO_2 . A razão F_v/F_m e a produção de matéria seca foram tardiamente afetadas.

As equações apresentadas no Quadro 9 permitem estabelecer que o aparecimento dos sintomas visuais da deficiência, ocorrido doze dias após a omissão de manganês em solução nutritiva, foi acompanhado por redução de 76% nos teores de manganês na folha, de 26% na taxa de assimilação de CO_2 e de 40% na percentagem de amido, em relação às plantas crescidas em solução nutritiva completa (0 dia de omissão). A razão F_v/F_m e a produção de matéria seca não foram afetadas na fase inicial da omissão de manganês em solução nutritiva.

A redução nos teores foliares de manganês refletiu a redução da absorção de manganês pelas raízes das plantas de milho, visto que o nutriente foi omitido da solução nutritiva, e também o crescimento da planta no decorrer do período de omissão. No tempo correspondente ao aparecimento dos sintomas visuais da deficiência de manganês, os teores

foliares corresponderam a 18 mg kg^{-1} . A faixa de suficiência para a cultura do milho está localizada entre 20 e 150 mg kg^{-1} (Martinez et al., 1999), indicando que o teor observado no tempo do aparecimento dos sintomas visuais encontrou-se abaixo do limite inferior indicado, sendo, portanto, inadequado para a cultura.

Na Figura 7 é mostrada a produção de amido nas células da bainha do feixe vascular da folha do milho, sob diferentes tempos de omissão de manganês em solução nutritiva, em resposta ao teste PAS.

A constância dos resultados obtidos neste ensaio para os valores da razão F_v/F_m , até o décimo quinto dia, mostrou que a deficiência de manganês não afetou a eficiência quântica do FS II nos primeiros dias da omissão (Figura 8). A fase fotoquímica, possivelmente, não foi limitante para a fotossíntese nas condições experimentais, não justificando, portanto, as reduções na taxa de assimilação de CO_2 e na percentagem de amido observadas na Figura 7. Esses resultados estão de acordo com trabalho de Homann (1967), no qual sugere que a fase fotoquímica nem sempre é a principal responsável pela redução da fotossíntese sob deficiência de manganês.

O efeito primário da deficiência de manganês sobre a fotossíntese não está ainda totalmente compreendido, e os resultados obtidos por diversos autores têm sido bastante contraditórios. Segundo Romheld & Marschner (1991), a fotossíntese e a fotólise da água são primariamente afetadas pela deficiência de manganês e somente em deficiências severas haveria efeito sobre a estrutura de cloroplastos e a concentração de clorofila. Vários autores têm encontrado redução da atividade fotoquímica como consequência da deficiência de manganês (Anderson & Pyliotis, 1969; Terry & Ulrich; 1974). Outros autores atribuem o menor suprimento de CO_2 para os sítios de carboxilação como causa da redução da fotossíntese (Weiland et al., 1975; Ohki, 1985). Estudos recentes de microscopia eletrônica têm evidenciado reduções do número de unidades fotossintetizantes dos cloroplastos, sendo essa a causa primária da redução da fotossíntese em plantas deficientes em manganês (Henriques, 2003).

Quadro 9. Valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 (TA_{CO_2}), da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Mn e da percentagem de amido e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de manganês na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	
Razão F_v/F_m	0,802	0,778	0,809	0,802	0,806	0,806	0,676	0,602	
TA_{CO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	36,89	29,24	31,89	nd	29,79	nd	23,43	18,11	
Matéria seca (g planta ⁻¹)	4,73	4,09	4,84	3,54	4,43	4,10	4,25	1,46	
Teor de Mn (mg kg ⁻¹)	69,21	50,82	30,47	17,32	16,19	12,00	9,42	12,29	
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100$)	45,77	nd	39,99	nd	27,68	nd	nd	31,11	
Equações de regressão ^{1/}									
Razão F_v/F_m	$X \leq 15: \hat{y} = \bar{y} = 0,792$								
	$X \geq 15: \hat{y} = 1,261 - 0,0318 x$							$R^2 = 0,983$	
TA_{CO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$\hat{y} = 37,530 - 0,835 x$							$R^2 = 0,951$	
Matéria seca (g planta ⁻¹)	$\hat{y} = 4,467 - 0,0000000021 e^x$							$R^2 = 0,921$	
Teor de Mn (mg kg ⁻¹)	$\hat{y} = 71,876 - 19,838x^{0,5} + 1,259 x$							$R^2 = 0,948$	
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100$)	$y = 47,252 - 2,458x + 0,0929x^2$							$R^2 = 0,813$	

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.
nd: não determinado.

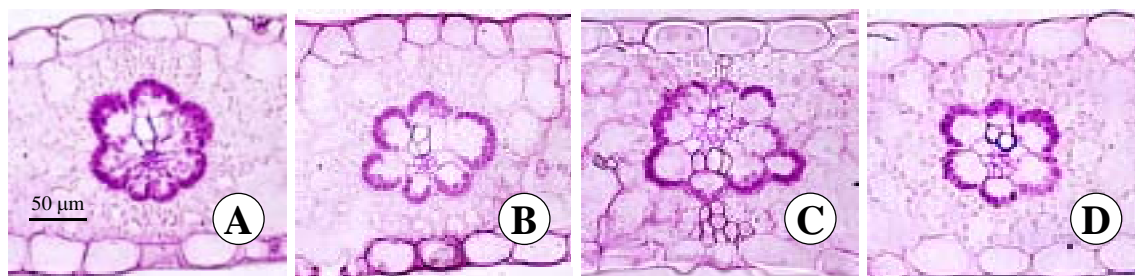


Figura 7. Detalhe da bainha do feixe vascular de folha de milho, submetida ao teste PAS em diferentes tempos de omissão de manganês em solução nutritiva. A: 0 dia; B: 6 dias; C: 12 dias; e D: 21 dias.

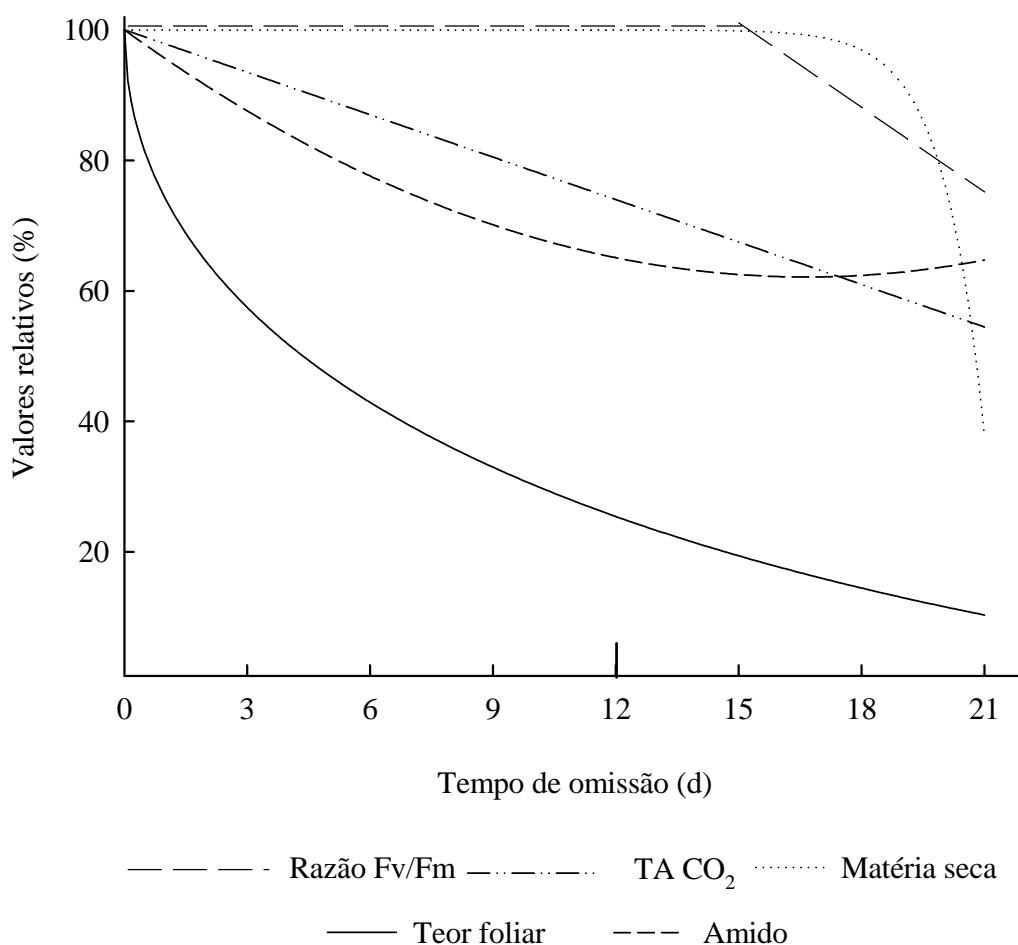


Figura 8. Valores relativos da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 ($TA\ CO_2$), da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Mn e da percentagem de amido, considerando o tempo de omissão de manganês na solução nutritiva. O traço (|) indica o tempo de aparecimento do sintoma visual da deficiência.

A concentração interna de CO_2 (c_i), a condutância estomática, a transpiração e a relação c_i/c_a são apresentadas no Quadro 10. Os resultados mostram um aumento de c_i e da relação c_i/c_a com o tempo de omissão de manganês em solução nutritiva, evidenciando acúmulo de CO_2 no mesofilo. Esse acúmulo, provavelmente, está relacionado com a capacidade reduzida de fixação do carbono em plantas deficientes em manganês.

Os dados obtidos neste trabalho diferem de resultados de outros autores, que atribuem limitações do suprimento de CO₂ como causa da redução da fotossíntese em plantas deficientes em manganês. As razões para essa resposta podem ser bastante complexas, e as limitações de informações, neste trabalho, principalmente relacionadas à atividade de enzimas envolvidas na fotossíntese, não permitem conclusões mais apuradas. No entanto, pode-se inferir que a participação específica do manganês na ativação de enzimas importantes do ciclo C4, como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, pode estar relacionada com a menor fixação do carbono observada.

A razão F_v/F_m foi reduzida somente a partir de 15 dias da omissão de manganês em solução nutritiva, apresentando, ao final do período experimental (21 dias), redução de 26% em relação à testemunha (Figura 8). Com o avanço da deficiência de manganês, a fase fotoquímica mostrou-se mais afetada, podendo então contribuir de forma mais expressiva para a redução da fotossíntese e da produção de matéria seca. Esta última foi afetada somente a partir dos 18 dias da omissão de manganês, com redução de 60% aos 21 dias (Figura 8).

Entre os nutrientes estudados, a deficiência de manganês foi a que promoveu as maiores alterações na proporção dos tecidos e nas medidas de distância da lâmina foliar do milho (Quadro 11). A deficiência de manganês reduziu a área total da seção transversal da lâmina foliar das plantas de milho. Esse decréscimo foi devido, principalmente, à diminuição da espessura da folha das plantas submetidas ao estresse nutricional (Quadro 11).

Características como percentagem de feixe vascular, de fibras e de espaços intercelulares apresentaram resposta curvilínea com o tempo de omissão de manganês em solução nutritiva. Foi observado um ligeiro aumento dessas características na fase inicial da omissão e reduções mais acentuadas com o avanço da deficiência nutricional. O mesmo comportamento também foi observado para a distância entre feixes

vasculares e densidade de estômatos na face abaxial da folha. Essas características, na sua maioria, estão diretamente associadas à maior compactação celular, devido à redução no tamanho da lâmina foliar em plantas deficientes em manganês.

As alterações nas proporções dos tecidos, bem como na redução da espessura da folha com a deficiência de manganês, podem ser importantes na redução da fotossíntese e, conseqüentemente, explicam a redução da produção de matéria seca observada na Figura 8. A tendência de maior compactação celular, resultante da menor expansão foliar, pode dificultar a difusão de CO₂ para os sítios de carboxilização no mesofilo foliar, afetando, portanto, a fotossíntese.

Não foram observadas alterações significativas nas percentagens do parênquima clorofiliano, da epiderme adaxial e abaxial ou da densidade de estômatos na face adaxial da lâmina foliar do milho com o tempo de omissão de manganês em solução nutritiva (Quadro 11).

Quadro 10. Valores médios da fluorescência mínima (F₀), da fluorescência máxima (F_m), da condutância estomática (g_s), da concentração interna de CO₂ (c_i), da transpiração (E) e da relação da concentração interna e a concentração ambiente de CO₂ (c_i/c_a), considerando o tempo de omissão de manganês na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)							
	0	3	6	9	12	15	18	21
F ₀ (μV)	415	438	399	379	411	386	540	643
F _m (μV)	2095	2012	2096	1911	2118	1984	1689	1706
g _s (mol m ⁻² s ⁻¹)	0,301	0,250	0,306	nd	0,323	nd	0,267	0,192
c _i (μmol mol ⁻¹)	127,3	145,0	169,6	nd	163,9	nd	193,6	200,4
E (mol m ⁻² s ⁻¹)	4,935	4,435	4,967	nd	3,785	nd	3,871	2,900
c _i /c _a	0,314	0,370	0,435	nd	0,425	nd	0,496	0,519

nd: não determinado.

Quadro 11. Valores médios das características anatômicas analisadas em seção transversal da lâmina foliar do milho e da densidade estomática e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de manganês na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)			
	0	6	12	21
Área total (μm^2)	234072	220448	216205	171744
Parênquima clorofiliano (%)	45,33	44,66	42,40	45,83
Epiderme da face adaxial (%)	15,21	13,10	13,87	15,66
Epiderme da face abaxial (%)	9,91	9,87	9,77	11,03
Bainha do feixe vascular (%)	11,54	11,26	12,86	11,18
Feixe vascular (%)	8,40	8,18	10,34	7,28
Esclerênquima (%)	1,45	1,57	1,67	1,27
Espaço intercelular (%)	8,15	11,36	9,09	7,76
Distância entre feixes (μm)	175	179	189	139
Espessura da lâmina foliar (μm)	190	181	176	141
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	35	33	36	33
Face abaxial	51	59	61	54
Equações de regressão ^{1/}				
Área total (μm^2)	$\hat{y} = 2,32 \times 10^5 - 2,43 \times 10^2 x - 1,22 \times 10^2 x^2$			$R^2 = 0,970$
Parênquima clorofiliano (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 44,56$			
Epiderme da face adaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 14,46$			
Epiderme da face abaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 10,15$			
Bainha do feixe vascular (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 11,71$			
Feixe vascular (%)	$\hat{y} = 8,008 + 0,306x - 0,0158x^2$			$R^2 = 0,542$
Esclerênquima (%)	$\hat{y} = 1,432 + 0,0473x - 0,00260x^2$			$R^2 = 0,951$
Espaço intercelular (%)	$\hat{y} = 8,606 + 0,368x - 0,0200x^2$			$R^2 = 0,619$
Distância entre feixes (μm)	$\hat{y} = 172,1 + 4,0354x - 0,264x^2$			$R^2 = 0,928$
Espessura da lâmina foliar (μm)	$\hat{y} = 194,4 - 2,285x$			$R^2 = 0,904$
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	$\hat{y} = \bar{y} = 34$			
Face abaxial	$\hat{y} = 51,40 + 1,635x - 0,0722x^2$			$R^2 = 0,999$

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.

4.4. Zinco

O surgimento dos sintomas visuais da deficiência de zinco ocorreu dezesseis dias após a omissão deste nutriente em solução nutritiva. As plantas deficientes apresentaram tamanho reduzido e folhas jovens com tons arroxeados nas bordas e na bainha.

Os valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 , da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Zn e da percentagem de amido, bem como as respectivas equações de regressões ajustadas, mostram o comportamento dessas características com o tempo de omissão de zinco na solução nutritiva (Quadro 12).

As equações de regressão apresentadas no Quadro 12 permitem estabelecer que o aparecimento dos sintomas visuais da deficiência de zinco foi acompanhado por redução de 75% no teor foliar, de 25% na produção de matéria seca, de 18% na taxa de assimilação de CO_2 , de 8% na percentagem de amido e de apenas 2% na razão F_v/F_m , em relação às plantas crescidas em solução nutritiva completa (0 dia de omissão).

Na Figura 9 é mostrada a produção de amido nas células da bainha do feixe vascular da folha do milho, sob diferentes tempos de omissão de zinco em solução nutritiva, em resposta ao teste PAS.

A omissão de zinco em solução nutritiva afetou de forma mais acentuada o teor foliar, seguida da produção de matéria seca e da taxa de assimilação de CO_2 . A razão F_v/F_m e a percentagem de amido foram as características menos afetadas pelo tempo de omissão de zinco (Figura 10).

A diminuição nos teores foliares de zinco refletiu a redução da absorção de zinco pelas raízes das plantas de milho, visto que o nutriente foi omitido da solução nutritiva, e também o crescimento da planta no decorrer do período de omissão.

As plantas com sintomas visuais de deficiência apresentaram teores foliares menores que 10 mg kg^{-1} , sendo a faixa de suficiência para a cultura do milho de 20 a 70 mg kg^{-1} (Martinez et al., 1999), indicando, portanto, uma condição de deficiência de zinco.

Quadro 12. Valores médios da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 (TA CO_2), da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Zn e da percentagem de amido e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de zinco na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)						
	0	2	6	10	14	18	22
Razão F_v/F_m	0,803	0,802	0,799	0,805	0,797	0,781	0,770
TA CO_2 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	31,30	30,64	31,04	29,09	25,55	24,69	22,93
Matéria seca (g planta ⁻¹)	4,47	5,71	5,10	4,22	3,92	3,86	3,04
Teor de Zn (mg kg ⁻¹)	40,33	33,99	22,01	19,07	11,48	9,20	7,60
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100$)	48,01	nd	43,09	nd	47,48	nd	40,51
Equações de regressão ^{1/}							
Razão F_v/F_m	$\hat{y} = 0,804 - 6,814x10^{-5} x^2$						$R^2 = 0,897$
TA CO_2 ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	$\hat{y} = 31,407 - 0,0858x^{1,5}$						$R^2 = 0,954$
Matéria seca (g planta ⁻¹)	$\hat{y} = 5,111 - 0,0196 x^{1,5}$						$R^2 = 0,764$
Teor de Zn (mg kg ⁻¹)	$\hat{y} = 39,605 - 2,938x + 0,0681 x^2$						$R^2 = 0,948$
Amido ($\mu\text{m}^2 \mu\text{m}^{-2} \times 100$)	$\hat{y} = 47,291 - 0,239x$						$R^2 = 0,407$

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.
nd: não determinado.

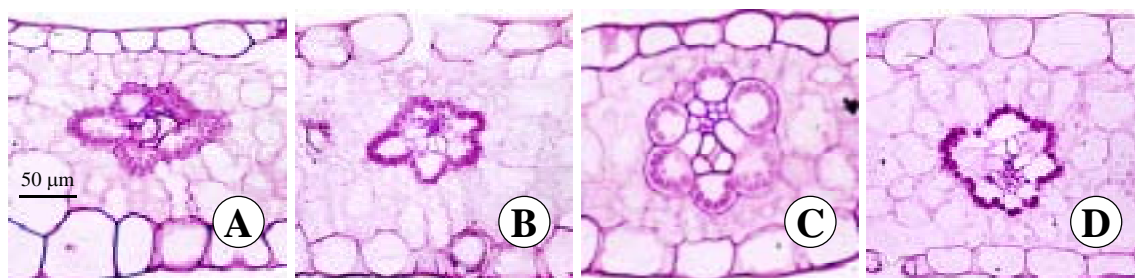


Figura 9. Detalhe da bainha do feixe vascular de folha de milho, submetida ao teste PAS em diferentes tempos de omissão de zinco em solução nutritiva. A: 0 dia; B: 6 dias; C: 14 dias; e D: 22 dias.

A razão F_v/F_m foi pouco afetada pela deficiência de zinco, não havendo comprometimento da eficiência quântica do FS II. Os valores observados da razão F_v/F_m no tempo zero e no 22º dia da omissão de zinco foram de 0,80 e 0,77, respectivamente. Essa diferença, apesar do respaldo estatístico, pode não ter significado fisiológico, uma vez que a planta dispõe de mecanismo de auto-regulação e de resistência ao estresse ambiente no presente caso, o estresse nutricional da deficiência de zinco.

A redução na taxa de assimilação de CO_2 , observada na Figura 10, possivelmente não está relacionada com a fase fotoquímica da fotossíntese. As funções fisiológicas do zinco, na síntese de proteínas e na ativação enzimática, podem estar associadas com a redução da taxa de assimilação de CO_2 .

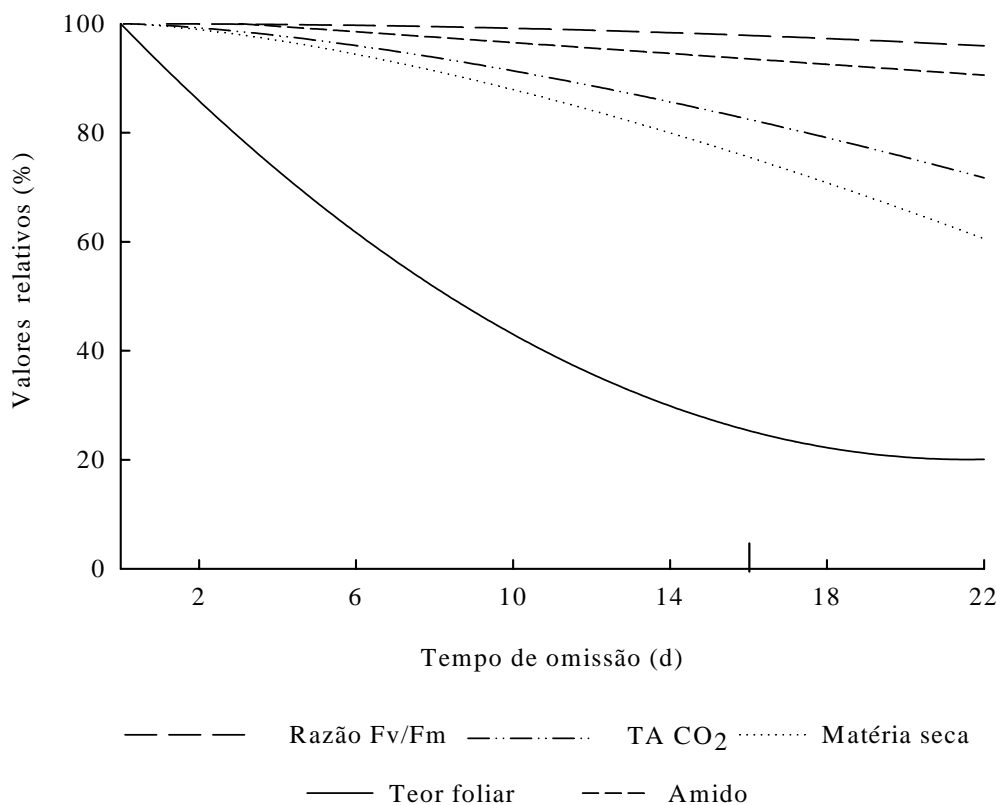


Figura 10. Valores relativos da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 (TA CO_2), da produção de matéria seca da parte aérea das plantas de milho, do teor foliar de Zn e da percentagem de amido, considerando o tempo de omissão de zinco na solução nutritiva. O traço (|) indica o tempo de aparecimento do sintoma visual da deficiência.

Os valores da condutância estomática, da concentração interna de CO₂, da transpiração e da relação concentração interna e ambiente de CO₂ são apresentados no Quadro 13. Os resultados mostram que a deficiência de zinco reduziu a condutância estomática e, conseqüentemente, a transpiração das plantas de milho. Essa redução pode estar relacionada com os menores valores da concentração interna de CO₂ e da relação c_i/c_a observadas (Quadro 13). O controle estomático em plantas deficientes em zinco pode ter reduzido o suprimento de CO₂ e ser um fator contribuinte para a redução da fotossíntese.

Quadro 13. Valores médios da fluorescência mínima (F₀), da fluorescência máxima (F_m), da condutância estomática (g_s), da concentração interna de CO₂ (c_i), da transpiração (E) e da relação entre a concentração interna e a concentração ambiente de CO₂ (c_i/c_a), considerando o tempo de omissão de zinco na solução nutritiva

Variável	Tempo de Omissão (d)						
	0	2	6	10	14	18	22
F ₀ (μV)	378	412	457	391	394	421	422
F _m (μV)	1938	2090	2271	2007	1945	1923	1847
g _s (mol m ⁻² s ⁻¹)	0,323	0,289	0,366	0,290	0,178	0,215	0,199
c _i (μmol mol ⁻¹)	158,7	142,0	179,0	156,9	118,9	142,9	134,9
E (mol m ⁻² s ⁻¹)	4,690	4,297	5,394	4,831	4,054	3,842	3,681
c _i /c _a	0,424	0,377	0,477	0,416	0,309	0,376	0,353

A participação do zinco em enzimas importantes na fixação do carbono, principalmente em plantas C4, como a anidrase carbônica, que catalisa a reação $\text{CO}_2 \rightarrow \text{HCO}_3^-$, pode, também, ser responsável pela redução da fotossíntese observada. Plantas C4, diferentemente das plantas C3, têm uma dependência maior pela anidrase carbônica, que por sua vez é requerida em alta atividade para deslocar o equilíbrio a favor de HCO_3^- , o substrato para PEP carboxilase. Trabalhos como o de Burnell & Hatch (1988) mostram que a deficiência de zinco diminui a atividade da anidrase carbônica, podendo ter efeito mais acentuado na taxa fotossintética em plantas C4 comparadas com plantas C3.

As características anatômicas que variaram com a deficiência de zinco foram a área total da seção transversal da lâmina foliar e as porcentagens de feixes vasculares e de espaços intercelulares (Quadro 14). A redução na área total e na porcentagem dos espaços intercelulares são conseqüências da diminuição do crescimento das plantas em resposta à deficiência de zinco.

A porcentagem de feixes vasculares apresentou redução linear com o tempo de omissão de zinco na solução nutritiva. Menor área de feixe vascular pode indicar redução no diâmetro dos elementos condutores do xilema e do floema em plantas deficientes em zinco e afetar o transporte de água e nutrientes nestes tecidos. No entanto, estudos mais detalhados, em condições de deficiência de zinco, bem como fluxo de água e nutrientes nestes tecidos, são necessários para conclusões mais apuradas.

As demais características das proporções dos tecidos, das medidas lineares e de superfície não apresentaram variações significativas com o tempo de omissão de zinco em solução nutritiva (Quadro 14).

Quadro 14. Valores médios das características anatômicas analisadas em seção transversal da lâmina foliar do milho e da densidade estomática e equações de regressão relacionando essas variáveis com o tempo de omissão de zinco na solução nutritiva

Variável	Tempo de omissão (d)			
	0	6	14	22
Área total (μm^2)	238790	229337	210669	216035
Parênquima clorofiliano (%)	45,43	42,88	45,56	44,97
Epiderme da face adaxial (%)	14,38	15,34	14,34	16,22
Epiderme da face abaxial (%)	10,70	10,79	9,06	11,01
Bainha do feixe vascular (%)	12,15	11,37	11,97	12,04
Feixe vascular (%)	8,69	8,81	7,27	6,96
Esclerênquima (%)	1,87	1,58	2,03	1,76
Espaço intercelular (%)	6,79	9,23	9,78	7,05
Distância entre feixes (μm)	171	177	170	149
Espessura da lâmina foliar (μm)	195	188	172	176
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	34	37	35	41
Face abaxial	56	62	58	64
Equações de regressão ^{1/}				
Área total (μm^2)	$\bar{y} = 2,355 \times 10^5 - 1,154 \times 10^3 x$			$R^2 = 0,751$
Parênquima clorofiliano (%)	$\bar{y} = \bar{y} = 44,71$			
Epiderme da face adaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 15,07$			
Epiderme da face abaxial (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 10,40$			
Bainha do feixe vascular (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 11,88$			
Feixe vascular (%)	$\hat{y} = 8,902 - 0,0925x$			$R^2 = 0,860$
Esclerênquima (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 1,81$			
Espaço intercelular (%)	$\hat{y} = 6,775 + 0,563x - 0,0250x^2$			$R^2 = 0,998$
Distância entre feixes (μm)	$\hat{y} = \bar{y} = 167$			
Espessura da lâmina foliar (μm)	$\bar{y} = \bar{y} = 183$			
Densidade estomática ($\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$)				
Face adaxial	$\bar{y} = \bar{y} = 37$			
Face abaxial	$\bar{y} = \bar{y} = 60$			

^{1/} Todos os coeficientes são significativos a 5% de probabilidade pelo teste t.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação dos micronutrientes em áreas de cultivo onde o solo é naturalmente pobre destes elementos é feita, principalmente, de forma preventiva, sem adoção de critérios técnicos precisos ou mesmo confiáveis. Os métodos atuais de diagnose do estado nutricional não são satisfatórios, o que, em muitos casos, tem dificultado o uso eficiente de micronutrientes na agricultura, podendo ter, como consequência, perdas de produtividade e qualidade ou agravantes ambientais pelo excesso da aplicação.

Os resultados obtidos nos ensaios com Fe, Cu, Mn e Zn mostraram que a deficiência nutricional destes nutrientes afetou características fisiológicas e anatômicas da planta, antes mesmo da manifestação visual da deficiência. No ensaio com Fe, por exemplo, mesmo com sintomas visuais surgindo cinco dias após a omissão, variáveis que se relacionam intimamente com o estado nutricional de ferro, como taxa de assimilação de CO₂, produção de amido e razão Fv/Fm, mostraram-se afetadas. Esses resultados revelam a necessidade de métodos que sejam capazes de diagnosticar a deficiência nutricional antes da manifestação dos sintomas visuais e, assim, minimizar as perdas de produtividade e qualidade.

As variáveis fisiológicas e anatômicas mostraram-se valiosas na caracterização da deficiência nutricional dos micronutrientes avaliados. A facilidade da obtenção dos dados relacionados ao estudo fisiológico possibilita a realização de trabalhos futuros, inclusive em campo, em condições de produção agrícola, podendo vir a contribuir grandemente nos estudos de nutrição de plantas. O estudo anatômico pode ser uma ferramenta adicional nos estudos de nutrição de plantas. A microscopia de luz mostrou-se auxiliar ao trabalho realizado, podendo contribuir ainda mais em trabalhos futuros. O uso da anatomia pode ir além, com adoção de microscopia eletrônica, possibilitando estudos mais detalhados da ultra-estrutura celular, principalmente de cloroplastos.

CONCLUSÕES

Os resultados permitiram as seguintes conclusões:

- As características fisiológicas são afetadas pela deficiência nutricional antes da manifestação visual dos sintomas.
- A deficiência de ferro afeta etapas iniciais da fase fotoquímica, principalmente a absorção e transferência de energia pelo complexo coletor.
- A anatomia foliar apresenta alterações com a deficiência nutricional, principalmente de características relacionadas à expansão da folha, sendo mais evidente para manganês e zinco.
- O teor de ferro na folha do milho é ineficiente no diagnóstico precoce do estado nutricional deste nutriente.
- A omissão dos micronutrientes em solução nutritiva levou à diminuição dos teores foliares na ordem de $Cu > Zn \cong Mn > Fe$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIA, A.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; REMY, R. & TREMOLIERES, A. Iron deficiency in pea leaves: Effect on lipid composition and synthesis. *Plant Physiol.*, 72:713-717, 1988.
- ABBOTT, A.J. Physiological effects of micronutrient deficiencies in isolated roots of *Lycopersicon esculentum*. *New Phytol.*, 66:419-437, 1967.
- ANDERSON, J.M. & PYLIOTIS, A.N. Studies with manganese-deficient pinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta.*, 189:280-293, 1969.
- AYALA, M.B. & SANDMANN, G. Activities of Cu-containing proteins in Cu- depleted pea leaves. *Physiol. Plant.*, 72:801-806, 1988.
- BAKER, N.R.; EAST, T.M. & LONG, S.P. Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays*. II Photochemical function of thylakoids *in vivo*. *J. Exp. Bot.*, 34:189-197, 1983.
- BJÖRKMAN, O. & DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 k among vascular plants of diverse origins. *Planta.*, 170:61-66, 1987.

- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R. & ÖQUIST, G.O. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C. & LONG, S.P., eds. Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual. London, Chapman & Hall, 1993. p.193-205.
- BOTRILL, D.E.; POSSINGHAM, J.V. & KRIEDEMAM, P.E. The effect of nutrients deficiencies on photosynthesis and respiration in spinach. *Plant Soil.*, 32:424-438, 1970.
- BROWN, J.C.; HOLMES, R.S. & TIFFIN, L.O. Hypothesis concerning iron chlorosis. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 23:231-234, 1959.
- BROWN, P.H., GRAHAM, R.D. & NICHOLAS, D.J.D. The effect of manganese and nitrate supply on the levels of phenolics and lignin in young wheat plants. *Plant Soil.*, 81:437-440, 1984.
- BURNELL, J.N. The biochemistry of manganese in plants. In GRAHAM RD, HANNAM J, UREN NC, eds, *Manganese in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1988. p.125-133.
- BURNELL, J.N. & HATCH, M.D. Low bundle sheath carbonic anhydrase is apparent by essential for effective C4 pathway operation. *Plant Physiol.*, 86:1252-1256, 1988.
- BUSLLER, W. Microscopic possibilities for diagnosis of trace element stress in plants. *J. Plant Nutr.*, 3:115-128, 1981.
- CAKMAK, I. & MARSCHNER, H. Enhanced superoxide radical production in roots of Zn-deficient plant. *J. Exp. Bot.*, 39:1449-1460, 1988.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. & BANGERTH, F. Effect of zinc status on growth, protein metabolism and levels of indol-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.*, 40:405-412, 1989.
- CAMARGO, P.N. & SILVA, O. Manual de adubação foliar. São Paulo: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1990. 256p.
- CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Técnica de inclusão de material vegetal em historresina. In: ENCONTRO REGIONAL DE ANATOMISTAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Rio Claro, UNESP, 1995. 7p.

- CASIMIRO, A.; BARROSO, J. & PAIS, M.S. Effect of copper deficiency on photosynthetic electron transport in wheat plants. *Physiol. Plant.*, 79:459-464, 1990.
- DAVIS, T.; JOLLEY, V.; WALSER, R.; BROWN, J. & BLAYLOCK, A. Net photosynthesis of Fe-efficient and Fe-inefficient soybean cultivars grown under varying iron levels. *J. Plant Nutr.*, 9:671-681, 1986.
- DECHEN, A.R.; HAAG, H.P. & CARMELLO, Q.A.C. Funções dos micronutrientes nas plantas. In: FERREIRA, M.E. & CRUZ, M.C.P., eds. *Micronutrientes na agricultura*. Piracicaba, POTAFOS/CNPq, 1991. p.65-78.
- DICKISON, W.C. *Integrative plant anatomy*. California, Academic Press, 2000. 533p.
- EPSTEIN, E. Mineral metabolism. In: BONNER, J. & VARNER, J.E., eds. *Plant biochemistry*. London, Academic Press, 1965. p.436-466.
- FAQUIN, V. *Nutrição mineral de plantas*. UFLA/FAEPE, Lavras, 1997. 227p.
- GALRÃO, E.Z. & MESQUITA FILHO, M.V. Efeito de micronutrientes na produção e composição química do arroz e do milho em solo de cerrado. *R. Bras. Ci. Solo*, 5:72-75, 1981.
- HENRIQUES, F.S. Effects of copper deficiency on the photosynthesis apparatus of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.*, 135:453-458, 1989.
- HENRIQUES, F.S. Gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence kinetics and lipid peroxidation of pecan leaves with varying manganese concentrations. *Plant Sci.*, 165:239-244, 2003.
- HIRADATE, S. & INOUE, K. Interaction of mugineic acid with iron (hydr) oxides: sulfate and phosphate influences. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 62:159-165, 1998.
- HOMANN, P. Studies on the manganese of chloroplast suspensions. *Plant Physiol.*, 42:997-1007, 1967.
- HUE, N.V. & NAKAMURA, E.T. Iron chlorosis in macadamia as affected by phosphate-iron interactions. *J. Plant Nutr.*, 11:1635-1648, 1988.

- KOCK, P.C. Iron nutrition of plants at high pH. *Soil Sci.*, 79:167-175, 1955.
- KRAUSE, G.H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42:313-349, 1991.
- LANDSBERG, E.C. Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response mechanisms of *Capsicum annuum* L. *Plant Physiol.*, 82:511-517, 1986.
- LONERAGAN, J.F. Distribution and movement of copper in plants. In: LONERAGAN, J.F.; ROBSON, A.D. & GRAHAM, R.D., eds. *Copper in soil and plants*. Sydney, Australia, Academic Press, 1981. p.165-188.
- LONG, S.P. & HÄLLGREN, J.E. Measurement of CO₂ assimilation by plants in the field and laboratory. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C. & LONG, S.P., eds. *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual*. London, Chapman & Hall, 1993, p.129-167.
- MAIA, V. *Técnica histológica*. São Paulo: Atheneu, 1979. 298p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C. & OLIVEIRA, S.A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e Aplicações*. 2.ed. Piracicaba, POTAFOS, 1997. 319p.
- MARSCHNER, H. & CAKMAK, I. High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc, potassium, and magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *J. Plant Physiol.*, 134:308-315, 1989.
- MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2.ed. San Diego, Academic Press, 1995. 889p.
- MARTINEZ, H.E.P.; CARVALHO, J.G. & SOUZA, R.B. Diagnose foliar. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G. & ALVAREZ V., V.H., eds. *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais*. 5.ed. Viçosa, Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p.143-168.
- MARZIAH, M. & LAM, C.H. Polyphenol oxidase from soybean (*Glycine max*, v. Palmetto) and its response to copper and other micronutrients. *J. Plant Nutr.*, 10:2089-2094, 1987.

- MENARD, L.N. Efeitos do fósforo e alguns micronutrientes no crescimento e composição química do cafeeiro (*Coffea arabica* L. var. Caturra, K.M.G.) cultivado em solução nutritiva. Piracicaba, USP/ESALQ, 1956. 66p. (Tese de Doutorado).
- MIZUMO, N.; INAZO, O. & KAMADA, K. Characteristics of concentrations of copper, iron and carbohydrates in copper deficient wheat plants. In: SCAIFE, A., ed. Proc. 9th. Int. Plant Nutr. Colloq., Warwick, England. 22-27 aug. Commonwealth Agric. Bur., Farnham House, Slough, England, 1982. p.396-399.
- MORALES, F.; ABADIA, A. & ABADIA, J. Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.*, 97:886-893, 1991.
- NEUMANN, K.H. & STEWARD, F.C. Investigation on the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota*. I. Effects of iron, molybdenum and manganese deficiency on growth. *Planta*, 81:333-350, 1968.
- NISHIO, J.N.; TAYLOR, S.E. & TERRY, N. Changes in thylakoid galactolipids and proteins during iron nutrition-mediated chloroplast development. *Plant Physiol.*, 77:705-711, 1985.
- OBATA, H. & UMEBAYSHI, M. Effect of zinc deficiency on protein synthesis in cultured tobacco plant cells. *Soil. Sci. Plant. Nutr.*, 34:351-357, 1988.
- O'BRIEN, T.P. & M.E. MCCULLY. The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods. Termarcarphi Pty Ltd., Melbourne, Australia. 1981. 357p.
- OHKI, K. Manganese deficiency and toxicity effects on photosynthesis, chlorophyll and transpiration in wheat. *Crop Sci.*, 25:187-191, 1985.
- PÉREZ, C.; VAL, J. & MONGE, E. Effects of iron deficiency on photosynthetic structures in peach (*Prunus persica* L. Batsch) leaves. In: ABADÍA, J., ed. Iron Nutrition in Soils and Plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1995. p.183-189.
- PESTANA, M.; VAENNES, A. & ARAÚJO FARIA, E. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Food Agric. Environ.*, 1:46-51, 2003.

- PRADO, C.H.B.A. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos, Rima, 2000.
Okophysiology der pflanzen. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart,
Germany, 1994. 531p.
- PUSHNIK, J.C. & MILLER, G.W. Iron regulation of chloroplast
photosynthetic function. Mediation of PS I development. *J. Plant Nutr.*,
12:407-421, 1989.
- ROBSON, A.D. HARTLEY, R.D. & JARVIS, S.C. Effect of copper
deficiency on phenolic and other constituents of wheat cell walls. *New
Phytol.*, 89:361-371, 1982.
- RÖMHELD, V. & MARSCHNER, H. Function of micronutrients in plants.
In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R.; SCHUMAN, L.M. & WELCH, R.M.,
eds. *Micronutrients in agriculture*. 2.ed. Madison, Soil Science Society of
America., 1991. p.297-328.
- RUIZ, H.A. Relações molares de macronutrientes em tecido vegetal como
base para a formulação de soluções nutritivas. *R. Ceres.*, 44:533-546,
1997.
- SCHMIDT, W. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake
in plants. *New Phytol.*, 141:1-26, 1999.
- SOLOIMAN, D. & WU, F.Y.H. Preparation and characterization of various
Escherichia coli RNA polymerases containing one or two intrinsic metal
ions. *Biochem.*, 24:5079-5082, 1985.
- TAYLOR, S.E. & TERR, Y.N. Variation in photosynthetic electron transport
capacity and its effect on the light modulation of ribulose biphosphate
carboxylase. *Photosynth. Res.*, 8:249-256, 1986.
- TERRY, N. & ABADIA, J. Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.*,
9:609-646, 1986.
- TERRY, N. & ULRICH, A. Photosynthetic and respiratory CO₂ exchange of
sugar beet as influenced by manganese deficiency, *Crop Sci.*, 14:502-
504, 1974.
- TERRY, N. Limiting factors in photosynthesis. IV. Iron stress mediated
changes in light harvesting and electron transport capacity and its effects
on photosynthesis in vivo. *Plant Physiol.*, 71:855-860, 1983.

- VAN ARENDONK, J.J. C.M.; NIEMANN, G.J.; BOON, J.J. & LAMBERS, H. Effects of nitrogen supply on the anatomy and chemical composition of leaves of four grass species belonging to the genus *Poa*, as determined by image-processing analysis and pyrolysis-mass spectrometry. *Plant Cell Environ.*, 20:881-897, 1997.
- WEILAND, T.; NOBLE, R. & CRANG, R. Photosynthetic and chloroplast ultrastructural consequences of manganese deficiency in soybean. *Am. J. Bot.*, 62:501-508, 1975.
- WELCH, R.W. Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 14:49-82, 1995.
- WELKIE, G.W. & Miller, G.W. Plant iron uptake physiology by nonsiderophore systems. In: BARTON, L.L. & HEMMING, B.C., eds. *Iron Chelation in plants and soil microorganisms*. San Diego, USA, Academic Press, 1993. p.345-369.
- WILLIAMS, R.J.P. An introduction to the biochemistry of zinc. In: MILLS, C.F., ed. *Zinc in human biology*. London, Springer Verlag, 1989. p.15-32.
- WINDER, T.L. & NISHIO, J. Early iron deficiency stress response in leaves of sugar beet. *Plant Physiol.*, 108:1487-1494, 1995.
- YU, Q. & RENGEL, Z. Micronutrients deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leafed lupines. *Ann. Bot.*, 83:175-182, 1999.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A. Análise de variância da razão F_v/F_m , da taxa de assimilação de CO_2 , da altura de plantas (AP), para Fe, da matéria seca da parte aérea, para Cu, Mn e Zn, do teor de nutrientes na folha e da percentagem de amido, considerando o tempo de omissão de ferro, cobre, manganês ou zinco em solução nutritiva

FV	Fe		Cu		Mn		Zn	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Razão F_v/F_m								
Blocos	2	0,0175	2	0,000349	2	0,00423	2	0,00021
Tempo	8	0,5986**	6	0,002538	7	0,01753**	6	0,00053**
Resíduo	16	0,0076	11	0,004225	13	0,003129	12	0,000095
CV (%)		14,39		2,55		7,34		1,29
Taxa de assimilação de CO_2								
Blocos	2	0,924	2	35,500	5	69,645	2	86,918**
Tempo	7	18,417	4	216,988**	2	130,364	6	35,414**
Resíduo	14	15,239	8	15,021	10	51,257	12	3,863
CV (%)		16,34		14,92		25,37		7,05
— AP —			— Matéria seca da parte aérea —					
Blocos	3	14,041	6	0,810	3	1,949	3	0,508
Tempo	8	36,466*	3	0,914	7	4,647*	6	3,058**
Resíduo	24	13,148	18	0,539	21	1,369	18	0,536
CV (%)		6,54		17,44		29,76		16,91
Teor foliar								
Blocos	3	664,73*	6	0,820	3	20,38	3	29,79
Tempo	6	495,10*	3	8,675*	7	1898,17*	6	636,57**
Resíduo	16	150,58	18	0,374	21	40,38	18	7,07
CV (%)		15,45		70,20		23,35		12,96
Percentagem de amido								
Blocos	3	12,51	3	3,96	3	29,68	3	28,22*
Tempo	3	460,62**	3	908,95**	3	272,72**	3	51,78**
Resíduo	8	15,902	9	4,849	9	14,125	9	6,352
CV (%)		9,11		5,48		10,40		5,63

* e **: Significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 2A. Análise de variância da fluorescência mínima (F_0), da fluorescência máxima (F_m), da condutância estomática (g_s), da concentração interna de CO_2 (c_i), da transpiração (E) e da concentração interna e a concentração ambiente de CO_2 (c_i/c_a), considerando o tempo de omissão de ferro, cobre, manganês ou zinco em solução nutritiva

FV	Fe		Cu		Mn		Zn	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Fluorescência mínima (F_0)								
Blocos	2	286	2	39,7	2	1559,5	2	62226,0
Tempo	8	161865*	6	556,5	7	24269,5**	6	1966,9
Resíduo	16	27874	11	704,9	13	2003,3	12	2545,8
CV (%)		20,14		6,17		9,97		12,31
Fluorescência máxima (F_m)								
Blocos	2	288603	2	13569	2	46460	2	224024
Tempo	8	252562*	6	18176	7	86391	6	55514
Resíduo	16	88890	11	39326	13	45256	12	59466
CV (%)		13,37		10,62		10,87		12,23
Condutância estomática (g_s)								
Blocos	2	0,000648	2	0,00349	2	0,0047	2	0,0076
Tempo	8	0,000475	4	0,0222*	5	0,0063	6	0,0109*
Resíduo	16	0,000902	8	0,0035	8	0,0139	10	0,0025
CV (%)		26,95		22,05		43,81		18,96
Concentração interna de CO_2 (c_i)								
Blocos	2	236,4	2	527,3	2	882,0	2	309,3
Tempo	8	711,4	4	496,6	5	1885,9	6	910,3
Resíduo	16	523,07	8	281,4	8	2913,3	10	977,1
CV (%)		10,65		9,79		31,947		21,19
Taxa de transpiração (E)								
Blocos	2	1,5397*	2	3,001**	2	3,515	2	1,839*
Tempo	8	0,0535	4	1,685*	5	1,392	6	1,314*
Resíduo	16	0,0312	8	0,321	8	1,977	10	0,420
CV (%)		10,03		17,28		34,73		15,13
c_i/c_a								
Blocos	2	0,000755	2	0,0032	2	0,0072	2	0,0018
Tempo	8	0,0452	4	0,0037	5	0,0141	6	0,0070
Resíduo	16	0,0697	8	0,0019	8	0,0195	12	0,0072
CV (%)		10,05		9,55		32,31		21,83

* e **: Significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 3A. Análise de variância da área total da seção transversal da lamina foliar, das percentagens de parênquima clorofiliano, de epiderme da face adaxial e abaxial, de bainha do feixe vascular e de feixe vascular, considerando o tempo de omissão de ferro, cobre, manganês ou zinco em solução nutritiva

FV	Fe		Cu		Mn		Zn	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
	Área total							
Blocos	3	4,25 x 10 ⁸	3	4,87 x 10 ⁸	3	3,03 x 10 ⁸	3	9,54 x 10 ⁸
Tempo	3	9,00 x 10 ⁸	3	1,27 x 10 ⁸	3	2,91 x 10 ⁹	3	6,00 x 10 ⁸
Resíduo	8	7,05 x 10 ⁸	9	2,92 x 10 ⁸	9	1,18 x 10 ⁹	9	1,38 x 10 ⁹
CV (%)		12,33		7,43		16,35		16,54
	Percentagem de parênquima clorofiliano							
Blocos	3	29,07	3	29,76	3	1,67	3	12,34
Tempo	3	16,90	3	16,17	3	9,15	3	6,21
Resíduo	8	11,02	9	28,71	9	13,04	9	8,90
CV (%)		7,71		14,08		8,11		6,67
	Percentagem de epiderme da face adaxial							
Blocos	3	2,299	3	0,249	3	2,320	3	4,185
Tempo	3	8,175*	3	0,984	3	5,593	3	3,212
Resíduo	8	1,920	9	1,724	9	7,208	9	2,764
CV (%)		7,70		8,86		18,57		11,03
	Percentagem de epiderme da face abaxial							
Blocos	3	0,138	3	1,008	3	2,341	3	1,303
Tempo	3	0,244	3	0,784	3	1,399	3	3,225*
Resíduo	8	2,421	9	1,234	9	1,247	9	0,540
CV (%)		12,47		11,03		11,01		7,08
	Percentagem de bainha do feixe vascular							
Blocos	3	4,967	3	0,571	3	2,452	3	1,991
Tempo	3	4,272	3	1,331	3	2,461	3	0,488
Resíduo	8	3,570	9	0,877	9	2,045	9	1,167
CV (%)		15,31		7,47		12,21		9,10
	Percentagem de feixe vascular							
Blocos	3	1,971	3	1,086	3	1,506	3	1,825
Tempo	3	3,620	3	0,369	3	6,626**	3	3,645*
Resíduo	8	1,162	9	0,413	9	0,507	9	0,862
CV (%)		16,84		6,86		8,33		11,71

* e **: Significativo a 5 e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Quadro 4A. Análise de variância das percentagens de esclerênquima e de espaço intercelular, da distância entre feixes, da espessura da lâmina foliar e da densidade estomática na face adaxial e na face abaxial, considerando o tempo de omissão de ferro, cobre, manganês ou zinco em solução nutritiva

FV	Fe		Cu		Mn		Zn	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Percentagem de esclerênquima								
Blocos	3	0,1790*	3	0,24404	3	0,0589	3	0,1110
Tempo	3	0,2449*	3	0,02875	3	0,1181	3	0,1434
Resíduo	8	0,0223	9	0,1338	9	0,0450	9	0,1432
CV (%)		11,04		19,67		14,25		20,90
Percentagem de espaço intercelular								
Blocos	3	3,554	3	20,478	3	3,474	3	2,577
Tempo	3	8,907*	3	22,423	3	10,424	3	9,169
Resíduo	8	1,142	9	29,755	9	3,396	9	6,073
CV (%)		16,85		41,11		20,27		30,02
Distância entre feixes								
Blocos	3	50,12	3	166,20	3	788,47	3	307,99
Tempo	3	186,92	3	238,75	3	1909,41	3	601,80
Resíduo	8	176,37	9	274,72	9	537,54	9	589,15
CV (%)		7,35		10,11		13,61		14,57
Espessura da lâmina foliar								
Blocos	3	66,70	3	202,36	3	260,54	3	627,20
Tempo	3	486,85	3	12,85	3	1854,23	3	438,91
Resíduo	8	416,08	9	224,45	9	962,91	9	806,67
CV (%)		11,62		8,04		18,03		15,53
Densidade estomática na face adaxial								
Blocos	3	4,857	3	8,347	3	27,516	3	22,986
Tempo	3	38,144	3	0,647	3	11,251	3	36,498*
Resíduo	8	22,684	9	54,902	9	11,078	9	7,966
CV (%)		14,38		7,34				7,67
Densidade estomática na face abaxial								
Blocos	3	85,883	3	41,327	3	30,350	3	9,392
Tempo	3	164,487	3	80,267	3	71,710*	3	56,722
Resíduo	8	292,729	9	83,062	9	13,063	9	26,263
CV (%)		12,24		5,736		6,440		8,544

* : Significativo a 5% pelo teste F.

Quadro 5A. Teores de macro e micronutrientes na folha do milho, considerando o tempo de omissão de ferro em solução nutritiva

Tempo	Ca	Mg	K	P	S	Zn	Cu	Mn	B
d	— dag kg ⁻¹ —					— mg kg ⁻¹ —			
0	0,56	0,19	1,29	0,97	0,32	72,79	6,70	182,69	41,24
2	0,43	0,18	1,84	1,00	0,31	78,94	11,20	151,63	51,09
3	0,51	0,18	1,03	0,93	0,31	85,22	9,51	164,69	31,31
4	0,50	0,15	1,29	0,94	0,32	102,51	10,41	167,25	38,47
5	0,50	0,17	1,22	1,00	0,35	110,49	13,21	173,91	44,92
7	0,41	0,17	1,20	0,96	0,35	120,07	10,72	169,99	43,79
8	0,48	0,16	1,03	1,06	0,37	144,15	12,40	194,90	41,10
9	0,42	0,15	0,80	1,00	0,34	132,81	10,46	186,71	42,33
10	0,55	0,18	1,53	1,15	0,40	179,12	13,12	261,44	66,99

Quadro 6A. Teores de macro e micronutrientes na folha do milho, considerando o tempo de omissão de cobre em solução nutritiva

Tempo	Ca	Mg	K	P	S	Zn	Mn	Fe	B
d	— dag kg ⁻¹ —					— mg kg ⁻¹ —			
0	0,22	0,15	1,66	0,75	0,24	36,34	79,84	80,39	42,67
2	0,19	0,14	1,40	0,69	0,23	35,33	69,54	79,04	39,59
6	0,18	0,14	1,65	0,70	0,24	38,30	68,32	104,91	43,90
10	0,23	0,16	1,89	1,13	0,25	47,35	80,51	110,52	45,79
14	0,25	0,16	1,89	1,17	0,26	52,23	92,08	105,62	41,60
18	0,24	0,18	2,05	1,22	0,27	53,66	101,21	126,92	45,51
22	0,20	0,17	1,82	1,18	0,27	46,19	84,22	110,26	41,84

Quadro 7A. Teores de macro e micronutrientes na folha do milho, considerando o tempo de omissão de manganês em solução nutritiva

Tempo	Ca	Mg	K	P	S	Zn	Cu	Fe	B
d	— dag kg ⁻¹ —					— mg kg ⁻¹ —			
0	0,23	0,14	1,56	0,70	0,23	36,29	6,59	84,65	36,12
3	0,17	0,14	1,14	0,71	0,24	42,08	4,82	86,77	44,92
6	0,21	0,14	1,65	0,68	0,23	34,23	3,95	100,19	34,29
9	0,19	0,14	1,72	0,79	0,22	35,78	1,46	95,83	42,77
12	0,21	0,15	1,63	0,78	0,22	42,92	2,82	96,10	44,13
15	0,18	0,13	1,44	0,66	0,21	28,49	1,05	81,37	39,59
18	0,16	0,13	1,72	0,67	0,20	29,48	1,44	104,05	41,90
21	0,21	0,16	2,09	0,80	0,24	45,39	3,29	104,80	58,79

Quadro 8A. Teores de macro e micronutrientes na folha do milho, considerando o tempo de omissão de zinco em solução nutritiva

Tempo	Ca	Mg	K	P	S	Cu	Mn	Fe	B
d	— dag kg ⁻¹ —					— mg kg ⁻¹ —			
0	0,22	0,15	1,55	0,75	0,25	3,95	74,80	98,18	44,79
2	0,19	0,14	1,59	0,73	0,24	4,14	73,45	101,58	40,66
6	0,19	0,13	1,66	0,65	0,22	2,81	64,63	104,80	32,65
10	0,17	0,13	1,33	0,68	0,23	3,55	62,53	105,52	40,77
14	0,43	0,21	2,12	1,20	0,28	5,57	150,38	159,11	39,62
18	0,63	0,27	1,83	1,47	0,31	6,19	185,19	185,57	42,44
22	0,44	0,22	1,77	1,41	0,27	7,93	169,57	127,60	45,01