UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

RAPHAEL FLORENCIO GARRONE

Interação cálcio e boro na fixação biológica de nitrogênio na soja: avaliação morfológica, ultraestrutural e da atividade da nitrogenase

Piracicaba
2015

Raphael Florencio Garrone

Interação cálcio e boro na fixação biológica de nitrogênio na soja: avaliação morfológica, ultraestrutural e da atividade da nitrogenase

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

Piracicaba
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Garrone, Raphael Florencio

Interação cálcio e boro na fixação biológica de nitrogênio na soja: avaliação morfológica, ultraestrutural e da atividade da nitrogenase / Raphael Florencio Garrone; orientador José Lavres Junior. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

97 p. : il.

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

1. Microscopia eletrônica 2. Morfologia vegetal 3. Nutrição vegetal 4. Raiz I. Título

CDU 631.811 : 633.34

À minha família, em especial aos meus pais, Gilberto Martins Garrone e Elizabeth Florencio Garrone, à minha namorada, e aos meus amigos, pelo constante apoio, momentos de descontração, dedicação e incentivo.

OFEREÇO E DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pela oportunidade de estudo, e por fornecer a infraestrutura necessária para a realização da respectiva pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Ref. Proc. 2013/18305-2), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. José Lavres Junior, pela amizade, orientação, ensinamentos, dedicação e confiança no meu trabalho.

Em especial à Bióloga Cleusa Pereira Cabral, pela amizade, conselhos e ajuda nas análises laboratoriais.

À Prof. Dra. Adriana Pinheiro Martinelli, pela colaboração e conselhos nas análises de microscopia.

À Mônica Lanzoni Rossi, do Laboratório de Histopatologia Vegetal, pela imensa ajuda e dedicação nas análises de microscopia.

À Aparecida de Fátima Patreze, do Laboratório de Química Analítica, pela paciência e auxílio nas análises químicas.

Ao Prof. Dr. Angelo Pedro Jacomino, por oferecer a infraestrutura do Laboratório de Pós-Colheita de Plantas Hortícolas da ESALQ/USP.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA pelo companheirismo e ajuda: Aline Grella de Campos, Bruno José Zanchim, Dra. Cristiane Prezotto Silveira, Elcio Ferreira dos Santos, Felipe Furlan, Fernando Giovannetti de Macedo, Flávio Henrique Silveira Rabêlo, Joaquim José Frazão.

Em especial aos amigos da república Perdição pela amizade, momentos de descontração, ensinamentos e convivência ao longo destes anos.

À todos os funcionários do CENA, pela colaboração sempre que preciso.

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

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

GARRONE, R. F. **Interação cálcio e boro na fixação biológica de nitrogênio na soja: avaliação morfológica, ultraestrutural e da atividade da nitrogenase**. 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Destacam-se as semelhanças entre os nutrientes boro (B) e cálcio (Ca) quanto às formas e as funções que eles exercem nos vegetais. Partindo do princípio que a interação Ca – B afeta os atributos morfológicos, ultraestruturais e bioquímicos, bem como a nodulação nas plantas leguminosas, objetivou-se com esse estudo determinar a relação Ca:B mais adequada para a produção de grãos e matéria seca de soja, bem como avaliar os efeitos da interação B e Ca na fixação biológica de N_2 (atividade da nitrogenase –N-ase [EC 1.18.6.1]), na morfologia de raízes (comprimento e superfície total), anatomia de raízes (nódulos) e de folhas, assim como as avaliações ultraestruturais dos mesófilos foliares, rendimento do teor de óleo nos grãos das plantas de soja (cultivar BRS 284), crescidas em solução nutritiva. Foram avaliadas ainda a produção de massa seca das plantas, as concentrações e os acúmulos de Ca, B, Mg, K e N na parte aérea e raízes. Foi empregado um esquema fatorial 5^2 incompleto, perfazendo treze combinações de doses de Ca (mmol L^{-1}) e B (µmol L^{-1}), as quais foram distribuídas segundo o delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições. As maiores atividades da N-ase foram obtidas com as maiores doses de Ca e B (7,25 mmol L^{-1} de Ca e 50 µmol L^{-1} de B). A menor dose de Ca resultou na inibição da N-ase em cerca de 90%. Os maiores comprimentos e superfícies totais de raízes foram obtidos na combinação de doses de 7,25Ca e 12,5B, enquanto que para a combinação das menores doses de Ca e B observou-se uma redução de cerca de 70% e 60% para comprimento e superficial de raízes, respectivamente. A maior produção de biomassa seca das plantas e de grãos, os maiores acúmulos de Ca, B, N, K e Mg nas folhas e o maior rendimento de óleo foram obtidos com o fornecimento de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e 12,5 µmol L^{-1} de B, observando-se relação Ca:B na solução nutritiva próxima de 350:1 e nas folhas de 700:1. O teor de óleo nos grãos incrementou cerca de 20% com o aumento das doses de B de 3,125 para 50 µmol L^{-1}. O número de camadas de células do córtex dos nódulos aumentou com o incremento das concentrações de Ca e B na solução. Observou-se ruptura da membrana dos cloroplastos no mesófilo foliar e elevado número de bactérias fixadoras de N_2 penetrando o interior dos tecidos nodulares quando as plantas foram submetidas ao menor suprimento de Ca e maior de B. A combinação da menor dose de B junto a maior dose de Ca provocou ruptura da parede celular e o espessamento da lamela média das folhas. O aumento no fornecimento de Ca ameniza os efeitos negativos do baixo suprimento de B na produção de biomassa das plantas e de grãos, no comprimento e superfície de raízes e na atividade da nitrogenase. A relação Ca:B, tanto na solução, quanto no tecido vegetal, não pode ser entendida como parâmetro exclusivo de equilíbrio nutricional.

Palavras-chaves: Morfologia de raiz. Superfície de resposta. Acúmulo de massa seca. Solução nutritiva. Microscopia eletrônica de transmissão. Teor de óleo.

ABSTRACT

GARRONE, R. F. **Calcium and boron interaction on biological nitrogen fixation in soybean: morphological, ultrastructural and nitrogenase activity evaluations**. 2015. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Regarding mineral nutrition of plants, we highlight the similarities between nutrients boron (B) and calcium (Ca) in relation to similar functions they play in plant physiology. However the mechanisms involved in the interaction between these nutrients are not very well known. Assuming that the interaction Ca - B affects the morphological, ultrastructural and biochemical attributes, as well as the nodulation in leguminous plants, the objective with this study was to determine the optimum Ca:B ratio, in the solution and plan tissue as well for dry matter yield of grain and dry matter of soybean, and to evaluate the effects of B - Ca interaction in the biological N_2 fixation (nitrogenase activity – N-ase [EC 1.18.6.1]), root morphology (total root length and total root surface area), root anatomy (nodules), as well as in the ultrastructural evaluation of foliar mesophilic, and yield of oil content of soybean (cultivar BRS 284), grown in nutrient solution. Dry matter yield of plants, Ca-concentrations and amounts of Ca, B, Mg, K and N in shoots and roots were also evaluated. The experimental arrange used was an incomplete 5^2 factorial, making thirteen combinations of Ca (mmol L^{-1}) and B (µmol L^{-1}) rates, which were set in a randomized block design, with four replications. The highest N-ase activity was obtained with the highest doses of Ca and B (7,25 mmol L^{-1} of Ca and 50 µmol L^{-1} of B). The lowest Ca rate resulted in approximately 90% inhibition of N-ase. The highest total root length and total root surface area were obtained with combination of 7,25Ca and 12,5B rates, whereas the combination of the lowest Ca and B rates caused reduction of approximately 70% and 60% on root length and area, respectively. The highest dry matter and grain yield, highest accumulations of Ca, B, N, K and Mg on the leaves and the highest oil content in grains were obtained when 4,25 mmol L^{-1} of Ca and 12,5 µmol L^{-1} of B were supplied, resulting in a Ca:B ratio of approximately 350:1 on nutrient solution and 700:1 on leaves. The oil content in grains raised about 20% increasing B rates from 3,125 to 50 µmol L^{-1}. The number of cell layers of nodule cortex raised with increasing Ca and B levels in the solution. It was observed membrane rupture of chloroplasts in leaf mesophyll and high number of N_2-fixing bacteria entering the interior of nodular tissues when plants were supplied with the lowest Ca rate (1,75Ca) and the highest B (50B). The combination of the lowest B rate (3,125B) and the highest Ca rate (7,25) caused cell wall rupture and thickening of the middle lamella on the leaves. The increase of Ca levels on the solution mitigates the negative effects of the low B supply in plant biomass and grain yield, in root length and root surface area and in N-ase activity. The Ca:B ratio either in the solution or plant tissue, cannot be understood as an exclusive parameter of nutritional status.

Key words: Root morphology. Response surface. Dry matter accumulation. Nutrient solution. Transmission electron microscopy. Oil content.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....17

2. REVISÃO DE LITERATURA 19

2.1 Caracterização da soja 19

2.2 Boro 19

2.3 Cálcio.....21

2.4 Interação cálcio-boro 22

2.5 Alterações ultraestruturais 26

3. MATERIAL E MÉTODOS.....29

3.1 Local, período e espécie vegetal.....29

3.2 Instalação, desenvolvimento dos experimentos, e delineamento estatístico 29

3.3 Produção de massa de matéria seca e análises químicas do tecido vegetal.....32

3.4 Teste bioquímico da nitrogenase - avaliação da fixação biológica de N_2 32

3.5 Avaliação do comprimento e da superfície total de raízes 33

3.6 Teor de óleo e extrato etéreo 33

3.7 Coletas de folhas e raízes para as análises de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz.....34

3.8 Preparo de espécimes para microscopia eletrônica de transmissão.....34

3.9 Preparo de espécimes para microscopia de luz nas folhas e raízes 34

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS 36

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

5.1 Produção e acúmulo de matéria seca.....37

5.2 Avaliação da atividade da nitrogenase 42

5.3 Análise de comprimento e superfície de raiz 46

5.4 Diagnose foliar ao final do experimento 48

5.4.1 Cálcio.....48

5.4.2 Boro 53

5.4.3 Potássio e Magnésio 59

5.4.4 Nitrogênio 65

5.5 Teor de extrato etéreo nos grãos 67

5.6 Microscopia de luz (ML) e microscopia de transmissão (MET) 71

6. CONCLUSÕES 78

REFERÊNCIAS 79

APÊNDICES 91

1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das principais *commoditties* mundiais, possuindo diversas finalidades, como por exemplo, fonte de proteína para alimentação humana, alimento para produção animal, e extração de óleo. É cultivada em quase todo o território nacional, sendo a principal cultura, de maior valor de produção e maior área plantada totalizando na safra 2014/15, mais de 30 milhões de hectares. Para conseguir suprir a crescente demanda do grão, é necessário um adequado manejo da adubação de macro e micronutrientes, bem como entender as interações existentes entre eles, no solo e na planta.

Em relação nutrição mineral de plantas, destacam-se as semelhanças entre os nutrientes boro (B) e cálcio (Ca) pelas funções fisiológicas e bioquímicas que eles exercem sobre as plantas. O B é um elemento essencial muito exigido pela cultura da soja, e um dos principais desafios nesta área de estudo, é a determinação da principal função do B nas plantas. O elemento está envolvido em diversos processos fisiológicos das plantas, como absorção iônica, transporte e metabolismos de carboidratos e compostos fenólicos, síntese de lignina, da parede celular (90% do B nas células se encontra nas suas paredes), de ácidos nucleicos e proteínas. Atua ainda na divisão celular dos tecidos meristemáticos. É de grande importância no desenvolvimento celular, influenciando propriedades físicas e estruturais, bem como a diferenciação da parede celular, germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico, sendo necessário ainda na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico (N_2).

O Ca por sua vez é fundamental para a manutenção da estrutura da planta, e um dos principais integrantes da parede celular, sendo esta essencial para o fortalecimento dos tecidos da planta. É imprescindível para o pleno desenvolvimento da planta, atuando como mediador de diversas reações químicas e como mensageiro de sinalizações celulares. Sua maior participação, entretanto, está relacionada à sua capacidade de coordenação, promovendo estabilidade e ligações moleculares reversíveis, principalmente na membrana plasmática e na parede celular.

Desta forma, o estudo da interação entre o B e Ca é um tópico relevante em nutrição mineral de plantas. A importância destes nutrientes para a planta, principalmente para a parede celular, é evidente. Considerando que esta interação Ca – B afeta os atributos morfológicos, ultraestruturais, bem como a nodulação nas plantas leguminosas; o presente estudo parte da hipótese de que a nutrição adequada em cálcio modula ou reduz os efeitos negativos do baixo suprimento de boro (deficiência de boro) na morfologia e ultraestrutura

dos nódulos e folhas, bem como na atividade da nitrogenase, e por fim, na produção de biomassa seca das plantas. Neste sentido, objetivou-se com este estudo determinar a relação Ca:B - tanto na solução, quanto no tecido vegetal - mais adequada para a produção de grãos, rendimento no teor de óleo dos grãos e na produção de biomassa total; avaliar os efeitos da combinação de doses de B e Ca na fixação biológica de N_2 (atividade da nitrogenase nos nódulos), nos atributos morfológicos e ultraestruturais de folhas e raízes das plantas de soja cultivadas em solução nutritiva; além de verificar a interação desses nutrientes no acúmulo de Ca, N, K, Mg e B.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caracterização da soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta como centro de origem e domesticação o nordeste da Ásia (CHUNG; SINGH, 2008). É uma das principais *commoditties* mundiais, possuindo diversas finalidades, como por exemplo, fonte de proteína para alimentação humana, alimento para produção animal, e extração de óleo, representando cerca de 80% da matéria prima utilizada na produção de biodiesel (SILVA et al., 2006). No Brasil, é cultivada em quase todo o território nacional, sendo a principal cultura, de maior valor de produção e maior área plantada, totalizando na safra 2014/15, mais de 31 milhões de hectares cultivados (CONAB, 2015), um aumento de quase 5% em relação à safra anterior.

O cultivar utilizado foi o BRS 284, da EMBRAPA, cultivar de ciclo precoce (grupo de maturidade 6.3, permite a segunda safra do milho), com ciclo de crescimento indeterminado, indicado para as regiões Sul (Santa Catarina e Paraná), Sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul e Goiás). Apresenta melhor desempenho em áreas com altitudes menores que 700 metros. Além disso, possui uma alta capacidade produtiva, entretanto é altamente exigente quanto à fertilidade do solo, fazendo-se necessário fornecer os nutrientes em quantidades adequadas às plantas, de modo que estas expressem todo seu potencial produtivo (EMBRAPA, 2014).

A evolução da produção mundial da soja é estimulada principalmente pela maior demanda mundial por proteína animal. Desta maneira, para conseguir suprir a crescente demanda sobre o grão, é necessário um adequado manejo da cultura quanto às pragas e doenças, assim como em relação à adubação de macro e micronutrientes. Neste sentido é fundamental entender as interações existentes entre eles, no solo e na planta.

2.2 Boro

O boro (B) é um elemento essencial para a cultura da soja (BORKERT et al., 1994). É absorvido pelas plantas na forma de ácido bórico não dissociado (H_3BO_3), e sua absorção é o resultado de processos ativo e passivo (KOCHIAN, 1991). Atualmente, alguns genes que sinalizam a síntese de proteínas transportadoras de B já foram clonados e tiveram suas funções identificadas, alguns dos quais conferem maior eficiência de absorção e transporte em condições de baixa disponibilidade de B. Ademais, os níveis de mRNA em alguns destes

genes transportadores de B são regulados pela disponibilidade do micronutriente no substrato (CAMACHO-CRISTÓBAL et al., 2011).

Os estudos acerca do papel do B na nutrição e fisiologia de plantas iniciaram se na década de 1920 com Warington (MATOH, 1997), e um dos principais desafios em relação à nutrição mineral de plantas, é a determinação da principal função do B nas plantas (BLEVINS; LUKASZEWSKY, 1998). O elemento está envolvido em diversos processos fisiológicos das plantas, como absorção iônica, transporte e metabolismos de carboidratos e compostos fenólicos, síntese de lignina, da parede celular (90% do B nas células se encontra nas suas paredes), de ácidos nucleicos e proteínas. Atua ainda na divisão celular dos tecidos meristemáticos. É de grande importância no desenvolvimento celular, influenciando propriedades físicas e estruturais, bem como a diferenciação da parede celular, germinação de grãos de pólen e crescimento do tubo polínico (GUPTA, 2001; REGUERA et al., 2010a).

É necessário ainda na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico (FBN), visto que o B é necessário para manutenção da estrutura da membrana e da parede celular dos nódulos radiculares, bem como para o adequado transporte de carboidratos e síntese de fenóis em plantas leguminosas (LEWIS, 1980; BOLAÑOS, 1994; PFEFFER et al., 1998; ZEHIROV; GEORGIEV, 2001). Estudos mais recentes apontam que este micronutriente é altamente exigido para o início do desenvolvimento da simbiose e na maturação dos bacterióides responsáveis pela infecção das raízes (BOLAÑOS et al., 2001; ABREU et al., 2012), bem como pelos eventos que antecedem a relação (sinalização) planta-bactéria (REDONDO-NIETO et al., 2001; GONZÁLEZ-FONTES et al., 2014), no qual o B pode atuar nos processos de transcrição (REDONDO-NIETO et al., 2012), e na organogênese do nódulo (REGUERA et al., 2009).

A deficiência de B ocorre em grande frequência em áreas agrícolas, induzindo muitas vezes a uma aplicação excessiva do nutriente (GUPTA, 1979; SHORROCKS, 1997; BLEVINS; LUKASZEWSKY, 1998). Malavolta (1997), Mattos Júnior et al. (2001), e Havlin et al. (2005) destacaram o estreito intervalo existente entre a deficiência e a toxidez de B; sendo que muitas vezes a toxidez do B é tão grave quanto sua deficiência (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). Níveis de B superiores a 1 mg L^{-1} na água de irrigação podem afetar o rendimento de culturas como citros (*Citrus sinensis*), abacate (*Persea americana*), e outras; enquanto plantas como o milho (*Zea mays*), batata (*Solanum tuberosum*), cenoura (*Daucus carota*), e beterraba (*Beta vulgaris*) são mais tolerantes e podem crescer de forma segura no intervalo de 1 a 4 mg L^{-1} de B (KEREN; BINGHAM, 1985; POLAT et al., 2004). Este desequilíbrio pode afetar indiretamente a fotossíntese e a transpiração através da redução

da área foliar e pela alteração de compostos (pigmentos) fotossintéticos presentes nas folhas (SANTOS et al., 2013). Outra possibilidade, descrita por Goldbach et al. (2007) é que embora a função do boro no processo fotossintético não seja conhecida, sua escassez pode afetar o funcionamento das membranas do cloroplasto, prejudicando o transporte de elétrons no tilacóide, causando fotoinibição.

2.3 Cálcio

O Ca é um cátion bivalente relativamente grande com um raio iônico hidratado de 0,412 nm. É absorvido pelas raízes sob a forma iônica, como Ca^{2+}, e sua concentração na solução do solo pode ser até dez vezes maior que a concentração de potássio (K). Entretanto isto não se repete no interior dos tecidos das plantas, pelo fato de que sua absorção é reduzida pela presença de outros cátions na solução, como o K^+ e o NH_4^+, que são absorvidos mais rapidamente que o Ca pelas raízes. O contato íon-raiz ocorre principalmente através do fluxo de massa, enquanto que o mecanismo de absorção é ativo obedecendo à cinética de Michaelis-Menten (HUANG et al., 1992; MARSCHNER, 2012).

É fundamental para a manutenção da estrutura da planta, e um dos principais integrantes da parede celular, onde os pectatos de Ca e magnésio (Mg) formam a lamela média, sendo esta essencial para o fortalecimento da parede celular e dos tecidos da planta (MARSCHNER, 1995). Estas ligações Ca-pectina são importantes ainda para que a parede celular apresente uma plasticidade adequada (TING, 1982). É imprescindível para o pleno desenvolvimento da planta atuando como mediador de diversas reações químicas, e também como mensageiro secundário, responsável por transformar uma grande variedade de estímulos extracelulares em respostas intercelulares, em diversos processos fisiológicos da planta (SNEDDEN; FROMM, 2001; BARTELS; SUNKAR, 2005). Sua maior participação, entretanto, está relacionada à sua capacidade de coordenação, promovendo estabilidade e ligações moleculares reversíveis, principalmente na membrana plasmática e na parede celular. Ao contrário dos outros macronutrientes, a maior parte do Ca encontrado nas plantas está localizada na parede celular (apoplasto). Quando em excesso, o nutriente é acumulado no vacúolo celular, desta forma apresenta baixas concentrações no citoplasma (MARSCHNER, 2012).

No que diz respeito a plantas leguminosas, já foi descrito na literatura que em condições de baixo suprimento de Ca, a FBN pelas plantas pode ser prejudicada, e consequentemente é observada uma clorose nas folhas (GREENWOOD; HALLSWORTH,

1960). Com a intenção de determinar a quantidade de Ca necessária para o crescimento da planta e o Ca necessário para a nodulação das plantas de trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*), Lowter e Loneragan (1968) descreveram que ambos os processos sofreram alterações devido à baixa disponibilidade de Ca, e que nos dias em que as sementes eram inoculadas era necessário um maior aporte de Ca para alcançar um grande número de nódulos. Resultado semelhante foi observado para o cultivo de alfafa. Com o avanço dos estudos, a exigência de Ca nos nódulos de plantas de soja foi mais bem investigada (STREETER, 1998).

O Ca é considerado imóvel quanto à redistribuição nas plantas, e desta maneira os sintomas visuais de deficiência surgem primeiramente nas partes mais novas das plantas. Nos estágios iniciais estes sintomas são caracterizados como deformações e cloroses foliares, avançando para o amolecimento do tecido devido às alterações na estrutura da parede celular (MENGEL; KIRKBY, 2001). Algumas desordens fisiológicas associadas à nutrição inadequada de Ca têm sido frequentemente registradas na literatura, exemplos são o *bitter pit* em maçã (FERGUSON; WATKINS, 1989), a podridão apical ou “fundo-preto” em tomate (LOPES; ÁVILA, 2005), e a queima dos bordos (*tipburn*) em alface (BENINNI et al., 2003). Estes distúrbios, no entanto, não estão necessariamente relacionados com o suprimento inadequado do elemento, e geralmente surgem quando o Ca está momentaneamente indisponível para os tecidos em desenvolvimento, provocando uma desordem fisiológica localizada deste nutriente. Possivelmente existe uma exigência por este nutriente fora do apoplasto, na superfície exterior da membrana plasmática e na parede celular. (WHITE; BROADLEY, 2003). A presença excessiva do íon na solução do solo (principalmente em solos calcários) também pode comprometer o desenvolvimento adequado das plantas (WHITE; BROADLEY, 2003), já que uma variedade de processos celulares como a sinalização dependente de Ca, e o metabolismo energético baseado em fosfatos sofrem alterações na presença de altas concentrações de Ca^{2+} (KRETSINGER, 1977; BUSH, 1995; WEBB, 1999).

2.4 Interação cálcio-boro

Destacam-se as semelhanças entre os nutrientes B e Ca sobre as formas e as funções que eles exercem sobre as plantas (MILLS; BENTON-JONES JUNIOR, 1997). O estudo da interação entre o B e Ca é um tópico relevante em nutrição mineral de plantas, a importância destes nutrientes para a planta, principalmente para a parede celular, é evidente. Com o aumento no suprimento de Ca, em plantas mal nutridas em B, foi observado o agravamento da

deficiência de B, a qual foi caracterizada por alterações ultraestruturais da parede celular – estreitamento da parede celular e lamela média – (GUPTA, 1979). Isto, provavelmente devido à necessidade do fornecimento adequado do B, de modo que o Ca associe-se à pectina na parede celular. Da mesma maneira, foram observadas alterações no transporte do Ca para a parte aérea em frutos sob deficiência de B (YAMAUCHI et al., 1986; RAMÓN et al., 1990; FRANCO et al., 2012), além de alterações no nível de exigência quanto aos outros nutrientes para o ótimo desenvolvimento das plantas (TEASDALE; RICHARDS 1990).

Alguns outros resultados práticos evidenciam ainda mais a relação entre os dois elementos. A incidência do *bitter pit* da maçã, a qual é uma desordem relacionada com a deficiência de Ca diminui com a aplicação foliar de B, provavelmente auxiliando no metabolismo ou incorporação do Ca na parede celular (YAMAUCHI et al., 1986), ou seja, o B atua na biossíntese da parede celular auxiliando o Ca na deposição e formação de pectatos envolvidos na construção destas estruturas. Outro fato a ser considerado é que sintomas visuais de deficiência de B são acentuados pela deficiência de Ca, sendo menos evidente quando o Ca encontra-se em excesso (CHATTERJIE et al., 1987). Salvador et al. (1999) avaliando a composição mineral de folhas de goiabeira, em experimento desenvolvido em solução nutritiva, concluíram que a omissão de B na solução nutritiva acarretou em redução dos teores de Ca na planta. Franco et al. (2012) observaram efeito sinérgico entre os níveis de B na solução nutritiva e a quantidade de Ca acumulada pela mamoneira cv. Íris. Shams et al. (2012) concluíram que o aumento das concentrações de Ca e B na solução nutritiva, favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular da roseira cultivar '*Easy Lover'*.

Em experimentos com *Pisum sativum*, Carpena et al. (2000) buscaram evidenciar o papel específico do B e Ca na fixação biológica de nitrogênio, e concluíram que altos suprimentos de B podem induzir a mobilização do nutriente nas raízes, além de que as maiores concentrações de B são observadas nos nódulos das plantas e podem contribuir para uma baixa atividade da nitrogenase. Outro trabalho mostrou que uma balanceada relação B-Ca na nutrição das plantas, aumentou a tolerância do processo simbiótico entre *Rhizobium*-leguminosa à ambientes salinos, devido a melhor formação dos nódulos radiculares nestas condições (EL-HAMDAOUI et al., 2003). Por sua vez, Redondo-Nieto et al. (2003) mostraram que tanto o nível de nodulação como a FBN (medida indiretamente através da atividade da N-ase), foram fortemente influenciadas pelos níveis de ambos os nutrientes na solução nutritiva. Situações de toxicidade e deficiência de B resultaram em forte inibição da atividade da nitrogenase (cerca de 80%), como apresentado previamente por

Bolaños et al. (1994). Em plantas com fornecimento adequado de B, o aumento ou redução da dose de Ca na solução nutritiva, igualmente causou redução na atividade da nitrogenase. Ademais, o suplemento de Ca evitou apenas parcialmente os efeitos negativos da deficiência de B no desenvolvimento e funcionamento dos nódulos. O aumento no teor de B nos nódulos destas plantas, devido à dose adicional de Ca, preveniu uma deficiência severa de B e pode estar na base destes efeitos (REDONDO-NIETO et al., 2003).

A interação entre os nutrientes possui, além disso, uma marcante função no transporte do ácido indolil-acético (IAA) através da membrana celular (TANG; DELA FUENTE, 1986). As alterações morfológicas em plantas causadas pela deficiência de B podem ser devido ao acúmulo do IAA, resultando na inibição de compostos fenólicos, tais como os ácidos clorogênico e cafeico, pela IAA oxidase. A associação do B com alguns destes compostos fenólicos bloqueia a formação de quinonas, e assim favorece a síntese de álcoois fenólicos, que são precursores da lignina. Ainda, em condições de deficiência de B tem sido observado o aumento na atividade da polifenoloxidase, a qual oxida o IAA, impedindo assim a colaboração com o Ca em diminuir a rigidez da parede celular (ALI; JARVIS, 1988; BLEVINS; LUKASZEWSKI, 1998; GUPTA, 2001; MALAVOLTA, 2006). A deficiência de B também reduz a atividade da adenosina trifosfatases (ATP-ase) e, consequentemente, a disponibilidade de energia necessária à absorção iônica ativa, podendo reduzir a absorção de Ca. (MALAVOLTA et al., 1997).

Alguns trabalhos indicaram a existência e isolamento de complexos B-cis-diol nas paredes celulares das plantas, principalmente B-rhamnogalacturonan II (B-RGH-II) (MATOH et al., 1993; O'NEILL et al., 1996; FUNAKAWA; MIWA, 2015). Pesquisas conduzidas por Ferreira et al. (2006) mostraram alta correlação entre os íons de cálcio e o teor de ácido galacturônico, presentes na parede celular de frutos de azeitona. Também tem sido sugerido que a interação cálcio x ácido galacturônico seja responsável pela estabilização dos complexos B-RGH-II da parede celular das plantas superiores (KOBAYASHI et al., 1996), aproximando os monômeros de RGH-II para a dimerização com o boro (PEREZ; RODRIGUES-CARVAJAL; DOCO, 2003). Esta evidência foi encontrada para as células da membrana, e serve como mais uma prova da interação B – Ca (TANG; DELA FUENTE, 1986). Estes nutrientes também desempenham funções semelhantes no transporte de carboidratos da folha para a raiz, o que se reflete na nodulação das leguminosas (CLARK, 1984). Considerando a participação de Ca e B nas mesmas funções ou processos, Mills e Benton-Jones Junior (1997) e Kanwal et al. (2008) concluíram que ambos os nutrientes devem estar balanceados para o adequado crescimento da planta.

Ambos nutrientes também estão envolvidos na fixação biológica de nitrogênio. Um maior acréscimo de Ca (relação próxima ou superior a 200), em plantas mal nutridas em B, pode estimular (sinalizar) os eventos que antecedem à infecção das raízes pelos rizóbios, e promover (normalizar) a atividade dos nódulos radiculares quanto à fixação biológica de N_2. O primeiro passo para que ocorra a interação simbiótica é a troca de sinais difusos entre planta e bactéria, os quais levam à produção de fatores Nod seguidos da ativação dos genes *nod* (SPAINK, 2000). Alterações no nível de ambos nutrientes durante o desenvolvimento das plantas modificaram a capacidade dos extratos radiculares em induzir os genes *nod* nos rizóbios. Adicionalmente, existem resultados indicando que pode haver um aumento na expressão de genes *nod* induzindo a produção de flavonoides em raízes de leguminosas submetidas aos tratamentos que continham maiores doses de cálcio (RICHARDSON et al., 1988). Além da troca de sinais difusos, a adsorção dos rizóbios às raízes também é necessária para iniciar a formação dos nódulos em ervilhas (KANNENBERG; BREWIN, 1994), sendo que diferentes níveis de Ca e B também influenciaram no grau de pegamento das bactérias às raízes (REDONDO-NIETO et al., 2001; REGUERA et al., 2010a, 2010b).

Por sua vez, a relação cálcio/boro em folhas tem sido utilizada como índice para a avaliação de deficiência ou da toxidez de boro, constituindo-se em método de diagnose foliar quanto à nutrição (GUPTA, 1979). Tem sido considerada que a existência da interação entre o Ca e o B deve estar embasada no fato de ambos exercerem função estrutural das membranas, da lamela média e da parede celular (MARSCHNER, 1995). Desta maneira, é esperado que as plantas de soja cultivadas com disponibilidade adequada desses nutrientes apresentem em sua composição mineral, uma determinada relação Ca/B constante ou próxima nas folhas, nas raízes e nos grãos. Franco et al. (2012) relataram que o quociente Ca/B do substrato deve estar entre 100 e 170, sendo mantida durante o ciclo de crescimento e, principalmente, na fase de frutificação, para que ocorra adequado desenvolvimento da cultura da mamona.

Grande parte da literatura mencionada aqui descreve estudos com o boro ou com o cálcio, porém são poucos os trabalhos avaliando a interação entre ambos os nutrientes, bem como a relação existente entre eles, principalmente na morfologia, e ultraestrutura da cultura da soja. Essas interações, aparentemente, ocorrem ao nível de membrana e parede celular (PARR; LONGHMAN, 1983). Entretanto os mecanismos envolvidos nesta interação ainda não são muito bem conhecidos. Uma possibilidade é que as funções do B na estabilização de componentes da parede celular dependem da atuação conjunta do Ca (GINSBURG, 1961; LOOMIS; DURST, 1992; KOSHIBA et al., 2010 GONZÁLES-FONTES et al., 2014).

2.5 Alterações Ultraestruturais

As alterações ultraestruturais em células, na maior parte das vezes, antecedem os sintomas visuais observados posteriormente nas plantas. As causas para que ocorram estas alterações podem ser diversas, como exemplo podemos citar os choques de temperatura (HUANG et al., 2013), bem como o estresse hídrico (ZHANG et al., 2015), salinidade (BASTÍAS et al., 2013), doenças (SUZUKI et al., 2003) e por fim, fatores relacionados a nutrição mineral de plantas (SILVA et al., 2008).

Os sintomas visuais, tanto da deficiência quanto da toxidez de nutrientes, iniciam-se com alterações moleculares nos tecidos, seguindo para lesões subcelulares, até chegarmos às alterações ultraestruturais que antecedem as deformações de tecido (folhas), e podem ser antecipadamente identificadas por meio da técnica de microscopia eletrônica (EPSTEIN; BLOOM, 2005). O estudo da anatomia e ultraestrutura dos tecidos é fundamental para a compreensão dos papéis exatos do B e Ca nas células das plantas.

Em relação aos efeitos tóxicos do B na anatomia das folhas, estes já foram estudados por Sotiropoulos et al. (2002) em kiwi, bem como por Papadakis e al. (2004) em citrus, e por Kuo e Yeh (2006) em *Guzmania ligulata*, todos estes relatos mostraram que os efeitos da toxicidade de B na anatomia foliar eram limitados principalmente às células do mesofilo, e que as células epidérmicas foram menos afetadas pela toxicidade do elemento.

Huang et al. (2014) avaliaram a tolerância de duas espécies de *Citrus* à toxicidade de B, e observaram engrossamento da lamina foliar da espécie *C. grandis*, provavelmente devido ao incremento significante da espessura do parênquima esponjoso, enquanto que nenhuma diferença foi constatada na análise dos tecidos da espécie *C. sinensis*. Foi verificado ainda aumento no tamanho dos grãos de amido nos cloroplastos de células esponjosas das folhas. Em relação às análises ultraestruturais das folhas das duas espécies de *Citrus* avaliadas, não foram encontradas alterações no número e forma dos cloroplastos nas células do mesófilo, sendo ainda observado um grande número de tilacóides, bem organizados dentro dos cloroplastos.

Silva et al. (2008) estudaram as alterações ultraestruturais causadas pela deficiência e toxidez de boro em plantas de mamona (*Ricinus communis* L.), e observaram o espessamento da lamela média e da parede celular, com redução no crescimento celular quando foi fornecida a menor dose de B às plantas. Avaliando os efeitos ultraestruturais da deficiência de B nesta mesma cultura, Lavres Junior et al. (2012) identificaram principalmente o espessamento das paredes celulares e das lamelas-medias, bem como a presença significativa

de mitocôndrias no protoplasma, e cloroplastos distorcidos e sem a presença de tilacóides. Foi constatada ainda a ausência de amiloplastos contendo grãos de amido.

Avaliando os efeitos da deficiência de B na ultraestrutura da parede celular, em dois cultivares de *Brassica Napus* (mais e menos tolerantes à deficiência de B), Pan et al. (2012) constataram que a deficiência de B provocou alterações na estrutura da parede celular das folhas, especialmente no cultivar menos tolerante à baixas doses de B, tornando-se esta mais espessa e inchada em comparação com a parede celular das plantas cultivadas com a dose controle de B (25 µmol L^{-1}). Soma-se a isso que a lamela média nas células das folhas deficientes em B apresentou ainda alterações estruturais, possivelmente devido a aberrações ocorridas durante a síntese de pectina.

Por outro lado, Bastías et al. (2013) não observaram alterações ultraestruturais no tecido foliar de plantas de milho submetidas à elevadas doses de B, e concluíram que a estrutura celular das folhas se mantem bem estabelecida mesmo com o fornecimento de 40 ppm de B na solução nutritiva.

Plantas de ervilha submetidas à deficiência e toxidez de B apresentaram alterações na parede celular, caracterizadas por formas irregulares, em relação às plantas adequadamente nutridas em B (REDONDO-NIETO et al., 2003). Neste mesmo trabalho, a aplicação adicional de Ca em plantas deficientes em B, estimulou a infecção das raízes por bactérias do gênero *Rhizobium*, permitindo a fixação do N_2 atmosférico, bem como preservou a estrutura dos nódulos, diferentemente do observado nos tratamentos com baixa disponibilidade de B e a dose recomendada de Ca (nódulos com estruturas afetadas, e praticamente sem infecção).

Na literatura, ainda é possível encontrar alguns trabalhos avaliando a importância do Ca para estrutura da parede celular em frutos, especialmente no período de armazenamento após a colheita, com a finalidade de aumentar o tempo de prateleira destes frutos. Glenn e Poovaiah (1990) avaliaram o efeito da aplicação de Ca na estrutura da parede celular de maçãs seis meses após a colheita, e constataram que os frutos tratados com Ca não apresentaram inchaço e que o espaço intracelular foi mantido durante o armazenamento, de modo que no tecido não tratado com Ca foi observado que o tecido da região da lamela média encontrava-se levemente manchado, distendidos e eventualmente separados. Além disso, em alguns casos a lamela média apresentou-se completamente degradada.

Evangelista et al. (2002), em trabalho com manga, demonstraram por meio do uso de microscopia eletrônica de transmissão que os frutos tratados com cloreto de cálcio a 5,0% apresentaram lamela média bem definida (escura) e ausência de espaços vazios, mesmo após

35 dias de armazenamento. Além do mais, em trabalho avaliando os efeitos tóxicos do cádmio (Cd) em algas do gênero *Micrasterias*, Andosch et al. (2012) encontraram que o fornecimento de 2 mmol L^{-1} de $CaSO_4$ durante três semanas amenizou os efeitos adversos do Cd nas estruturas das células avaliadas. Em estudo semelhante, Volland et al. (2014) concluíram que a adição de íons bivalentes como ferro (Fe^{2+}), zinco (Zn^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}) foi capaz de reduzir os efeitos negativos na estrutura celular, resultante da presença dos metais pesados Cd e cromo (Cr) no meio de cultura de algas do gênero *Micrasterias*.

Por outro lado Wu et al. (2011) cultivaram *Lonicera confusa* em solos com altas e baixas disponibilidade de Ca, e avaliaram os efeitos do Ca na ultraestrutura foliar das plantas, não encontrando porém, diferenças nas células cultivadas, nos estágios iniciais do desenvolvimento independentemente do Ca disponível às plantas.

Dong et al. (2009), avaliando os efeitos da aplicação isolada de Ca e de B e combinada, no período pré-colheita em laranjas, concluíram que os tratamentos alteraram a estrutura do tecido (número e tamanho das células). A aplicação isolada dos nutrientes ou combinada reduziu o espaço entre as células na membrana segmentar da laranja. Nestas amostras ainda foi possível observar que as células estavam bem organizadas verticalmente, próximas, e bem homogêneas, enquanto que nas amostras do tratamento controle, as células encontravam-se tortuosas e haviam sofrido transformações.

Todas estas alterações observadas na estrutura da parede celular ocorrem possivelmente devido a interação do Ca e do B com pectinas de modo a formar uma rede de polímeros reticulados que tornam os constituintes da parede das células mais firmes. Da mesma forma, a maior firmeza dos frutos tratados somente com Ca ou com Ca e B pode ser atribuída ao efeito do Ca na lamela média das células, uma vez que este elemento atua como agente de ligação entre as paredes das células (DONG et al., 2000). Porém, as alterações ultraestruturais em plantas de soja submetidas à interação entre o Ca e o B ainda precisam ser mais bem conhecidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, período e espécie vegetal

Os experimentos foram desenvolvidos em casa de vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba – SP. Foi utilizada a espécie *Glycine max* (L.) Merrill, cultivar BRS 284, de ciclo precoce, de tipo de crescimento indeterminado. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva sob aeração constante. Os estudos foram desenvolvidos no período do verão/outono de 2013/14, com temperaturas máxima, mínima e média, durante o período experimental, de 38,6; 18,2 e 26,4 °C, respectivamente. O estudo compreendeu dois experimentos realizados em sequência, o primeiro referente às avaliações morfológicas, químicas, e da atividade da nitrogenase, e o segundo referente às avaliações ultraestruturais de folhas e raízes (nódulos)

3.2 Instalação, desenvolvimento dos experimentos, avaliações semanais e delineamento estatístico

As sementes foram inicialmente inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* de modo a fornecer uma população de aproximadamente 1,2 milhões de células por semente. Em seguida foram colocadas para germinar em bandeja rasa com vermiculita, umedecida com água deionizada, e quando maior parte das plantas emergidas atingiram o estádio fenológico V1 foram transferidas para bandeja de plástico com capacidade de 40 L contendo solução nutritiva, adaptada de Sarruge (1975), completa e diluída a 1/5 da concentração usual (Tabela 1), de modo a agravar as carências nutricionais, considerando a contribuição das reservas da semente. Após uma semana nesta "solução de adaptação", as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 2,3 L contendo soluções nutritivas (1,8 L) e iniciando, portanto, os tratamentos. Foram cultivadas duas plantas por vaso. O nitrogênio (na forma de NH_4NO_3 e na concentração de 10 mmol L^{-1}) foi fornecido às plantas na solução nutritiva somente nos primeiros 15 dias, de modo a suprir o fornecimento do nutriente enquanto os nódulos ainda estavam em formação (Konsaeng et al., 2010). As plantas foram fixadas na região do colo com espuma de plástico e a solução nutritiva foi renovada a cada 7 dias.

Foram utilizadas as doses de B de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; µmol L^{-1} e as doses de Ca de 1,75; 3,0; 4,25; 5,5; 7,25 mmol L^{-1} na solução nutritiva. Empregou-se o desenho experimental composto central modificado de um esquema fatorial 5^2 incompleto, fundamentado em Littell e Mott (1975), com as doses de B e de Ca (em µmol L^{-1}/ mmol L^{-1}), perfazendo um total de 13 combinações (3,125B e 1,75Ca; 3,125B e 4,25Ca; 3,125B e 7,25Ca; 6,25B e 3,0Ca; 6,25B e 5,5Ca; 12,5B e 1,75Ca; 12,5B e 4,25Ca; 12,5B e 7,25Ca; 25B e 3,0Ca; 25B e 5,5Ca; 50B e 1,75Ca; 50B e 4,25Ca e 50B e 7,25Ca), as quais foram distribuídas segundo o delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro repetições.

Um segundo experimento foi conduzido, na sequência, com o intuito de coletar os tecidos de folhas e nódulos para a avaliação ultraestrutural. A coleta neste experimento foi realizada quando as plantas encontravam-se no estádio fenológico R1. Neste segundo experimento, duas plantas por vaso também foram cultivadas conforme descrição do Experimento I, com capacidade de 2,3 L, porém foi utilizada vermiculita como substrato (desta forma não foi fornecido N na forma de NH_4NO_3 na solução nutritiva), de modo que mais nódulos fossem produzidos pelas plantas. A cada 5 dias 500 mL da solução nutritiva (Tabela 1) sem o fornecimento de N eram colocados por vaso, de maneira que o substrato se mantivesse úmido, e as plantas não sofressem com excesso ou falta de solução nos vasos. Novamente, foram cultivadas duas plantas por vaso. Com base nos resultados e, principalmente, pelas observações sintomatológicas do Experimento I, foram utilizadas cinco combinações contrastantes de doses de B e Ca (3,125B e 1,75Ca; 3,125B e 7,25Ca; *12,5B e 4,25Ca – controle* -; 50B e 1,75Ca; 50B e 7,25Ca), as quais promoveram os mais agudos/severos sintomas de anomalia nas plantas.

Tabela 1. Composição da solução nutritiva adaptada de Sarruge (1975) e volumes das soluções estoques utilizadas no preparo das soluções nutritivas para as combinações de Ca e de B, para o cultivo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

Combinações	1,75	4,25	7,25	3,0	5,5	1,75	4,25	7,25	3,0	5,5	1,75	4,25	7,25
Ca e B	3,125	3,125	3,125	6,25	6,25	12,5	12,5	12,5	25,0	25,0	50,0	50,0	50,0
Solução Estoque	VOLUME (mL L^{-1})												
KH_2PO_4													
1 mol L^{-1}	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
KCl													
1 mol L^{-1}	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
NH_4NO_3													
1 mol L^{-1}	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
$CaCl_2$													
1 mol L^{-1}	1,75	4,25	7,25	3,0	5,5	1,75	4,25	7,25	3,0	5,5	1,75	4,25	7,25
$MgSO_4$													
1 mol L^{-1}	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H_3BO_3													
0,01 mol L^{-1}	0,3125	0,3125	0,3125	0,625	0,625	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0
Micros[(1)]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe-EDTA[(2)]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

[(1)] g em 1 L: KCl (3,728) [50 µmol L^{-1}]; $MnSO_4 .H_2O$ (0,338) [2 µmol L^{-1}]; $ZnSO_4$ 7 H_2O (0,575) [2 µmol L^{-1}]; $CuSO_4$ 5 H_2O (0,125) [0,5µmol L^{-1}]; H_2MoO_4 (85% MoO_3) (0,081) [0,5 µmol L^{-1}]. [(2)] Dissolver 33,2 g de EDTA-2Na em de 200 mL de H_2O destilada. Juntar agitando, 89 mL de NaOH 1mol L^{-1} (40g L^{-1}); Dissolver separadamente, 24,9g de $FeSO_4$ 7 H_2O em de 200 mL de H_2O destilada e juntar, agitando à solução e EDTA [53,7 µmol L^{-1}]. Completar para 900 mL com H_2O destilada; colocar em frasco escuro, arejar durante uma noite e completar a 1 L com H_2O destilada; manter em frasco escuro na geladeira.

3.3 Produção de massa de matéria seca e análises químicas do tecido vegetal

Ao final do primeiro experimento (88 dias após o início dos tratamentos), as plantas foram colhidas e separadas (grãos, vagens/pericarpos, folhas, caule e raízes). O material foi identificado, acondicionados em sacos de papel e colocados para secar em estufa a 65°C (± 0,5) por um período de 72 horas.

Posteriormente foram pesados e triturados em moinho tipo Wiley (peneira com diâmetro de malha de 1 mm) para as determinações químicas de nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), boro (B), e magnésio (Mg) nos tecidos vegetais, de acordo com metodologia descrita por Malavolta et al. (1997). No caso dos grãos, não foi possível realizar as análises químicas, pois todo o material obtido foi utilizado para a realização de outras análises (teor de óleo nas sementes), e desta forma não havia material suficiente para efetuar as determinações dos nutrientes em grande parte dos treze tratamentos avaliados.

As quantidades acumuladas dos nutrientes nos tecidos vegetais foram calculadas pela multiplicação da concentração com o valor da massa de matéria seca de cada parte da planta (MALAVOLTA, 2006).

3.4 Teste bioquímico da nitrogenase – avaliação da fixação biológica de N_2

A atividade da nitrogenase (N-ase), efetuada no Laboratório de Pós-Colheita de Plantas Hortícolas USP-ESALQ, foi avaliada indiretamente pela quantificação de redução do acetileno, segundo método descrito por Hardy et al. (1968), quando as plantas estavam no estádio fenológico R5, na qual verifica-se o máximo acúmulo de matéria seca e de nutrientes nas folhas, pecíolos e ramos, bem como o início do enchimento de grãos (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Para isso, as raízes das plantas (com os nódulos) foram separadas da parte aérea, coletadas e colocadas juntamente com os nódulos que delas se desprenderam em frascos de vidro de 150 mL hermeticamente fechados. Logo na sequencia, foram aplicados 15 mL de acetileno, usando seringa de injeção, com o cuidado de se retirar, previamente, esse mesmo volume de ar, para não alterar a pressão, e deixamos os frascos incubados por uma hora. Em seguida, amostras contendo 1 mL dessa atmosfera foram então injetadas no cromatógrafo. Os valores de etileno produzido foram convertidos em µmol C_2H_4 h^{-1} $planta^{-1}$, considerados como a atividade da nitrogenase. A atividade específica da N-ase foi calculada por meio da razão entre a atividade da N-ase e a massa fresca de nódulos de cada planta.

3.5 Avaliação do comprimento e da superfície total de raízes.

Ao final do Experimento I as raízes foram separadas da parte aérea e lavadas em água desionizada, utilizando duas peneiras sobrepostas com diâmetro de malha de 0,25 e 1,00 mm, evitando possíveis perdas durante a lavagem. Para quantificação do comprimento e da superfície radicular de cada unidade experimental, a raiz de cada planta foi coletada inteira, cortou-se então vertical e horizontalmente o volume de raízes, evitando-se a raiz pivotante (LAVRES JUNIOR et al., 2008). Em seguida, essa subamostra foi colocada em copo plástico contendo água desionizada, e então armazenada na temperatura de ± 10 ºC, em geladeira (NOORDWIJK; FLORIS, 1979), a fim de se evitar a desidratação e a perda de matéria seca durante a manipulação (separação das raízes na cubeta do *scanner*), devido à respiração. Posteriormente, as imagens das raízes obtidas diretamente com o auxílio de *scanner* (300 dpi), foram analisadas por meio do aplicativo *WinRHIZO*, um sistema de análises de imagens, especificamente desenvolvido para medição de raízes em diferentes formas. Os valores totais de comprimento e de superfície (área superficial cilíndrica) foram prontamente calculados pelo software, relacionando-se os valores da amostra e de sua matéria seca com a matéria seca total de raízes de cada unidade experimental (LAVRES JUNIOR et al., 2008).

3.6 Teor de óleo e extrato etéreo

As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do CENA/USP, utilizando extrator de gordura marca *Ankom*, modelo XT10. O método utilizado foi o *Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction* descrito em *ANKOM Technology Method 2, 01-30-09, AOCS Official Procedure Am 5-04* (AOCS, 2009). Este método consiste em determinar gordura bruta por extração com éter de petróleo. Os compostos extraídos são predominantemente triacilglicerídeos. Pequenas quantidades de outros lipídios, bem como alguns componentes menores solúveis em éter de petróleo, também são extraídas.

3.7 Coletas de folhas e raízes para as análises de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de luz

Foram escolhidas na ocasião da coleta dos tecidos (estádio fenológico R1, inicio do florescimento), as plantas que apresentaram os sintomas mais visíveis de deficiência (alto Ca e baixo B; baixo Ca e alto B) e plantas "sadias" (doses recomendadas para ambos os nutrientes). Para tanto, foram coletadas as folhas superiores (terceira folha completa e expandida) e os nódulos radiculares das plantas submetidas às combinações de Ca e B na solução nutritiva.

3.8 Preparo de espécimes para microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de folhas e de nódulos radiculares (medindo 1x2 mm) foram fixadas em solução de *Karnovsky* modificado: glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, cloreto de cálcio 5 mmol L^{-1} em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L^{-1}, pH 7,2 por 48 horas a 4ºC, lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol L^{-1} (3x 15 min.) e pós fixadas por 1 hora com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,2 mol L^{-1}. Após rápidas lavagens em solução salina 0,9%, foram coradas “em bloco” com acetato de uranila 2,5% em água *overnight* a 4ºC. Posteriormente, foram desidratadas em séries crescentes de acetona em água (25, 50, 75, 90 e 100%). As amostras foram incluídas em resina Epon 812 ou Spurr, segundo Luft (1961).

Os cortes ultrafinos (60-90 nm) foram depositados sobre telas de cobre recobertas com colódio, contrastados com acetato de uranila 2,5% e citrato de chumbo conforme Reynolds (1963) e, em seguida, examinados ao microscópio eletrônico *Zeiss EM-900* operando a 50kV e ampliação de 3.000 e 4.400 X (LAVRES JUNIOR et al., 2009; 2010; 2012).

3.9 Preparo de espécimes para microscopia de luz nas folhas e raízes

A metodologia de inclusão para os cortes semi-finos das folhas e nódulos radiculares foi a mesma utilizada para a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os cortes semifinos (150 nm) foram depositados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina 1% em solução de borax 1%. Em seguida as lâminas foram cobertas com lamínula utilizando entelan e observadas ao microscópio optico *Zeiss Axioscop* 40 HBO 50 A/C. As avaliações morfométricas das seções transversais das folhas para avaliação da espessura de lamela média do mesófilo foram obtidas por meio de microscopia óptica, acompanhados pelo

processamento das imagens, utilizando o *software Photoshop Adobe*© versão 6.0 (San Jose, CA, EUA), e calculada utilizando a terceira versão do software integrado sistema de Análise e cobertura do solo (SIARCS, Embrapa, São Carlos, Brasil) (LAVRES JUNIOR et al., 2010).

4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico *SAS – System for Windows* 6.11 (SAS, 1996). Foi realizada análise de variância e de acordo com o nível de significância no teste F para os tratamentos (doses de Ca e doses de B), procedeu-se o estudo de regressão polinomial para os componentes de primeiro e segundo grau, pelo procedimento *RSREG* (*response surface)*. Os modelos de superfície de resposta foram escolhidos com base na significância dos coeficientes de regressão, pelo teste F ($p \leq 0,05$), e pelo coeficiente de determinação (R^2). Todavia, quando a interação apresentou significância acima de 5%, optou-se por descrever/representar a respectiva variável-resposta por meio do teste de comparação de médias (Tukey, $p < 0,05$) (EL-HAMDAOUI et al., 2003; ZEHIROV; GEORGIEV, 2003; FRANCO et al., 2012; SHAMS et al., 2012).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Acúmulo de matéria seca

As produções de massa seca de vagens (pericarpos), caule, folhas, e raízes foram influenciadas pela interação entre as doses de B e de Ca na solução nutritiva (Figuras 1, 2, 3, 4). Todavia, foi verificada significância apenas ao nível de p= 0,29 da interação das doses de Ca e B para a produção de grãos (Figura 5).

Verificou-se, por meio do teste de comparação de médias que a maior produção de grãos foi observada com o fornecimento da combinação de 4,25 mmol L^{-1} de Ca com 12,5 µmol L^{-1} de B na solução nutritiva (Figura 5). A menor dose de Ca inibiu a produção de grãos das plantas, devido à importância do Ca para a germinação do grão de pólen e no crescimento do tubo polínico (MARSCHNER, 2012). A produção de grãos sofreu ainda influência das doses de B, elemento este reconhecidamente reprodutivo e que também desempenha funções fisiológicas quanto ao desenvolvimento do tubo polínico e germinação do grão de pólen e, por sua vez, com a formação de estruturas reprodutivas, formação de colheita (grãos) e qualidade (MALAVOLTA, 2006).

O maior acúmulo de biomassa de folhas foi observado com o fornecimento da combinação de doses de 5,5 mmol L^{-1} Ca e 25 µmol L^{-1} B na solução nutritiva, de acordo com o modelo matemático descrito, correspondendo a incremento de 120% em relação ao menor rendimento obtido (combinação de doses de 7,25 mmol L^{-1} de Ca e 50 µmol L^{-1} B). A menor produção de biomassa de folhas observada pode ser explicada, em parte, pela toxicidade causada pela maior dose de B, reduzindo o crescimento dos tecidos mais novos e, por outro lado, pelas necroses nas folhas velhas (margem do limbo – APÊNDICES F e G), ao passo que nem mesmo o suprimento de doses adequadas ou superiores de Ca foram capazes de amenizar estes sintomas. A ação conjunta do cálcio e do boro na produção de parte aérea das plantas é bem conhecida na literatura. Kanwal et al. (2008) em trabalho avaliando doses de B e Ca no crescimento de plantas de trigo também observaram interação entre as doses para a produção de matéria seca de parte aérea. E diversos trabalhos destacaram a importância do fornecimento de ambos para a maximização da área foliar, tornando mais eficiente a atividade fotossintética e, por fim, favorecendo maior produção de massa foliar (GALLAHER et al., 1976; MALAVOLTA, 1980; ROSOLEM, 1980; GUPTA, 1993).

O maior acúmulo de biomassa de caule foi verificado na combinação de doses de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e de 3,125 µmol L^{-1} de B, correspondendo a incremento de 156% em relação à combinação da mais baixa dose de Ca com a mais alta dose de B. Quanto a esta combinação de doses vale ainda realçar o reduzido crescimento da parte aérea (folhas e caule juntos), possivelmente devido aos sintomas de toxicidade de B e/ou devido à importância do Ca no enlongamento destas células, ainda mais nas situações em que o suprimento de B às plantas é baixo. De maneira que em geral, o fornecimento de doses mais elevadas de Ca ajuda a minimizar os efeitos negativos deste baixo suprimento de B (MARSCHNER, 2012).

As maiores produções de massa seca de vagens/pericarpos ocorreram com o fornecimento da combinação de doses de 25 µmol L^{-1} B e 5,5 mmol L^{-1} Ca na solução nutritiva. Por outro lado, o fornecimento das combinações com as menores doses de Ca e B (1,75Ca e 3,125B), bem como a combinação das maiores doses de Ca e B (7,25Ca e 50B) reduziram em mais de três vezes o acúmulo de biomassa de vagens/pericarpos. Devido à ação do Ca e do B no processo de frutificação (MASCARENHAS; MACHLIS, 1964; MARSCHNER, 2012), já era de se esperar que a deficiência destes nutrientes comprometesse a produção de vagens pelas plantas, assim como comprometeu a de grãos.

Quanto à produção matéria seca de raízes, a combinação de 25 µmol L^{-1} B e 5,5 mmol L^{-1} Ca proporcionou os maiores valores encontrados. Enquanto que a combinação das menores doses de Ca e B também foi responsável por uma das menores produções de massa seca de raiz, realçando a importância do fornecimento dos nutrientes em quantidades adequadas e equilibradas, e principalmente do Ca e do B no desenvolvimento do sistema radicular (MARSCHNER, 2012). Santos et al. (2003), em trabalho sobre o desenvolvimento do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) submetido a cinco doses de B em solução nutritiva (0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 mmol L^{-1}), também constataram que doses de B menores que 3,0 µmol L^{-1} reduziram a produção de raízes. A deficiência de B também causou redução na massa seca de raízes de plantas de tabaco (CAMACHO-CRISTÓBAL et al., 1999). Silva et al. (2008), em trabalho avaliando o efeito do boro no crescimento da mamoneira (*Ricinus communis*), relataram menor produção de matéria seca de raízes, caules, e folhas nas plantas submetidas à deficiência de B.

De uma maneira geral, a combinação de doses que permitiu o maior acúmulo de matéria seca total ao final do experimento foi de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e de 12,5 µmol L^{-1} de B (Figura 6), enquanto que a combinação que forneceu a maior dose de B junto com a menor de Ca (1,75Ca e 50B) foi responsável pelo menor acúmulo observado, representando redução de aproximadamente 70% entre os tratamentos. Esta diferença pode ter ocorrido devido ao efeito

da deficiência de Ca, bem como ao efeito tóxico do B, impedindo o desenvolvimento adequado das plantas durante seu ciclo. Isto serve para novamente realçar a importância do suprimento equilibrado de nutrientes na solução nutritiva, garantindo assim um maior acúmulo de biomassa.

É importante frisar que, em condições onde o fornecimento de B na solução nutritiva foi baixo, e ao incrementar o suprimento de Ca às plantas, foi observada redução dos efeitos negativos causados pela deficiência de B para a produção de matéria seca da soja. De modo geral, os valores de rendimento de massa seca nestas condições corresponderam em até 75% dos maiores observados.

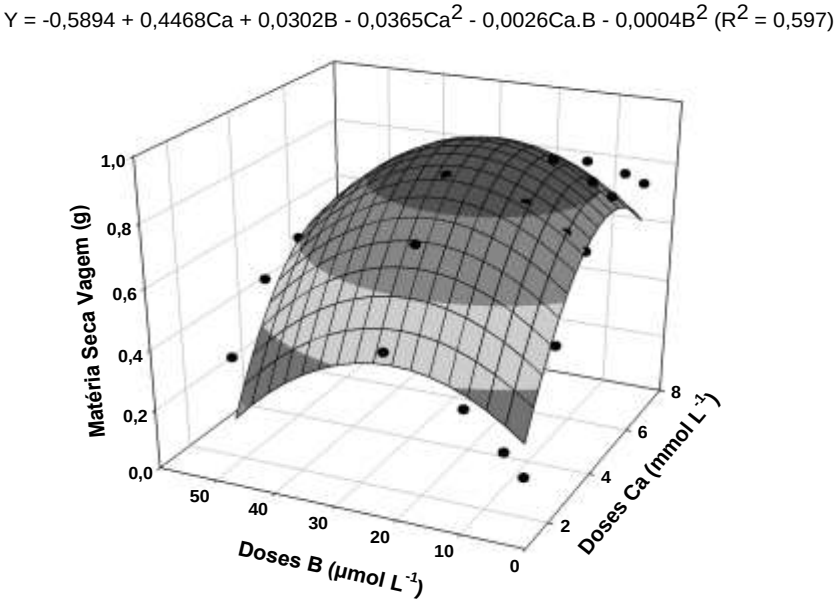

Figura 1 - Matéria seca de vagens (pericarpos) das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

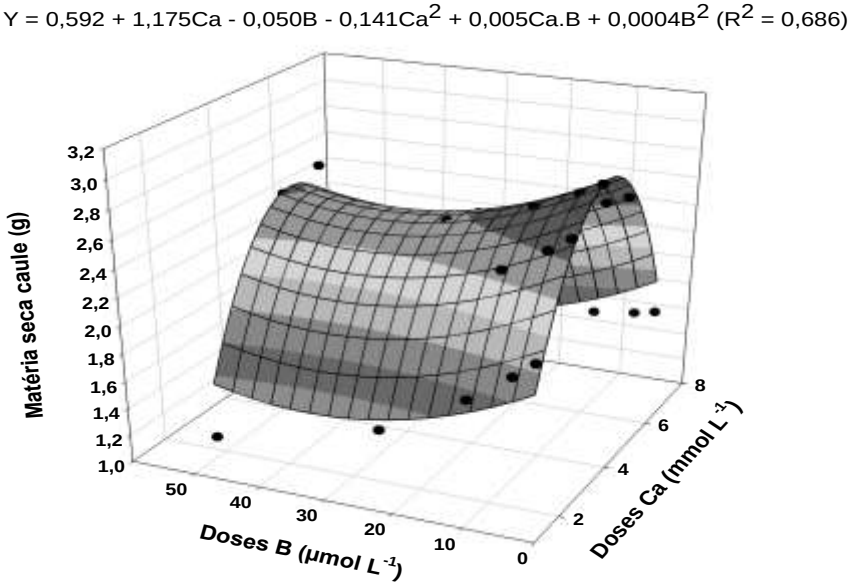

Figura 2 - Matéria seca de caule das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

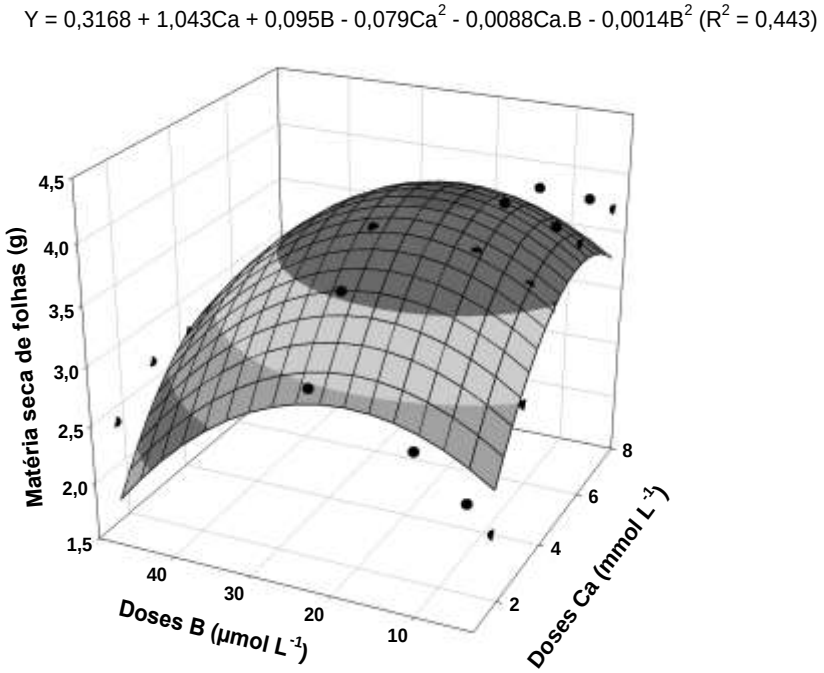

Figura 3 - Matéria seca de folhas das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

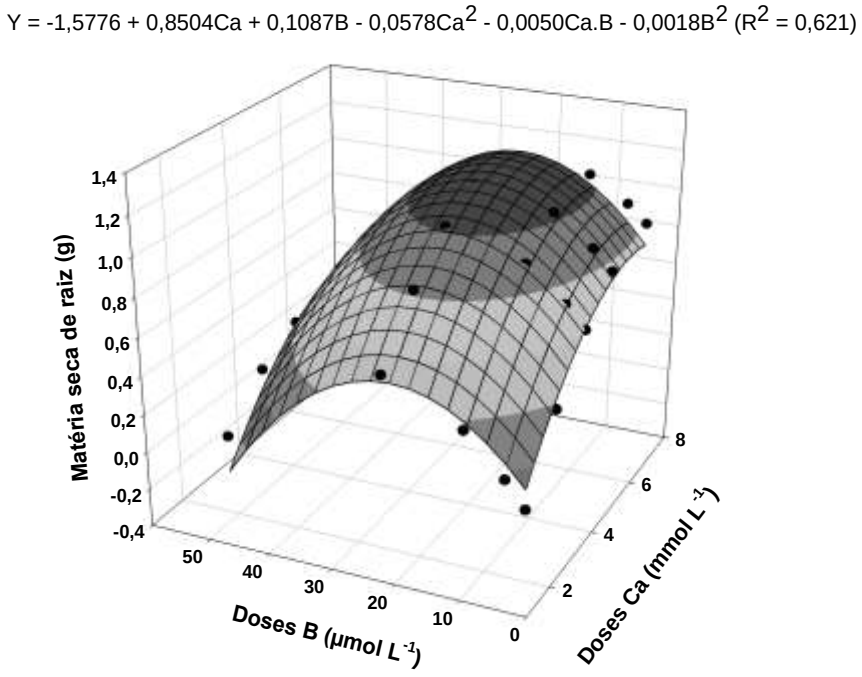

Figura 4 - Matéria seca de raízes das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

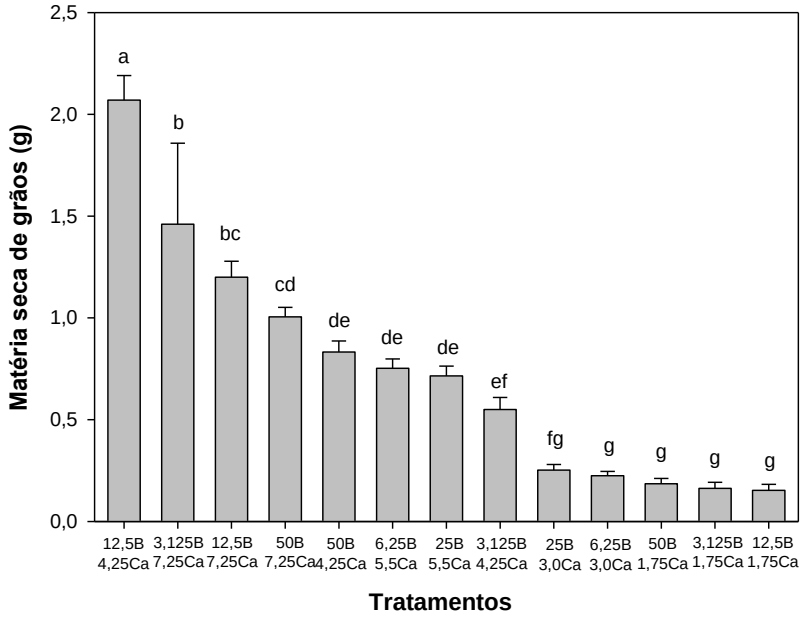

Figura 5 - Produção de matéria seca de grãos de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

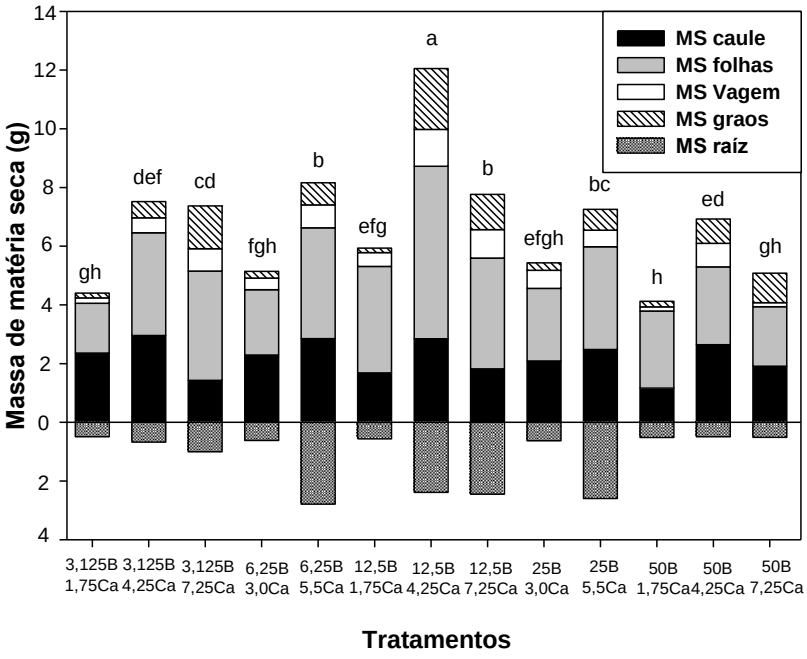

Figura 6 - Acúmulo total de matéria seca em plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

[a]Médias seguidas por letras distintas, referentes à produção total de massa seca das plantas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.2 Avaliação da atividade da nitrogenase

Com relação à avaliação bioquímica da fixação biológica de N_2 atmosférico, por meio da determinação indireta da atividade da nitrogenase (N-ase) nas raízes de uma das plantas cultivadas em solução nutritiva ao atingir o estádio fenológico R5 (70 dias após o inicio dos tratamentos), observou-se que a combinação de doses de Ca e B influenciaram a atividade da enzima nas raízes (Figura 7). Corroborando com trabalho de Redondo-Nieto et al. (2003) que mostraram como a fixação biológica de N_2 (medida indiretamente através da atividade da N-ase) foi fortemente influenciada pelos níveis de ambos os nutrientes na solução nutritiva.

Os maiores valores para a atividade da enzima foram observados nas maiores doses de Ca e B (7,25 mmol L^{-1} e 50 µmol L^{-1}, respectivamente) (Figura 7). El-Hamdaoui et al. (2003), e Bolaños et al. (2006) encontraram resultados semelhantes aos verificados nesta pesquisa, em plantas de *Pisum sativum* submetidas ao estresse salino, e concluíram que o fornecimento de Ca e B recuperou o balanço nutricional nas plantas, proporcionando um melhor desenvolvimento e funcionamento dos nódulos radiculares. Diferentemente de Carpena et al. (2000) e Bolaños et al. (1994), os quais concluíram que altos suprimentos de B podem contribuir para uma baixa atividade da nitrogenase.

Por sua vez as combinações com as menores doses de Ca, independente da dose de B (*e.g.*, 1,75Ca-3,125B e 1,75Ca-12,5B) foram as que causaram uma maior inibição na atividade da enzima, cerca de 90% de redução (Figura 7). Isto confirma os resultados de Andreev et al. (2000), em estudo com plantas de fava, mostrando que quanto maior o tempo que as plantas ficam expostas à um meio ausente em Ca, maior é a redução da atividade da nitrogenase. De acordo com os resultados, a conclusão é que estes efeitos observados são devido ao esgotamento do Ca nos tecidos das plantas. Por outro lado, Streeter (1998) avaliando uma possível influencia da distribuição de Ca nas células infectadas dos nódulos de plantas de soja, mostrou que uma redução significativa na atividade da nitrogenase ocorre quando a concentração de Ca nos meios de cultivo eram maiores que o ótimo. Da mesma forma que os resultados apresentados por Redondo-Nieto et al. (2003), os quais também constataram redução na atividade da N-ase conforme se aumentava a dose de Ca no meio de cultivo.

Ao passo que Bolaños et al. (1994), demonstrando a essencialidade do B para o processo de fixação de N pelas plantas de ervilha argumentaram que situações de deficiência de B, igualmente, resultaram em forte inibição da atividade da N-ase (cerca de 80%), afirmando que nestas situações os danos na estrutura e função dos nódulos foram causados, provavelmente, pela degeneração das paredes celulares destes, incluindo a perimembrana do bacteroide. Lesões nas paredes celulares facilitam a difusão de oxigênio livre pelos nódulos, e este é prejudicial à enzima nitrogenase (AZEVEDO et al., 2002). As menores doses de B fornecidas às plantas na solução nutritiva, possivelmente não foram suficiente para garantir a proteção das paredes dos envelopes que guardam a enzima, extremamente sensível ao oxigênio livre. Segundo Cakmak e Römheld (1997), o B interage com grupos OH^- dos glicopeptídeos na camada de polissacarídeos do envelope, e desta maneira contribui para o fortalecimento da barreira quanto à difusão do O_2. Ainda, segundo Dalton et al. (1986) verificaram em nódulos de soja, a deficiência de B causa a diminuição do nível de ácido ascórbico das células, o qual tem como uma de suas funções proteger a enzima nitrogenase contra este oxigênio livre tóxico, o que pode agravar ainda mais a situação.

Resultados estes que foram confirmados a partir do obtido por Zehirov e Georgiev (2003), em estudo com plantas de soja, que encontraram resultados similares quanto à redução da atividade da N-ase em condições de omissão de B durante um período do desenvolvimento vegetal, especialmente quando este ocorreu antes do florescimento. Enquanto que Abreu et al.

(2012), em estudo com leguminosas (alfafa, ervilha, e soja), verificaram inibição de cerca de 90% da atividade da N-ase em situações onde o fornecimento de B às plantas era baixo.

De modo geral, conforme se aumentaram as doses de Ca e B fornecidas às plantas na solução nutritiva, a atividade da enzima também incrementou, provavelmente devido à importância do B e do Ca para a manutenção da estrutura da parede celular dos nódulos, bem como para o adequado funcionamento destes. Foi observado ainda que o fornecimento de doses mais altas de Ca na solução nutritiva amenizou os efeitos negativos da deficiência de B no desenvolvimento e funcionamento dos nódulos. Possivelmente na base destes efeitos, está que a adição de Ca na solução nutritiva pode ter provocado um aumento no teor de B nos nódulos destas plantas, e desta maneira preveniu uma deficiência severa de B (REDONDO-NIETO et al., 2003).

Constatou-se relação direta entre a atividade da N-ase e a massa fresca de nódulos das raízes (Figura 8), o que se mostra condizente com os resultados obtidos em relação à atividade da N-ase, já que a quantidade e o tamanho dos nódulos (responsáveis por determinar a massa de nódulos), bem como a sua funcionalidade são os fatores que vão determinar uma maior ou menor eficiência na fixação biológica do N_2 (GONZÁLEZ-GUERRERO et al., 2014).

Foi calculada ainda a atividade específica da nitrogenase, por meio da razão entre a atividade da nitrogenase e a massa fresca de nódulos de cada parcela. Porém, para este caso não houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as doses de Ca e B. Todavia, a maior média observada foi de 4,35 µmoles C_2H_4 g nódulos^{-1} h^{-1}, com a combinação de doses de 5,5Ca e 6,25B (Figura 9).

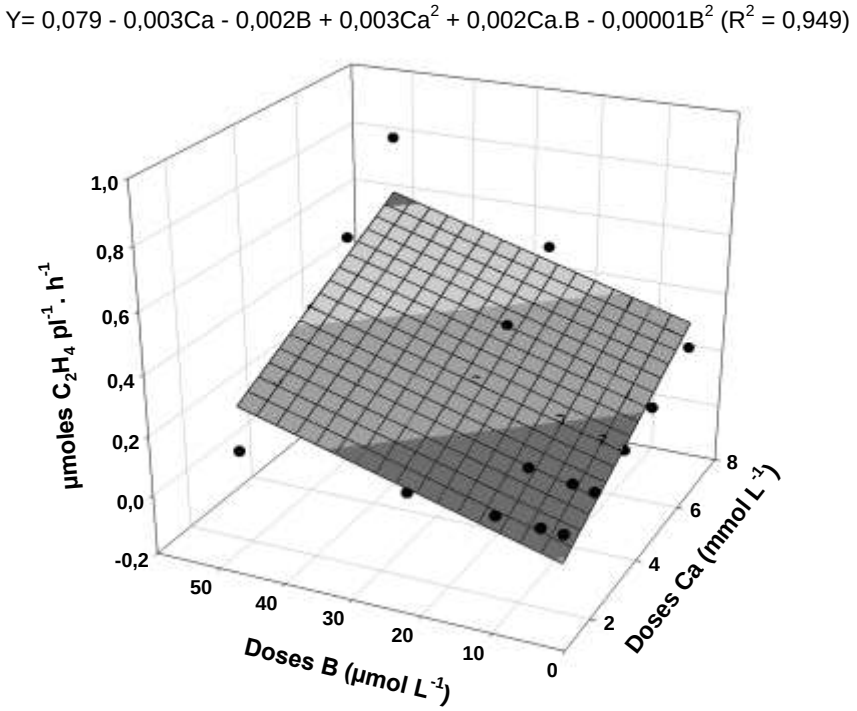

Figura 7. Atividade da nitrogenase (N-ase) efetuada nas raízes das plantas de soja, no estádio fenológico R5 (70 dias após o inicio dos tratamentos), em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva.

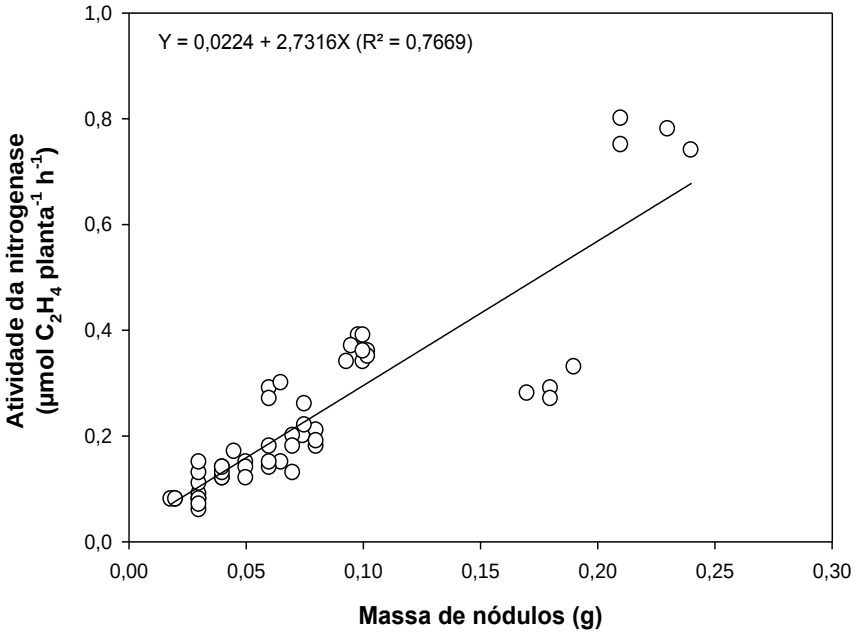

Figura 8 - Relação entre a atividade da nitrogenase (µmol C_2H_4 planta^{-1} h^{-1}) e massa fresca de nódulos das plantas de soja cultivada com combinações de Ca e de B em solução nutritiva, aos 70 dias após o inicio dos tratamentos

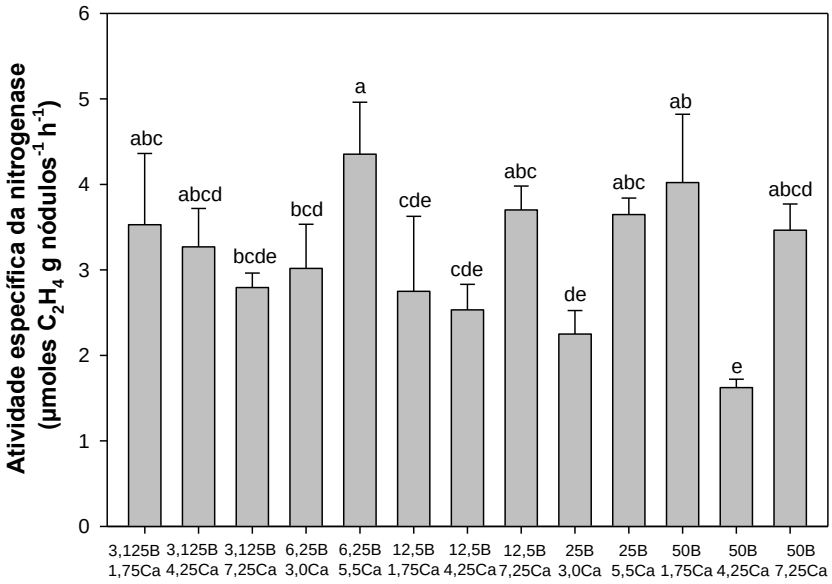

Figura 9. Atividade específica da nitrogenase (N-ase) calculada por meio da razão entre a atividade da nitrogenase e a massa fresca de nódulos de cada parcela das plantas de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva.
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

5.3 Análise de comprimento e superfície de raiz

As análises de comprimento total de raízes mostraram que houve influência significativa das combinações de doses de Ca e B (Figura 10). Do mesmo modo, a interação entre Ca e B para o comprimento total de raízes de roseira cultivar *"easy lover"*foi observada por Shams et al. (2012). Os valores de comprimento total de raízes variaram de 27,4 m até 82,2 m, sendo este valor máximo verificado na combinação de doses de 7,25 mmol L^{-1} de Ca e 12,5 µmol L^{-1} de B (Figura 10). A área superficial total das raízes também foi influenciada pela combinação de doses entre o Ca e o B (Figura 11). O maior valor encontrado, de 844,7 cm^2, foi verificado nas plantas cultivadas com a mesma combinação de doses de Ca e B (7,25Ca e 12,5B) que favoreceu maior comprimento total radicular (Figura 11). Para a combinação de doses de 1,75Ca e 3,125B foi observada uma redução de cerca de 70% e 60% para comprimento e área superficial das raízes, respectivamente. De maneira distinta, Shams et al. (2012) verificaram influência das doses de Ca e B separadamente para este atributo, porém sem interação entre elas. Já Manfredini (2008), estudando combinações de Ca e de B para plantas de soja-perene (*Neonotonia wightii*), relatou que houve apenas influencia para as doses de B tanto para comprimento de raízes, como para área superficial. Portanto, deve-se considerar neste contexto, a exigência nutricional de cada espécie vegetal, as quantidades

fornecidas dos nutrientes, bem como a proporção destas quantidades, assim como a idade fisiológica na ocasião da avaliação morfológica.

Vale ressaltar o aumento nos valores dos atributos morfológicos das raízes, conforme aumento nas doses de Ca fornecidas às plantas deficientes em B. Desta forma, deve-se destacar a observação de que o aumento das quantidades de Ca na solução nutritiva reduziu os efeitos negativos do baixo suprimento de B às plantas. O boro, assim como o Ca são muito importantes para que o elongamento das células radiculares seja adequado, já que as deficiências destes nutrientes na solução nutritiva inibem rapidamente o crescimento das células do tecido radicular (GUPTA, 1993; MENGEL; KIRKBY 2001; MARSCHNER, 2012).

Foram obtidos ainda valores médios de diâmetro das raízes analisadas, porém não houve interação entre as combinações de doses de Ca e B, sendo o valor médio calculado de 0,34 mm. O valor mais baixo apresentado correspondeu a cerca de 88% do maior valor verificado, assim sendo também não houve diferenças significativas entre os tratamentos. Diferentemente do que foi visto em rosas cultivar *"easy lover"* por Shams et al. (2012), os quais relataram que as doses de B influenciaram o diâmetro das raízes estudadas.

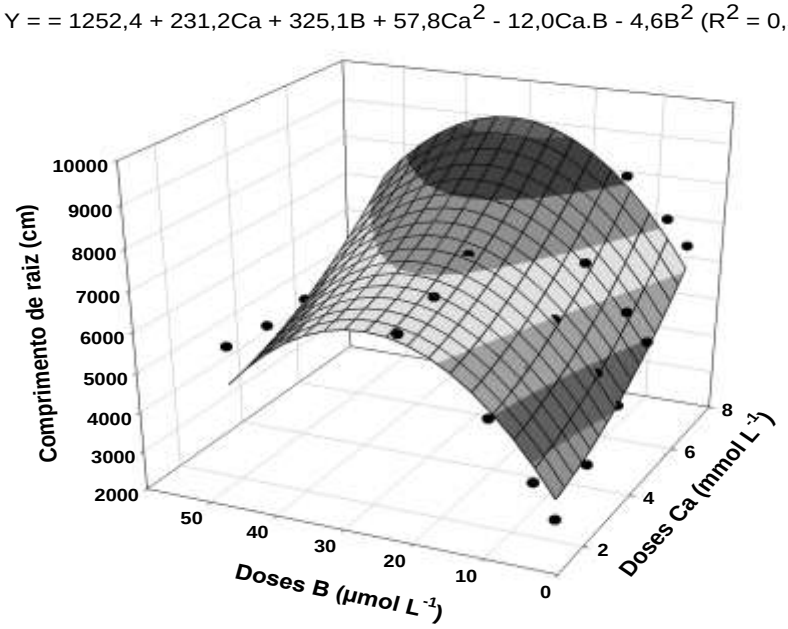

Figura 10 - Comprimento total das raízes (cm) de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

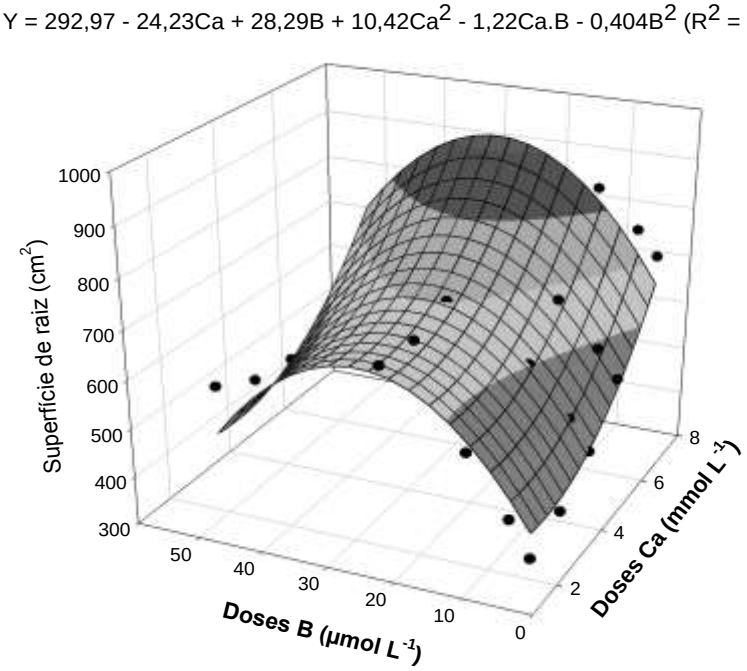

Figura 11 - Superfície total de raízes (cm^2) de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

5.4 Diagnose foliar ao final do experimento

5.4.1 Cálcio

As concentrações de Ca nas folhas colhidas ao final do experimento foram influenciadas pelas combinações de doses de Ca e de B na solução nutritiva (Figura 12). Os valores médios variaram de 21,3 a 97,7 g kg^{-1} da combinação com as mais baixas doses de Ca e de B para a mais alta combinação de Ca e de B, respectivamente (Figura 12).

Os tratamentos com as maiores doses de Ca foram os responsáveis pelas maiores concentrações do elemento nas folhas, havendo uma redução significativa conforme se diminuía o fornecimento de Ca nos tratamentos na solução nutritiva. Resultados semelhantes foram observados por Carpena et al. (2000) em parte aérea de plantas de ervilha (*Pisum sativum*). É possível observar ainda que conforme as doses de B foram incrementadas na solução nutritiva, a concentração de Ca no tecido também aumentou, representando uma relação de sinergismo entre estes nutrientes (KANWAL et al., 2008; FRANCO et al., 2012; SHAMS et al., 2012). As possíveis bases para esse sinergismo é que baixas concentrações de B na solução nutritiva reduzem a atividade da adenosina trifosfatases (ATP-ases) (MALAVOLTA et al., 1997), assim a disponibilidade de energia para que ocorra a absorção

iônica ativa é reduzida (MATAS et al., 2009), e consequentemente o Ca absorvido ativamente (menor parte do Ca absorvido) também diminui.

O Ca é majoritariamente absorvido na ponta das raízes (tecidos mais novos e ativos), deste modo obter um sistema radicular bem ramificado é essencial (CLARKSON, 1984), e provavelmente com o aumento das doses de B na solução nutritiva ocorreu um aumento no numero de raízes produzidas (JOSTEN; KUTSCHERA, 1999), favorecendo a absorção do Ca disponível, o que pode ser confirmado pelo incremento do comprimento total de raízes das plantas de soja com o aumento no suprimento de B, na solução nutritiva, até a concentração de 25 µmol L^{-1} (Figura 10). Desta maneira ao aumentar o fornecimento de B às plantas, a absorção de Ca pelas raízes também aumenta.

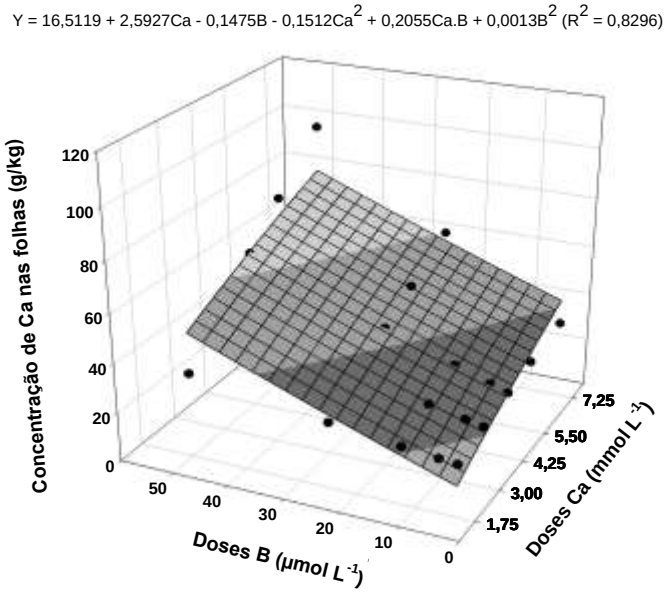

Figura 12 - Concentrações de Ca nas folhas das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

Quanto às concentrações do elemento nos caules e nas raízes, não foi constatada interação significativa ($p < 0,05$) das doses de Ca e de B. As concentrações nas raízes variaram de 8,3 a 13,8 g kg^{-1}, da combinação das menores doses de Ca e B para a combinação das maiores doses de Ca e B, respectivamente. Nos caules a variação observada foi de 6,9 a 30,8 g kg^{-1} (Figuras 13 e 14). Com o aumento do fornecimento de B às plantas, verificou-se incremento na concentração de Ca nas raízes, possivelmente pelas mesmas razões daquelas observadas para as folhas. Streeter (1998) em trabalho com soja, bem como Kanwal, et al. (2008) em estudo com milho (*Zea mays*), avaliando o efeito de doses menores de Ca, observaram resultados similares para concentração de Ca em parte aérea.

De maneira geral, os valores das concentrações de Ca no tecido vegetal aumentou à medida que se incrementava a disponibilidade na solução nutritiva. Enquanto que nas plantas submetidas ao tratamento com as maiores doses de Ca e B na solução nutritiva, provavelmente ocorreu um efeito de concentração do nutriente, já que produção de massa seca de folhas foi bem reduzida (Figura 3).

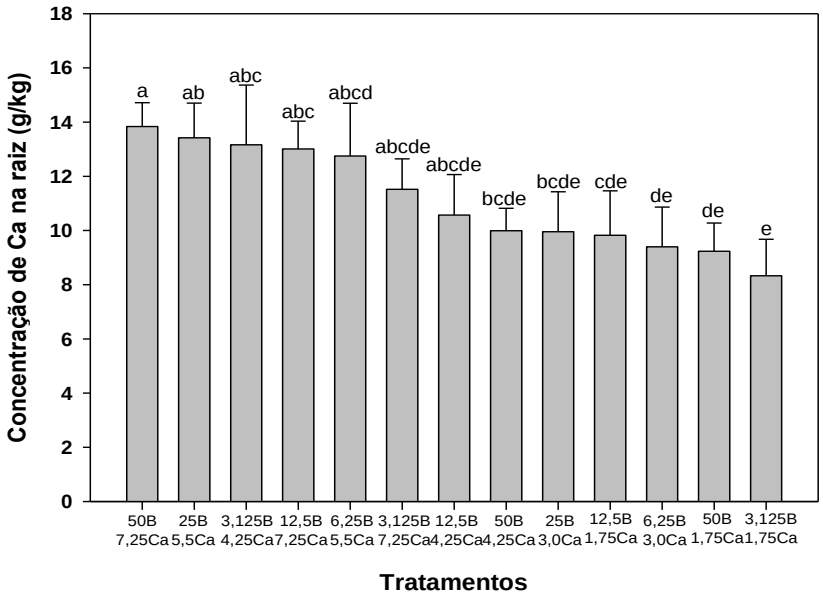

Figura 13 - Concentração de Ca nas raízes das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

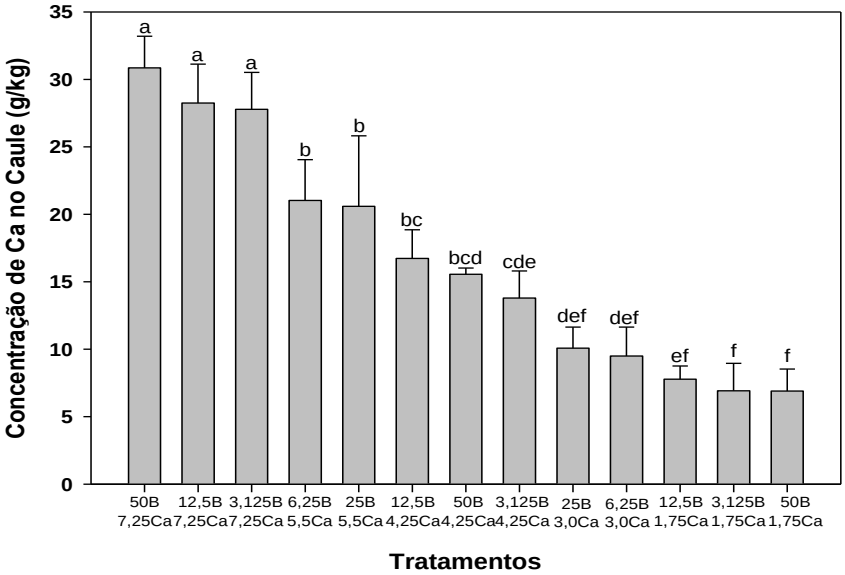

Figura 14 - Concentração de Ca no caule das plantas de soja, cultivar BRS 284, em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

Quanto às quantidades acumuladas de Ca nas plantas, observou-se interação para a combinação de doses de Ca e B para a quantidade total de Ca nas folhas, caules e raízes, bem como para toda a planta (Figura 15).

Possivelmente devido às diferenças verificadas na produção de biomassa seca pelas plantas quando cultivadas com os distintos tratamentos na solução nutritiva, já que houve interação entre as combinações de Ca e B para a produção de matéria seca de folhas, caules e raízes, há relação com os resultados de acúmulo de Ca. Interessante notar que por essa razão, os tratamentos responsáveis por apresentarem os maiores valores de concentrações de Ca nas plantas, não foram os mesmos que proporcionaram a maior quantidade acumulada dos nutrientes – considerando-se os efeitos de diluição e de concentração que ocorrem na planta (HERMANS et al., 2006). O maior acúmulo de Ca pelas folhas foi observado com as doses de Ca de 7,5 mmol L^{-1} e 12,5 µmol L^{-1} de B (Figura 15), as quais também favoreceram o maior acúmulo de matéria seca de folhas (Figura 3), representando um incremento de 160% em relação àquele obtido na combinação das menores doses de Ca e B fornecidas na solução. No caule, os valores acumulados de Ca variaram de 4,8 a 58,4 mg/vaso (Figura 15), sendo que os maiores valores foram encontrados em combinações com as doses mais altas de Ca (mmol L^{-1}: 5,5Ca e 7,25Ca). Nas raízes também houve grande variação, e os menores valores foram verificados com o fornecimento das menores doses de Ca (Figura 15). Para o total acumulado pelas plantas, pode-se constatar a importância do equilíbrio no fornecimento de Ca e B na solução nutritiva para o acúmulo de Ca pelas plantas – relação Ca:B na solução de 340-1, pois nas condições em que houve alto suprimento de um nutriente e baixo do outro o acúmulo de Ca foi reduzido pelas plantas (Figura 16).

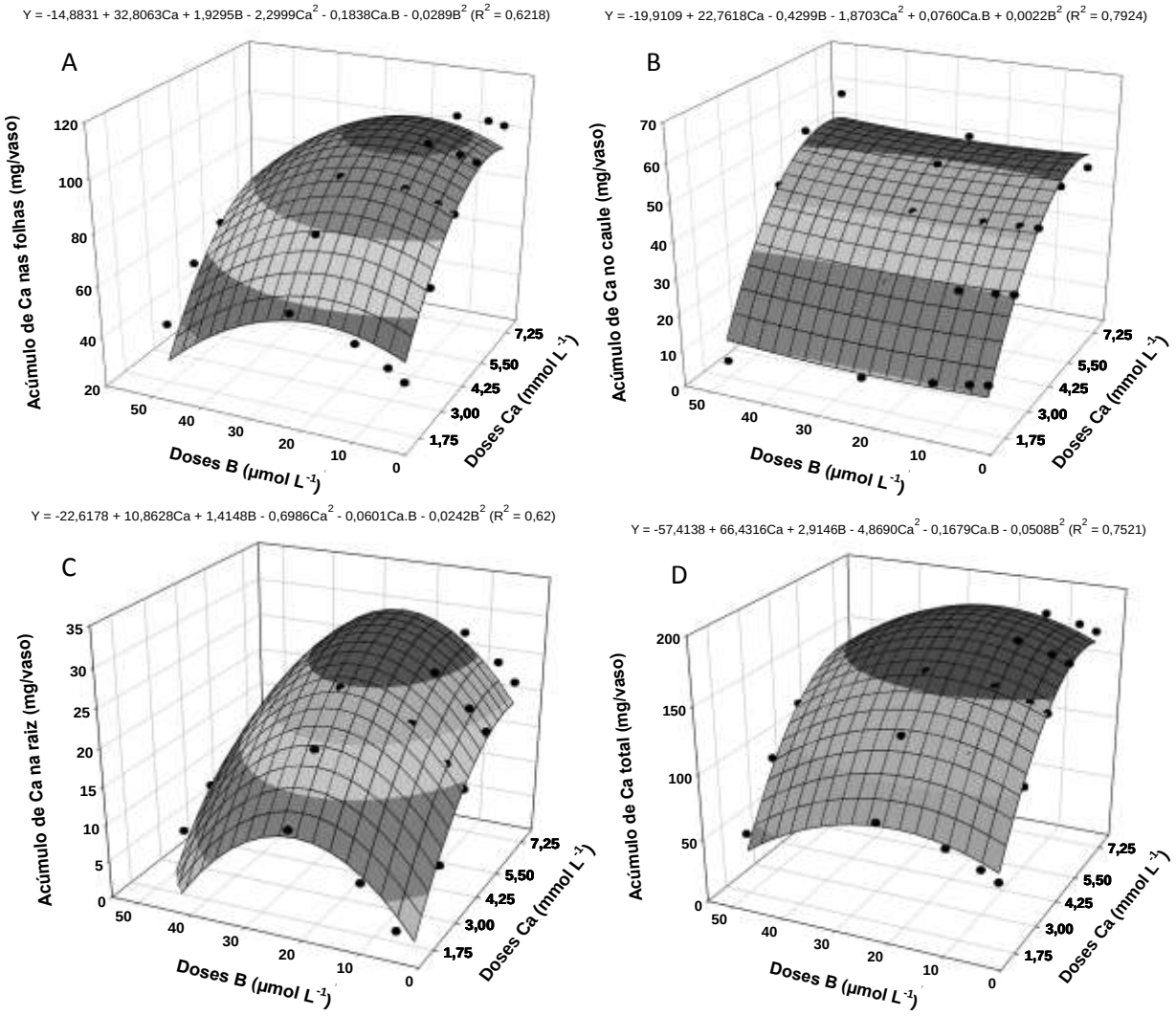

Figura 15 - Acúmulo de Ca nas folhas (A), caules (B), raízes (C), e acúmulo total [na planta inteira] (D) da soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

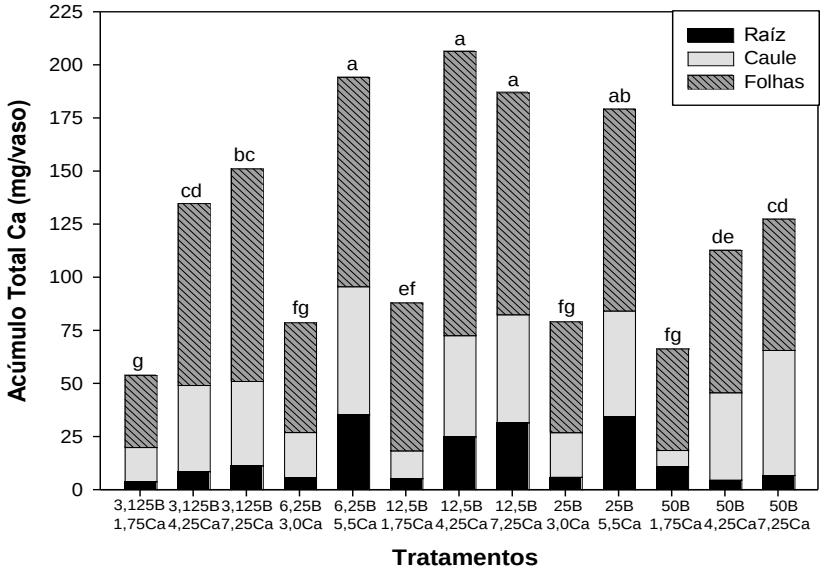

Figura 16 - Acúmulo total de Ca nas partes das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento
[a]Médias seguidas por letras distintas, referentes à ao acúmulo total de Ca nas plantas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

5.4.2 Boro

Não foi verificada interação significativa ($p < 0,05$) entre as doses de Ca e B para as concentrações de B nas folhas, raízes e caule. Houve um incremento de cerca de 120% na concentração de B nas folhas com o fornecimento da maior dose de B em relação à menor dose fornecida, com os valores variando de 50,9 a 23,1 mg kg^{-1}, respectivamente (Figura 17).

As concentrações nas raízes e caules variaram de 19,1 a 29,8 mg kg^{-1}, e de 16,2 a 33,7 mg kg^{-1}, respectivamente, para as doses de 3,125 a 50 µmol L^{-1} de B (Figuras 18 e 19). Podemos perceber que conforme se incrementou a disponibilidade do nutriente na solução nutritiva, a sua concentração nos tecidos analisados também aumentou, independentemente das doses de Ca fornecidas às plantas. Este aumento torna-se ainda mais expressivo quando a dose de B de 50 µmol L^{-1} é aplicada, o que corrobora o trabalho de Shams et al. (2012), os quais verificaram incremento significativo na concentração de B em folhas e pétalas de rosa cultivar "*easy lover*", quando submetida à mais alta dose de B (75 µmol L^{-1}) na solução nutritiva. Este elevado teor de B nas folhas das plantas de soja já foi relatado em trabalhos anteriores (OERTLI; ROTH, 1969; YAMAGISHI; YAMAMOTO, 1994). Adicionalmente, o maior acúmulo de B na parte aérea das plantas pode ocorrer devido a sua pouca mobilidade quanto à redistribuição, consequentemente sua alocação pela planta segue principalmente o

fluxo de transpiração, sendo fortemente influenciado pela perda de água pelas folhas durante o cultivo, e desta forma dificilmente será transportado para as raízes após se alocar nas folhas (TAKANO et al., 2008; MARSCHNER, 2012).

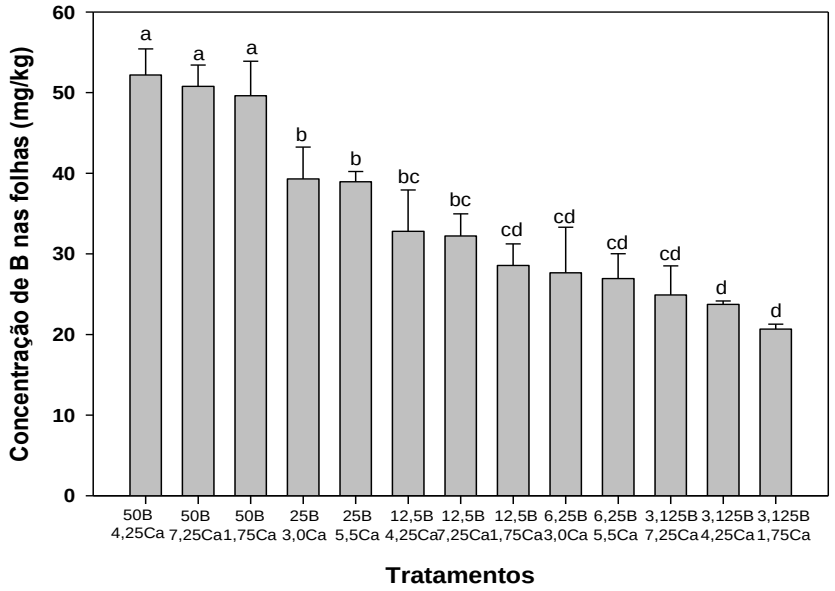

Figura 17 - Concentração de B nas folhas das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

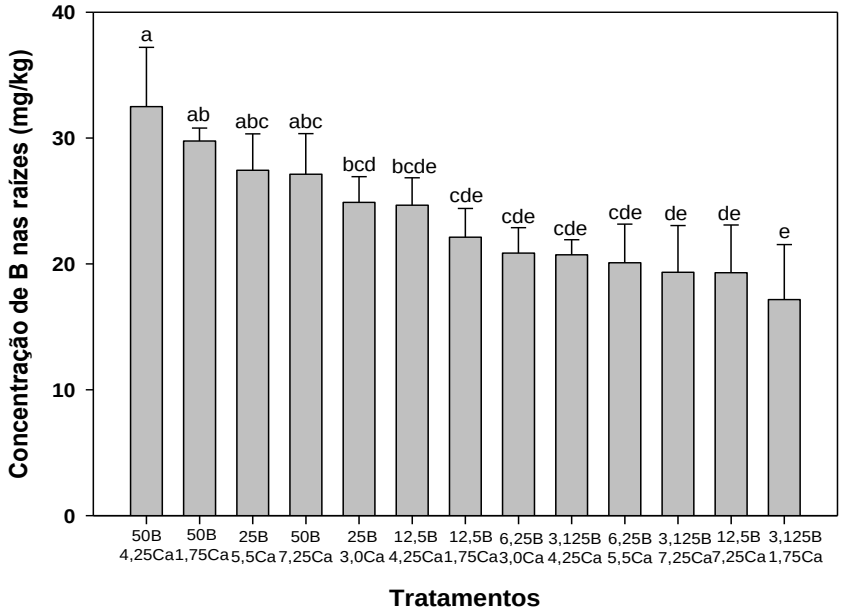

Figura 18 - Concentração de B nas raízes das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

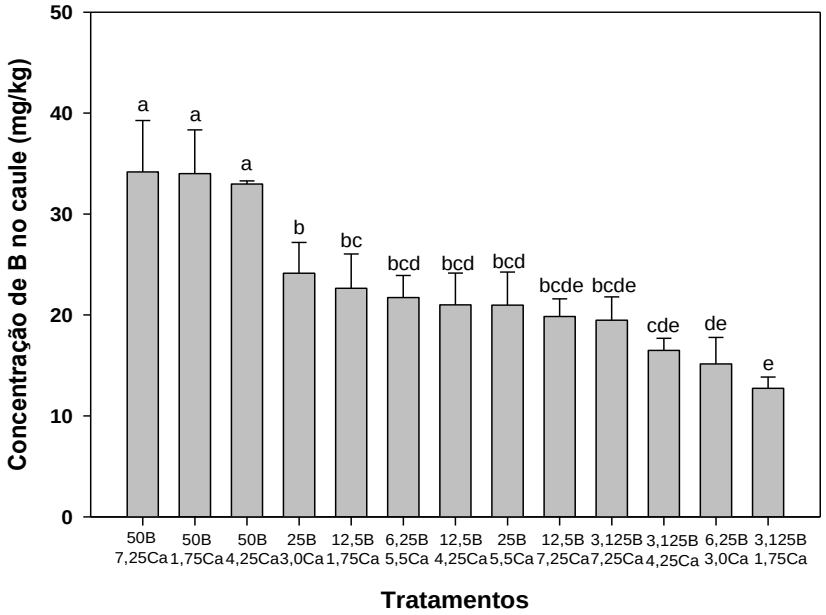

Figura 19 - Concentração de B no caule das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

Touchton et al. (1980), avaliando o efeito de quatro doses de boro (0; 0,56; 1,12 e 2,24 kg ha^{-1}) na cultura da soja, verificaram aumentos na concentração de boro nos tecidos foliares, tal como Ishida et al. (1988) em estudo com Ca e B aplicado em crisântemo, e Santos et al. (2004) em estudo sobre a nutrição de alfafa (*Medicago sativa*) submetida a doses de B. De modo que, Kanwal et al. (2008), estudando os efeitos doses de Ca e B na nutrição de plantas de milho; Franco et al. (2012), avaliando combinações de doses de Ca e B em mamona (*Ricinus communis*); e Shams et al. (2012), estudando as combinações de doses de B e Ca no crescimento de plantas de rosa cultivar "*easy lover*", constataram aumentos na concentração de B nos tecidos analisados conforme se aumentava o fornecimento de B às plantas. Por outro lado verificaram efeito antagônico do Ca quanto a concentração e acúmulo do B em parte aérea; resultados prévios de Tisdale et al. (1985) e Carpena et al. (2000), também mostraram isso. Possivelmente associado ao efeito de diluição, como resultado do crescimento das plantas e produção de biomassa (JARRELL; BEVERLY, 1981).

Houve interação entre as combinações de doses de Ca e B para o acúmulo de B nas folhas caule e raízes (Figura 20). A combinação de doses de Ca de 5,5 mmol L^{-1} e de B de 25 µmol L^{-1} promoveu maior valor acumulado de B nas folhas (Figura 20), sendo que provavelmente ocorreu um efeito de diluição do nutriente já que a maior produção de biomassa foi verificada nesta combinação (Figura 3). Para o acúmulo no caule os maiores valores foram observados com a combinação de doses de 4,25Ca e 50B representando um

acréscimo de 230% em relação à combinação de 1,75 mmol L^{-1} de Ca com 12,5 µmol L^{-1} de B (Figura 20).

Para as quantidades acumuladas nas raízes, foi constatada grande variação nos acúmulos em função dos tratamentos, de 3,18 a 53,9 µg/vaso, sendo o maior valor verificado quando as doses de 5,5Ca e 25B foram fornecidas às plantas na solução nutritiva (Figura 20). Neste caso, além da alta disponibilidade de B às plantas, novamente é possível verificar o efeito de diluição do nutriente devido à grande produção de massa seca de raízes (Figura 4). Em adição, quanto ao acúmulo total de B pelas plantas, foram observados maiores valores obtidos novamente na combinação de 4,25Ca e 12,5B, ou seja, as doses recomendadas para Ca e B. Por sua vez, a combinação das menores doses de Ca e B (1,75Ca e 3,125B) proporcionou o menor valor acumulado de B nas plantas (Figura 21). Desta maneira, mais uma vez é ressaltada a importância de se fornecer quantidades equilibradas dos nutrientes em solução para sua absorção e acúmulo e utilização pela planta. Pode-se observar ainda que houve relação direta e positiva entre as quantidades totais de Ca e de B acumuladas nas plantas, com o incremento das doses de ambos, o que pode significar mais um indício da interação existente entre os nutrientes.

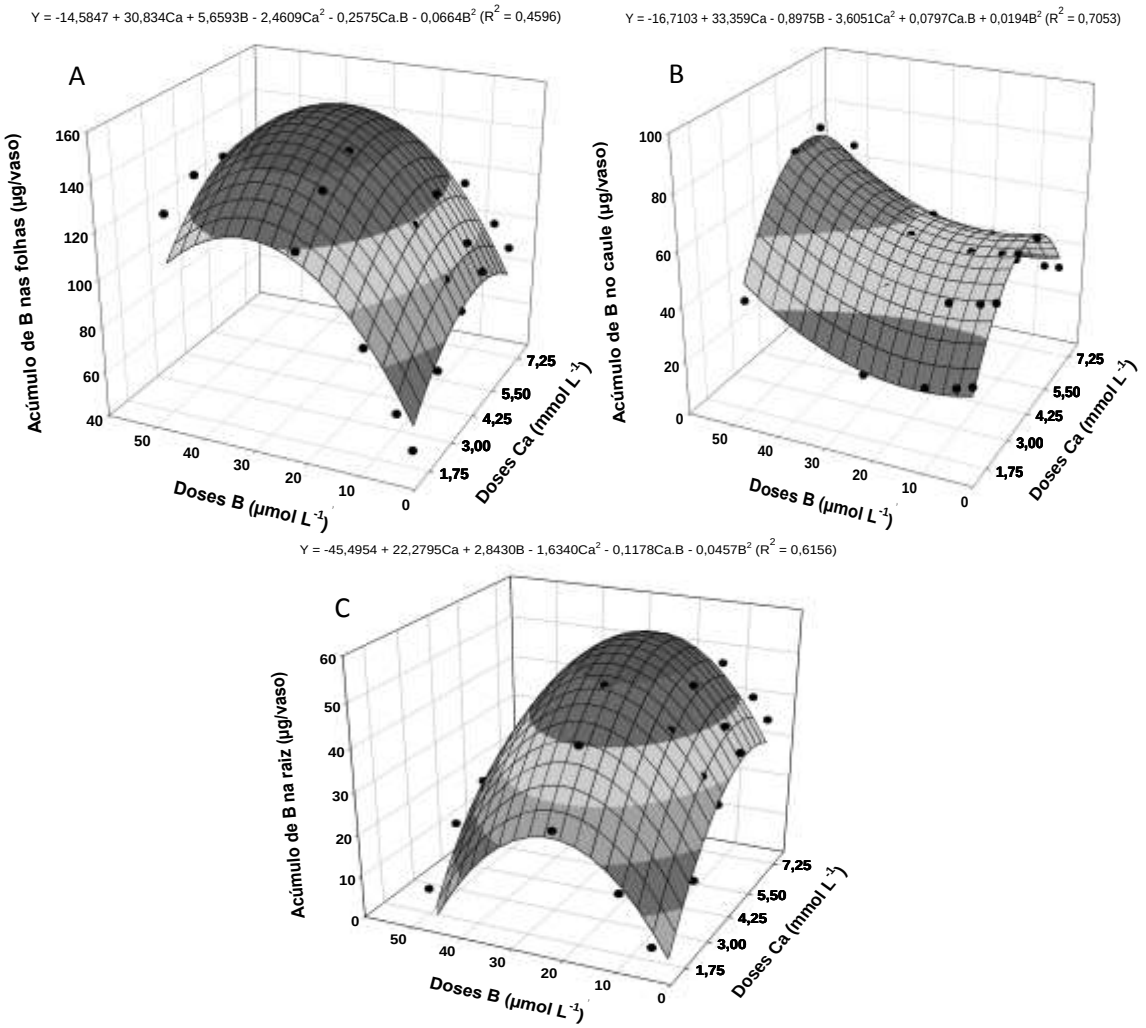

Figura 20 - Acúmulo de B nas folhas (A), caules (B), raízes (C) de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

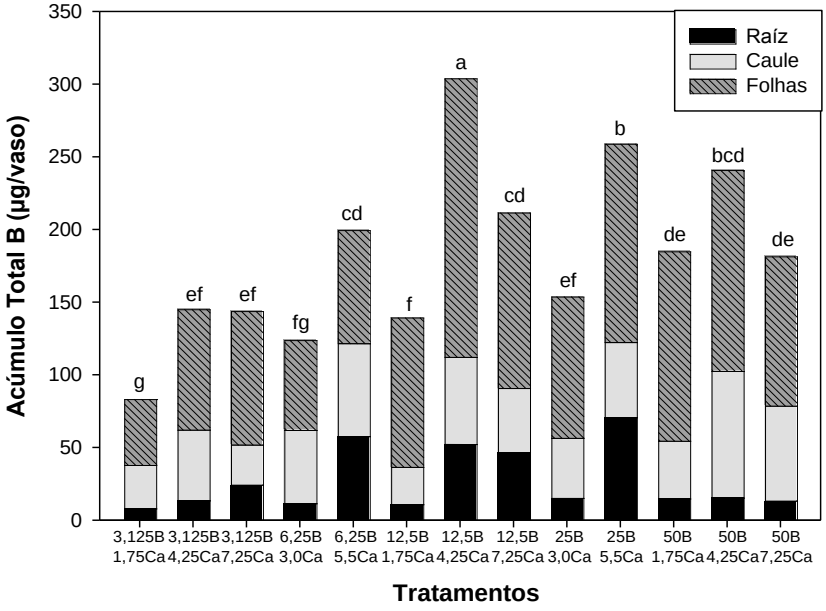

Figura 21 - Acúmulo total de B nas das plantas de soja, cultivar BRS 284, em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento
[a]Médias seguidas por letras distintas, referentes à ao acúmulo total de B nas plantas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Ao avaliarmos quimicamente o tecido foliar, determinamos os teores de Ca e B nas folhas, ao relacionar esses valores obtidos nas plantas que apresentaram a maior produção de matéria seca, encontramos uma relação Ca:B nas folhas de aproximadamente 700:1 (27 g kg^{-1} Ca e 39 mg kg^{-1} B). Esta relação poderia ser declarada como uma razão Ca:B adequada para prever o desenvolvimento da soja 'BRS 284', bem como pode ser considerado como parâmetro indicativo de nutrição adequada das plantas. Da mesma maneira, Franco et al. (2012) encontraram uma relação Ca:B de aproximadamente 500:1 (16 a 20 g kg^{-1} Ca e 30 a 40 mg kg^{-1} B) nas folhas utilizadas para diagnose de mamona, cultivada em solução nutritiva para produção máxima de matéria seca e frutos. Todavia, Kanwal et al. (2008) estimaram uma relação Ca:B de apenas 30:1 na parte aérea de *seedlings* de milho cultivados em solução nutritiva, para obtenção de 95% da produção máxima de matéria seca pelas plantas. Estas diferenças entre as relações Ca:B observadas podem ser explicadas devido às diferentes exigências nutricionais existentes entre as espécies.

Destaca-se novamente a importância de se fornecer quantidades equilibradas dos nutrientes na solução nutritiva, já que os demais tratamentos (responsáveis por menores produções de matéria seca de folhas) apresentaram valores para a relação Ca/B bastante superiores ou inferiores a este, o que pode indicar um possível desequilíbrio entre as quantidades de Ca e B absorvidas e alocadas nas folhas.

Tanto para o Ca como para o B, podemos concluir que conforme aumentamos a disponibilidade destes nutrientes (concentrações) na solução nutritiva, há incremento na concentração destes nutrientes nos tecidos analisados. Neste mesmo sentido, observa-se que as quantidades acumuladas no tecido estão diretamente relacionadas à produção de biomassa, em função dos tratamentos. Assim sendo, as combinações de doses que apresentaram o maior equilíbrio entre as quantidades disponíveis dos nutrientes na solução nutritiva e a de produção de matéria seca total das plantas foram as responsáveis pelo maior acumulo de nutrientes na planta inteira – observando-se uma relação Ca:B na solução de 340:1.

5.4.3 Potássio e Magnésio

Tanto o K, quanto o Mg foram determinados nos tecidos analisados devido a relação existente entre estes elementos e o Ca, por um lado chamado "efeito Viets" (entre o Ca e o K) (VIETS, 1944), e por outro a inibição competitiva de absorção (entre o Ca e o Mg) (OZAKI et al., 2005).

Não houve interação significativa entre a combinação de doses de Ca e B para as concentrações de Mg na parte aérea e raiz. Os valores médios nas folhas variaram de 7,2 a 6,2 g kg^{-1}, e nas raízes de 2,5 a 1,8 g kg^{-1}, correspondendo aos decréscimos de 14% e 28%, respectivamente, da menor para a maior dose fornecida. As diferenças observadas nos valores de concentração de Mg nas folhas, caules e raízes de soja em função da combinação de doses de Ca e B não foram significativas (Figuras 22A, B, C). Assim, a redução dos teores de Mg verificada nas plantas com maior suprimento de Ca não foi suficiente para indicar o efeito interiônico de absorção de inibição competitiva entre o Ca e o Mg (CARPENA et al., 2000; MALAVOLTA, 2006; FRANCO et al., 2012). As doses de B não exerceram qualquer influência sobre a concentração de Mg nos tecidos das plantas. Neste sentido, diversos autores também não constataram diferenças significativas nas concentrações de Mg nas partes avaliadas, e corroboram com o resultado (RÁMON et al., 1990; YAMAGISHI; YAMAMOTO, 1994; CARPENA et al., 2000).

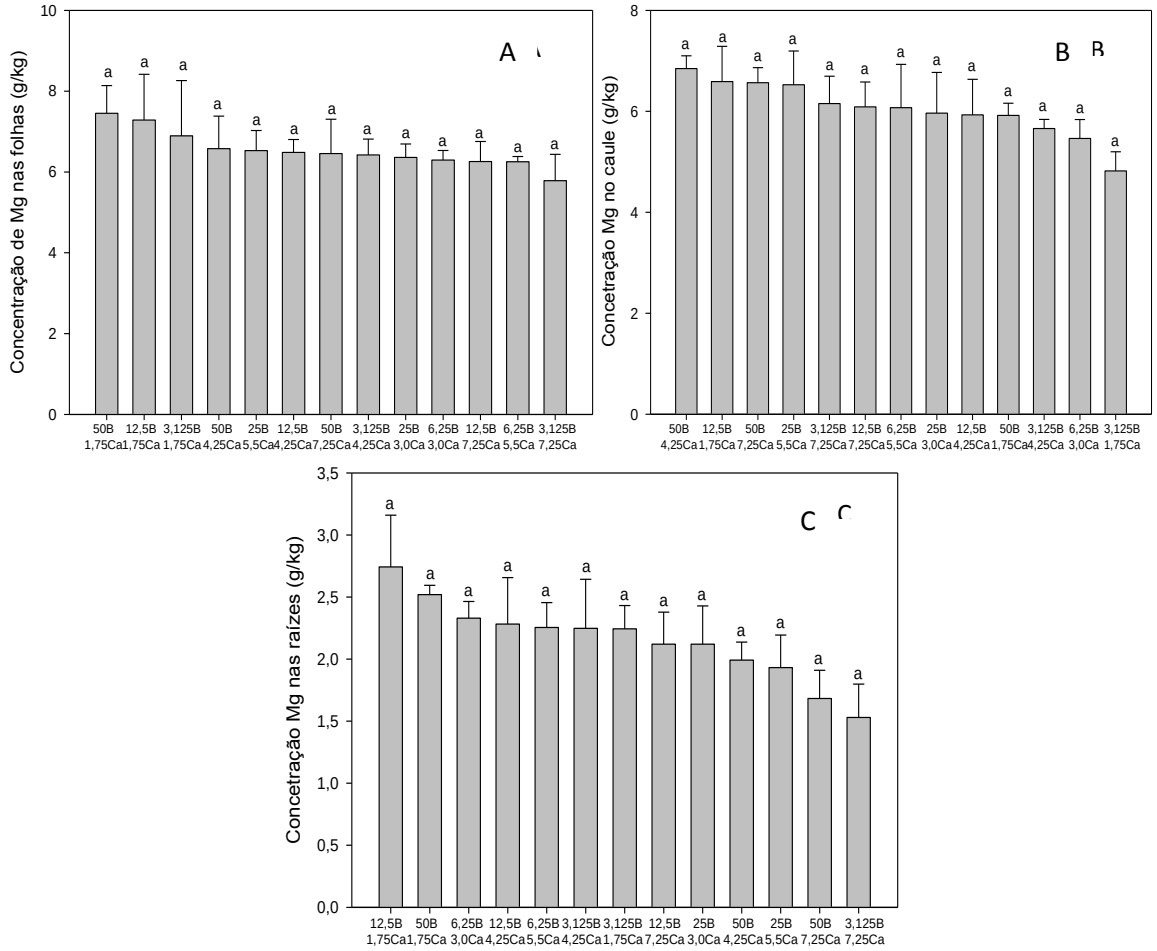

Figura 22 - Concentração de Mg nas folhas (A) e caules (B) e raízes (C) das plantas de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

Ocorreu interação significativa ($p < 0,05$) das doses de Ca e B para as quantidades de Mg acumuladas nas folhas, caules e raízes (Figura 23). Os valores médios de Mg acumulados nas folhas variaram de 15,1 a 40,9 mg/vaso, sendo o menor valor obtido com a combinação das menores doses de Ca e B (1,75Ca e 3,125B), enquanto que a maior média foi encontrada para a combinação de 4,25Ca e 50B (Figura 23). No caule a variação entre os valores observados foi ligeiramente menor, de 3,4 a 16,7 mg/vaso (Figura 23). Quanto ao acúmulo nas raízes, o menor valor foi verificado na combinação da mais baixa dose de Ca com a mais alta dose de B (1,75Ca e 50B), e correspondeu a 5,4% do acumulado pelas raízes submetidas ao tratamento com 5,5 mmol L^{-1} de Ca e 25 µmol L^{-1} de B (Figura 23).

Não houve interação significativa ($p < 0,05$) entre as doses de Ca e B para o total de Mg acumulado nas plantas. Os maiores valores foram observados com o fornecimento da dose de

4,25 mmol L^{-1} de Ca, juntamente com 12,5 µmol L^{-1} de B. A combinação das menores doses de Ca e B (1,75Ca e 3,125B) proporcionou o menor acúmulo do Mg na planta toda. Os valores variaram de 23,9 a 60,0 mg/vaso (Figura 24).

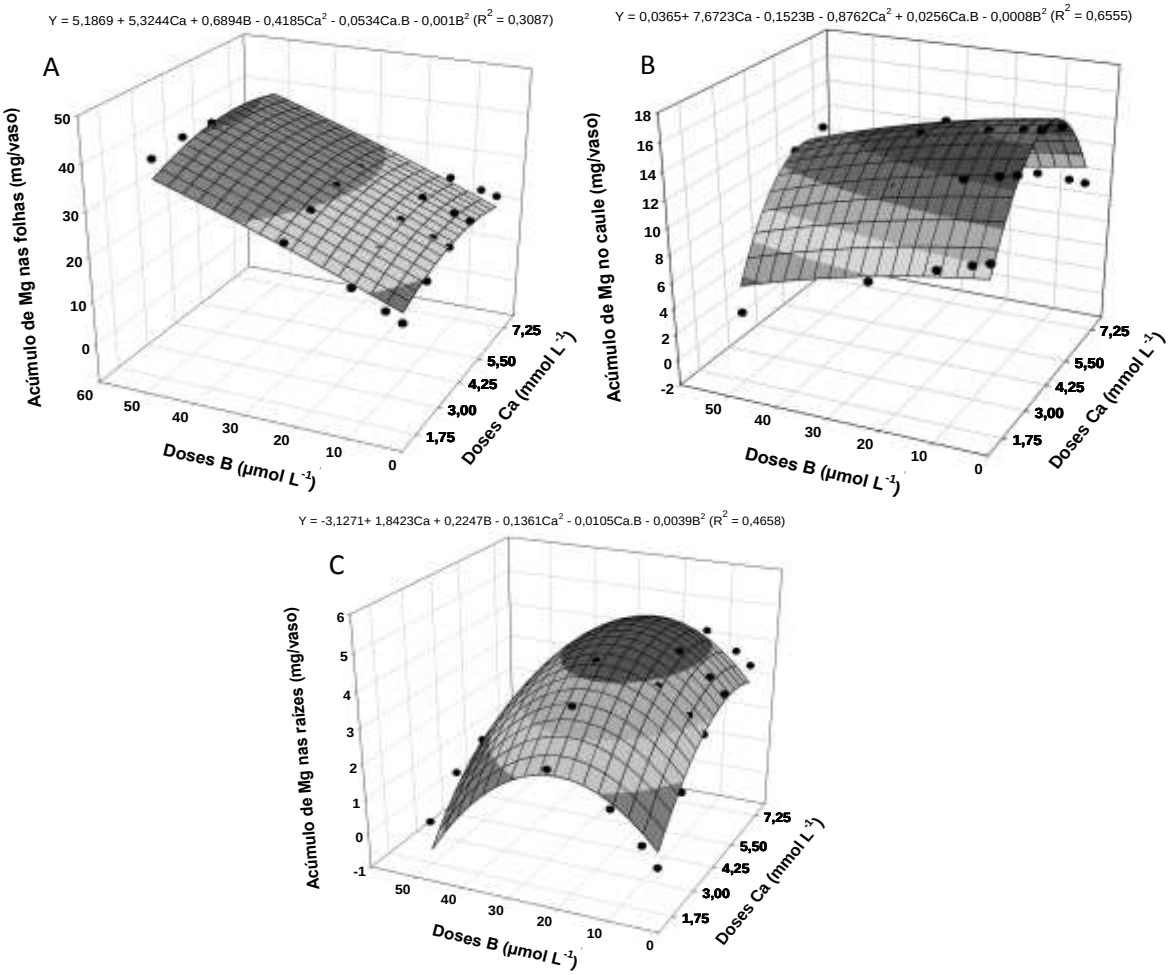

Figura 23 - Acúmulo de Mg nas folhas (A), caules (B) e raízes (C) de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva, ao final do experimento

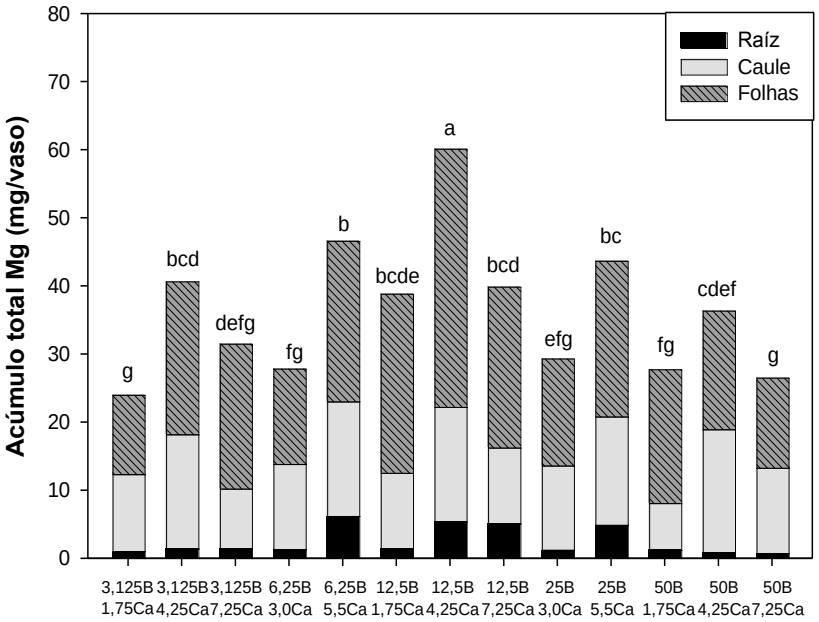

Figura 24 - Acúmulo total de Mg nas das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento

[a]Médias seguidas por letras distintas, referentes à ao acúmulo total de B nas plantas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foi observada interação significativa ($p < 0,05$) entre as combinações de doses de Ca e B para as concentrações de K nas folhas, caules e raízes. Os valores médios variaram de 45,3 a 41,0 g kg^{-1} conforme havia um incremento nas doses de Ca de 1,75 a 7,25 mmol L^{-1}, respectivamente (Figura 25). Há relatos da diminuição da concentração de K nos tecidos vegetais devido ao fornecimento de Ca na solução (como um efeito de diluição), notadamente para altas doses de Ca (MARSCHNER, 2012).

Acontece que possivelmente devido ao efeito de inibição competitiva existente entre os cátions Ca^{2+} e K^{+}, uma maior concentração de K nos tecidos é observada quando o fornecimento de Ca às plantas é reduzido, bem como o contrário também é verdadeiro. Se considerarmos somente o aumento das doses de B na solução nutritiva de 3,125 para 50 µmol L^{-1}, a variação é ligeiramente inferior, de 41,4 a 44,8 g kg^{-1}, respectivamente (Figura 25). Observou-se que as plantas dos tratamentos com a menor dose de B (3,125B) apresentaram uma concentração de K semelhante observada nas plantas com a dose intermediária de B (12,5B). Isto talvez esteja relacionado com o efluxo de K em situações de baixa disponibilidade de B, como explicaram Smyth e Dugger (1980); e Tang e Dela Fuente (1986). Porém de acordo com os resultados do presente trabalho, o efeito de inibição competitiva entre o K e Ca se mostrou mais importante que o efeito responsável pelo efluxo de K sob condições de baixo suprimento de B na solução nutritiva.

Para as concentrações de K nas raízes foi observado decréscimo de 46% da menor dose de Ca fornecida às plantas para a maior, mostrando novamente a importância da interação entre os nutrientes K e Ca e seu efeito antagônico (Figura 25). Observa-se que o comportamento das concentrações de K obtidas nas raízes em função das doses de Ca é similar ao registrado para a concentração de K nas folhas.

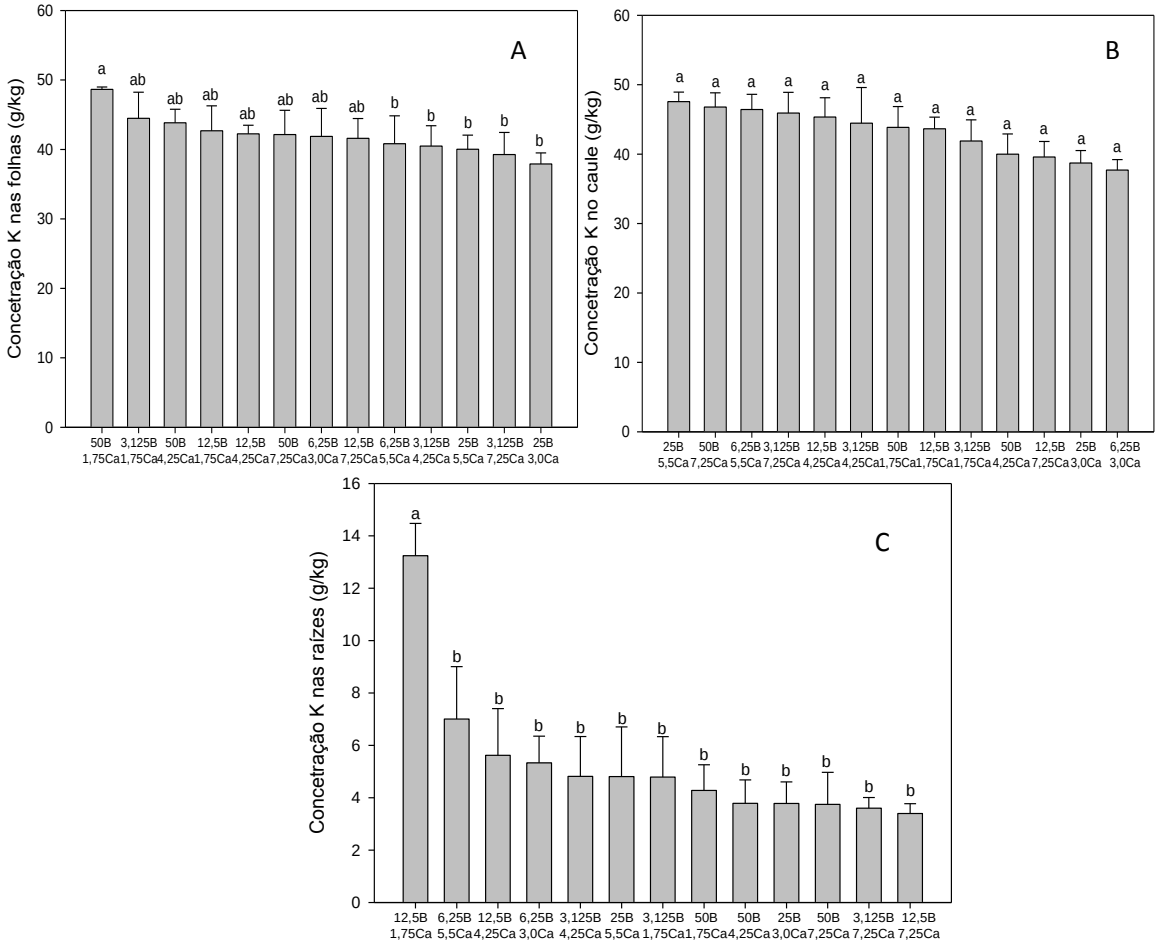

Figura 25 - Concentração de K nas folhas (A) e caules (B) e raízes (C) das plantas de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

Houve interação das combinações de doses de Ca e B para o acumulo de K nas folhas e no caule (Figura 26). O maior valor para o K acumulado nas folhas foi observado na combinação de doses de 5,5Ca e 25B, enquanto que o menor valor correspondeu a um decréscimo de 50%, e foi observado na combinação com as maiores doses de Ca e B (7,25Ca e 50B) (Figura 26). Quanto ao acúmulo no caule, as combinações de Ca e de B de

5,5Ca-6,25B; 4,25Ca-3,125B e 4,25Ca-12,5B promoveram acréscimo aproximado de 160% em relação ao valor obtido com a combinação da mais baixa dose de Ca com a mais alta dose de B (1,75Ca e 50B) (Figura 26).

Os maiores valores de K acumulado nas raízes e na planta toda foram verificados com o fornecimento das combinações de doses de 5,5Ca-6,25B e 4,25Ca-12,5B, respectivamente. Houve grande variação nos valores de K acumulado nas raízes, de 1,9 a 16,9 mg/vaso, sendo que o menor valor observado (4,25Ca e 50B) correspondeu a 11% do maior (5,5Ca e 6,25B) (Figura 27). No total acumulado, esta diferença foi reduzida, cerca de 55%, do maior valor verificado (4,25Ca e 12,5B) para o menor (1,75Ca e 3,125B) (Figura 27).

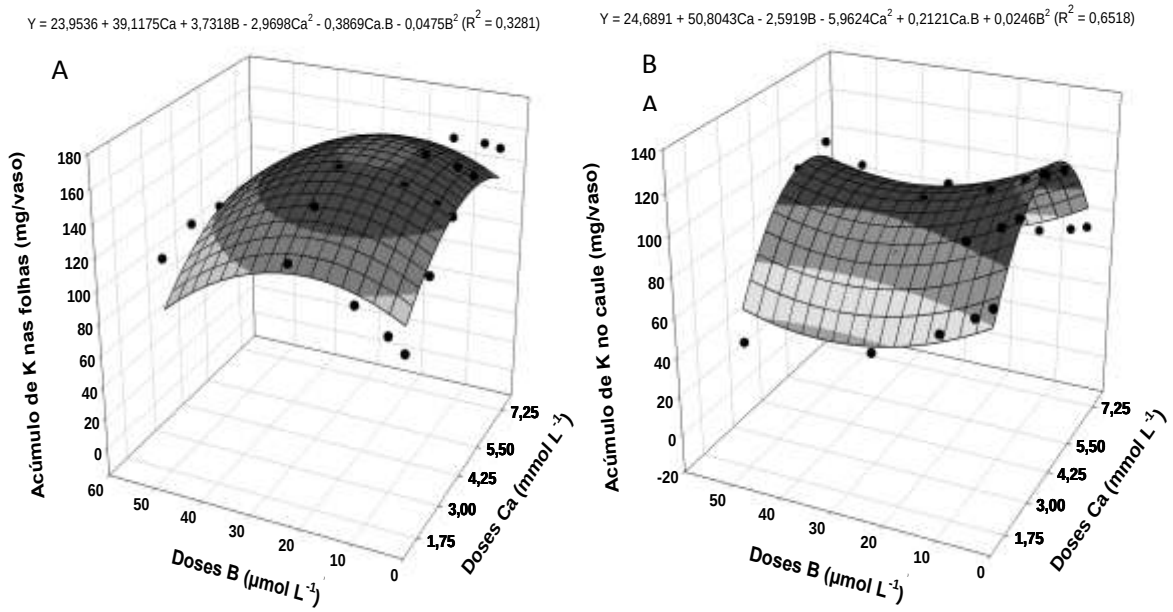

Figura 26 - Acúmulo de K nas folhas (A) e caules (B) das plantas de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva, ao final do experimento

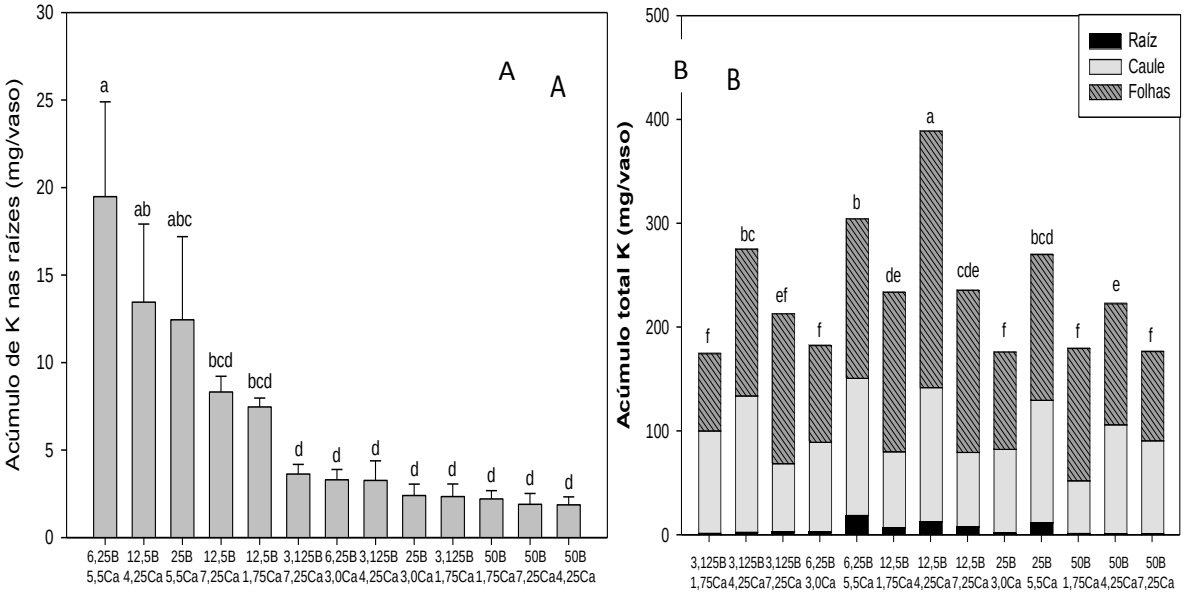

Figura 27 - Acúmulo de K nas raízes (A) e na planta toda (B) de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)

[a]Médias seguidas por letras distintas, referentes à ao acúmulo total de B nas plantas, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

[b]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

5.4.4 Nitrogênio

As concentrações de N nas folhas, caules e raízes não apresentaram interação significativa ($p < 0,05$) entre as combinações de doses de Ca e B. Apesar das diferenças verificadas na atividade da nitrogenase, que é um indicador indireto da fixação biológica de N_2, e consequentemente indica a quantidade de N produzida/absorvida pela planta, ocorreu variação de apenas 11% entre o maior e menor valor observado para as concentrações nas folhas (Tabela 2). Para caules e raízes a variação observada foi superior (30% e 23%, respectivamente), não suficiente, porém, para que esta diferença entre os tratamentos fosse significativa para as concentrações de N tanto em parte aérea como em raiz (Tabela 2). É possível que como o N foi fornecido na solução nutritiva durante os 15 primeiros dias de tratamento para todas as plantas, a diferença observada na atividade da nitrogenase não foi suficiente para que as concentrações de N nos tecidos fossem significativas.

Tabela 2 - Concentração de N nas folhas, caules e raízes das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento[(1)]

Concentração de N ao final do experimento				
Doses Ca (mmol L^{-1})	Doses B (µmol L^{-1})	Folhas	Caule	Raízes
		g/kg		
1,75	3,125	41,9 a ± 1,3	19,9 a ± 4,1	35,7 a ± 5,2
4,25	3,125	42,7 a ± 2,1	21,1 a ± 1,3	32,2 a ± 3,9
7,25	3,125	46,9 a ± 7,3	26,9 a ± 2,8	33,4 a ± 5,0
3	6,25	42,2 a ± 4,0	25,6 a ± 4,7	34,9 a ± 1,2
5,5	6,25	43,4 a ± 5,9	20,8 a ± 4,0	32,5 a ± 0,8
1,75	12,5	43,2 a ± 2,2	24,8 a ± 4,2	33,4 a ± 2,4
4,25	12,5	43,8 a ± 1,7	27,9 a ± 1,2	39,8 a ± 2,8
7,25	12,5	44,7 a ± 3,1	26,2 a ± 1,0	32,7 a ± 4,5
3	25	43,5 a ± 5,1	26,1 a ± 3,0	34,7 a ± 2,0
5,5	25	42,9 a ± 2,3	25,4 a ± 1,0	33,5 a ± 3,0
1,75	50	42,3 a ± 3,7	26,2 a ± 0,8	35,2 a ± 1,2
4,25	50	44,6 a ± 0,6	28,4 a ± 5,5	35,9 a ± 0,7
7,25	50	46,4 a ± 2,8	27,3 a ± 2,7	31,0 a ± 2,4
CV (%)		8,5	12,7	9,1

(1) Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

(2) Valores apresentados após as médias e precedidos por ± representam o desvio padrão das médias.

Foi constatada interação entre as combinações de doses de Ca e B para quantidade de N acumulada nas folhas, caules, raízes, e na planta inteira (Figura 28). Tanto para parte aérea como para as raízes a combinação de 4,25Ca e 12,5B se destacou, e proporcionou valores que estão entre os maiores observados. O destaque é maior, porém para o acúmulo nas folhas em que o incremento em relação ao segundo maior valor observado é de 49%, de forma que nos caules e raízes essa diferença não passou dos 6% (Figura 28). É possível observar ainda que as combinações com baixas doses de Ca (1,75Ca; 3,0Ca) e/ou com altas doses de B (50B) inibiram o acúmulo deste nutriente pela planta, provavelmente pela forte influência exercida por esses nutrientes na produção de matéria seca pelas plantas, bem como os resultados já apresentaram, visto que não houve diferença entre os tratamentos para concentração de N nos tecidos analisados.

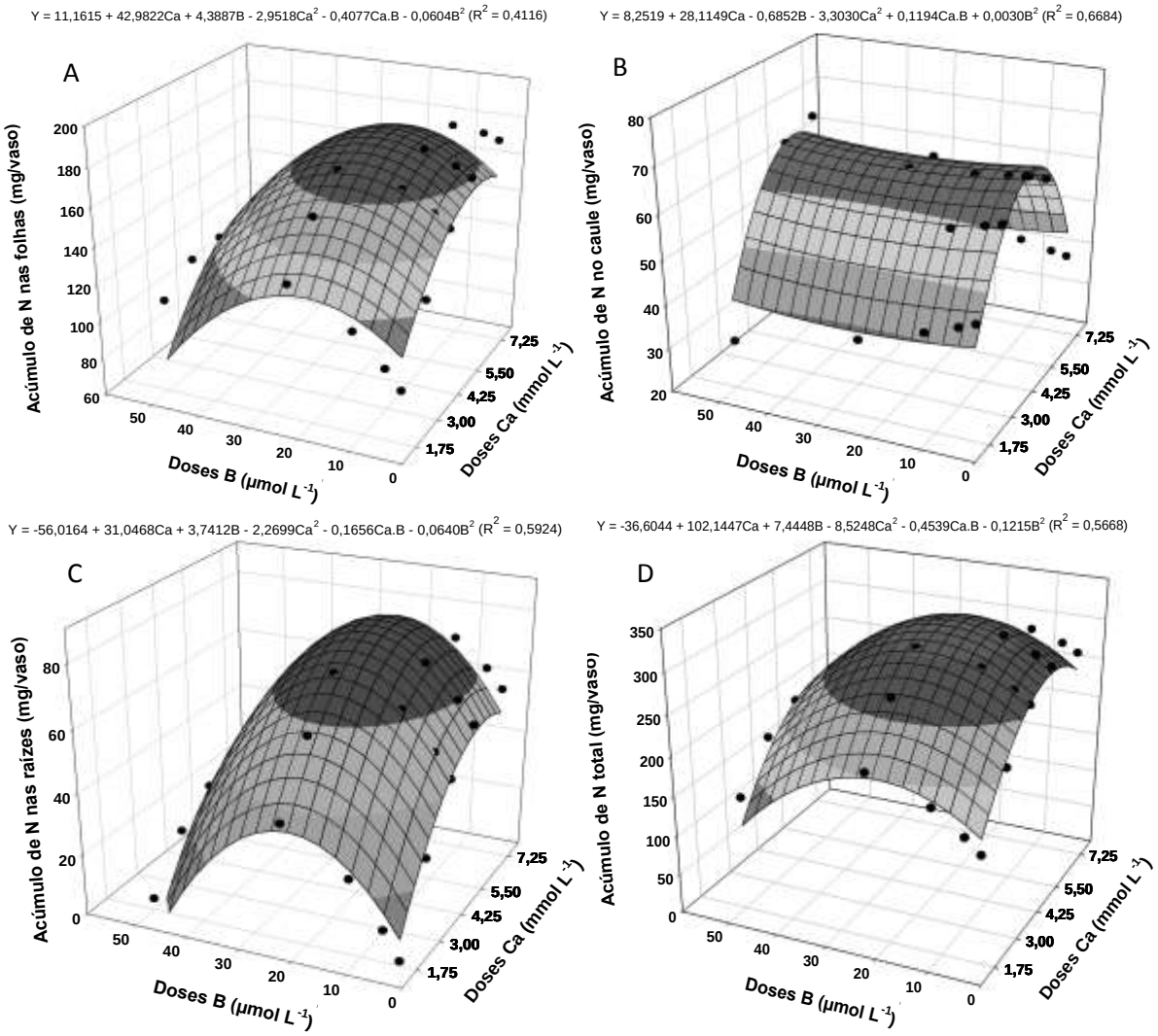

Figura 28 - Acúmulo de N nas folhas (A), caules (B), raízes (C), e na planta inteira (D) de soja em função das combinações de doses de Ca e B na solução nutritiva, ao final do experimento

5.5 Teor de extrato etéreo nos grãos

Não foi constatada interação significativa ($p < 0,05$) entre as doses de Ca e B para o teor de extrato etéreo nos grãos. Os maiores valores para o teor de óleo foram observados com o fornecimento às plantas das combinações de doses de 4,25Ca-12,5B, 4,25Ca-50B e 7,25Ca e 50B. É interessante notar que para uma mesma dose de Ca fornecida às plantas, quando se incrementou o suprimento de B na solução nutritiva verificou-se um aumento no teor de extrato etéreo nos grãos (Figura 29).

Exemplo disso é que tanto os maiores valores observados, como o menor valor constatado foram obtidos a partir do fornecimento da dose de 4,25 mmol L^{-1} de Ca combinada com doses de B (3,125B; 12,5B; 50B) na solução nutritiva. Com o aumento fornecimento das maiores doses de B na solução, observou-se um incremento no teor de óleo nos grãos (Figura 29). Blevins e Lukaszewsky (1998) afirmaram que ocorrem alterações nas membranas celulares em condições de deficiência de B, podendo ser esta a causa das variações entre os valores encontrados.

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo devido aos elevados teores de proteína, óleo e alto rendimento de grãos (VASCONCELOS et al., 2008; SILVA; FREITAS, 2008). Em princípio os teores de óleo nos grãos de soja são determinados geneticamente, porém podem ocorrer variações em função do ambiente de cultivo, e das diferentes formas de manejo da cultura. O óleo de soja representa cerca de 20% do peso total da semente, sendo o seu principal componente o ácido linoléico, seguido pelo ácido oléico (ZAMBIAZI et al., 2007). Os fosfolipídios vegetais apresentam um alto teor de ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico, linoléico e α-linolênico, mantendo a fluidez da membrana, exercendo papel crítico em suas funções (TAIZ, 2004).

Avaliando a combinação de doses de Ca e B em plantas de mamona Franco et al. (2012), também não houve interação entre as combinações de doses para o teor de óleo nas sementes, e o maior valor encontrado (cerca de 540 g kg^{-1}) também foi observado com o fornecimento da maior dose de B (1,60 mg L^{-1}) na solução nutritiva. Nuttall et al. (1987) demonstraram que o B aplicado em adição ao N pode aumentar o rendimento em óleo das sementes de canola (*Brassica napus*). Entretanto, Grant e Bailey (1993) avaliaram os efeitos isolados de diversos nutrientes (macros e micros) em canola, e não verificaram qualquer influência do B e do Ca em relação ao teor de óleo das sementes; observaram, porém, efeitos quantitativos e qualitativos do N, S e P em relação à produção de óleo pelas plantas.

Da mesma forma, Silva (2007) avaliando doses de B fornecidas via solução nutritiva às plantas de mamona não verificou diferenças entre os tratamentos quanto ao teor de óleo nas sementes produzidas. Por outro lado, em estudo com plantas de mostarda (*Brassica campestris*) cultivadas em solução nutritiva com três doses de B (0,3; 30; 300 µmol L^{-1}) e três doses de P (0,15; 1,5; 3,0 mmol L^{-1}), a falta ou excesso de boro na solução nutritiva fornecida às plantas causou redução na produção de óleo pelas plantas, redução esta ainda mais expressiva quando o baixo suprimento de B foi combinado com o baixo de P, ou então quando foram utilizadas as duas maiores doses de B e P (SINHA et al., 2011).

Xu e Wang (2011) analisaram o crescimento e desenvolvimento do pinhão manso (*Jatropha curcas*), observando os resultados da aplicação de diferentes fertilizantes em solos com baixos teores de N, P, K e B, e concluíram que a utilização de um composto contendo B-Mg-Zn, bem como de fertilizante sulfatados, aumentou a concentração de óleo nas sementes, sendo que o aumento promovido pelo composto B-Mg-Zn foi ligeiramente superior.

Em experimento avaliando aplicações foliares de B em plantas de oliva (*Olea europaea*), Larbi et al. (2011) não encontraram diferenças entre os tratamentos +B (300 mg L^{-1}) e –B (sem aplicação foliar) quanto a concentração de óleo nos frutos. Já Saadati et al. (2013) pelo contrário, observaram que tanto o ácido bórico, quanto a combinação do ácido bórico com o sulfato de zinco aplicados às folhas de três cultivares de oliva, durante o amadurecimento dos frutos, promoveram um impacto positivo em relação ao teor de óleo. Referente ainda à aplicação foliar de B, Jabeen et al. (2013) em estudo com girassol (*Helianthus annuus*) submetido ao estresse salino observaram que a aplicação de B e Mn aumentou o teor de óleo nas sementes em relação ao controle, provavelmente porque os nutrientes absorvidos nas folhas devem ter minimizado os efeitos tóxicos da salinidade.

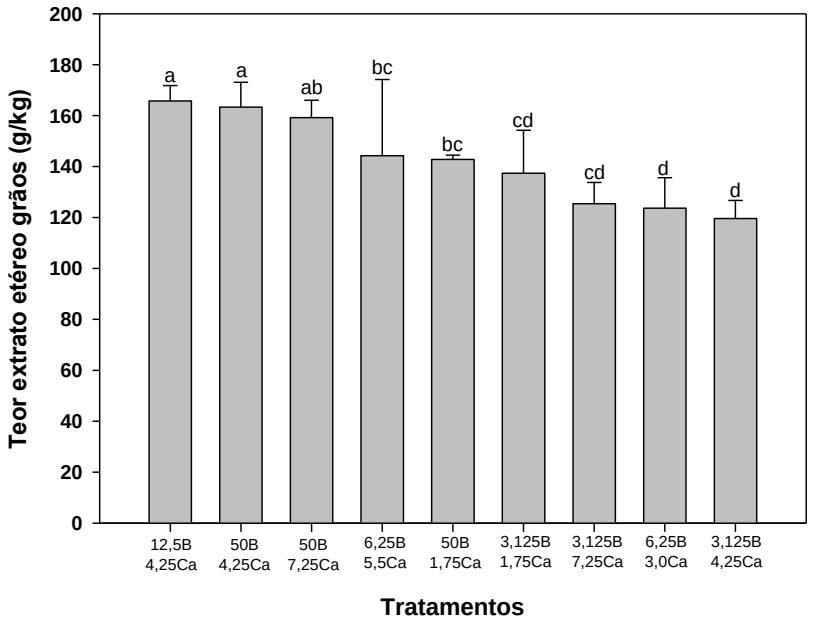

Figura 29 - Teor de extrato etéreo (g/kg) nos grãos das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)

[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

Kumar e Sidhu (2013) avaliaram os efeitos de quatro diferentes doses de B e S no teor de óleo em sementes de soja cultivada em um solo calcáreo, e verificaram que a aplicação das menores doses de B reduziu a concentração de óleo nas sementes, similar ao que observamos aqui. Este efeito do B sobre a concentração de óleo em frutos e sementes observado em alguns trabalhos possivelmente tem relação com o efeito indireto do B na síntese de gorduras nas células (SINHA; CHATTERJEE, 2003).

Quanto à quantidade acumulada do extrato etéreo nos grãos, não houve interação significativa ($p = 0,36$) entre as doses de Ca e B. Foi verificado ainda que a quantidade de óleo acumulada nos grãos está diretamente relacionada ao teor de óleo (Figura 29) e à produção de grãos das plantas (Figura 5). Desta forma foi possível observar que a quantidade de óleo produzida foi significativamente reduzida nos tratamentos com deficiência de B e Ca (Figura 30), ou seja, os tratamentos que mais afetaram a produção de grãos pelas plantas. Verifica-se que o tratamento com a combinação de doses de 4,25Ca e 12,5B, o qual promoveu maior produção de matéria seca pelas plantas, também foi o que permitiu o maior acúmulo de óleo nos grãos.

Ambos os nutrientes estão intimamente relacionados com o desenvolvimento celular, com a germinação de grãos de pólen e com o crescimento do tubo polínico o que pode em parte explicar a baixíssima produção de grãos nos tratamentos com as menores doses de B e Ca (MARSCHNER, 2012). Alguns outros trabalhos abordam esta questão, mesmo que com outros nutrientes, Abbadi et al. (2008) observaram resultado próximo a este em estudo avaliando diferentes doses de N em girassol, verificou-se efeito das doses de N em relação ao número de aquênios produzidos pelas plantas, e como estes possuíam uma relação direta com a produção de óleo das plantas, houve então efeito das doses de N avaliadas na produção de óleo pelas plantas.

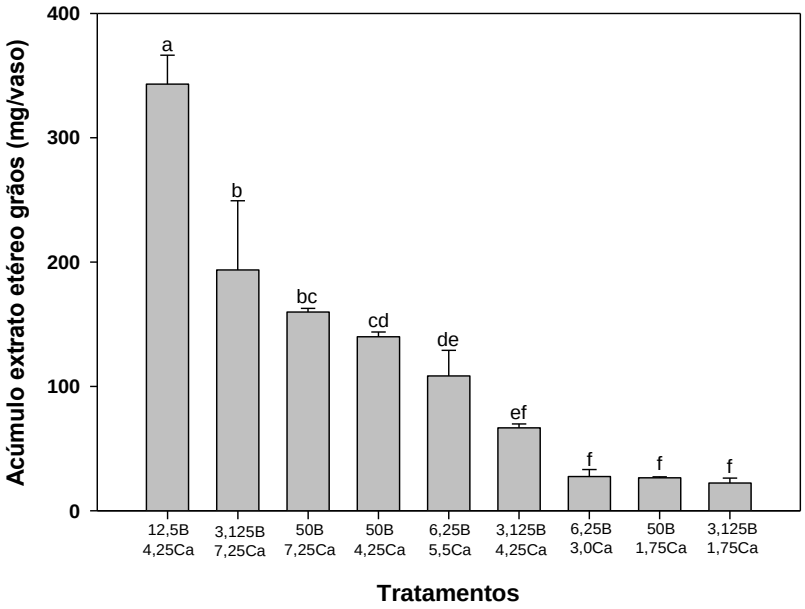

Figura 30 - Acúmulo de extrato etéreo (mg/vaso) nos grãos das plantas de soja em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, ao final do experimento (Tukey, $p < 0,05$)
[a]Barras acima das médias são referentes ao desvio padrão da média

5.6 Microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Em relação às avaliações de ML e MET efetuada no mesófilo foliar das plantas, pode-se observar que o fornecimento das maiores doses de Ca e B (7,25Ca e 50B) às plantas proporcionou cloroplastos com numerosos grãos de amido, bem como moderada desorganização dos tilacóides e a presença de mitocôndrias (Figura 31A). Por sua vez, verificou-se, nos nódulos destas plantas, aumento das camadas de células do córtex (Figuras 32A, B, C), o que pode estar associado aos maiores valores da atividade da nitrogenase verificados neste estudo (Figura 7), tornando mais eficiente o processo de fixação biológica de N_2.

Bastías et al. (2013), avaliando plantas de milho submetidas à doses altas de B, não verificaram alterações ultraestruturais nas células, sendo que estas apresentaram desenvolvimento adequado. A presença da maior dose de Ca neste tratamento também parece ter colaborado para que as desordens ultraestruturais da planta não fossem tão agravadas, e desta forma amenizar os efeitos da toxicidade de B nas folhas, já que na literatura os trabalhos mostram que o Ca é fundamental para a manutenção da estrutura da planta, bem como um dos

principais componentes da parede celular (MARSCHNER, 1995). Além disso, Glenn e Poovaiah (1990), Redondo-Nieto et al. (2003), e Evangelista et al. (2002), em trabalhos avaliando o efeito do Ca na ultraestrutura da parede celular de diferentes culturas, confirmaram a importância da nutrição adequada do Ca neste sentido.

Quando a combinação de 1,75Ca e 50B foi fornecida às plantas, foram encontrados cloroplastos evidenciando numerosos grãos de amido, apresentando moderada desorganização dos tilacóides, com ruptura da membrana dos cloroplastos, assim como a presença de plastoglóbulos (Figura 31B). Em relação às imagens obtidas dos nódulos das plantas de soja, os principais resultados observados foram: a desorganização dos tecidos do córtex interno e o grande número de bactérias penetrando no interior dos tecidos nodulares (Figuras 32D, E, F). Os desbalanços nutricionais provocados pela deficiência de Ca e a toxicidade de B possivelmente foram responsáveis pela maioria das alterações ultraestruturais verificadas nas células (desorganização dos tilacóides e nódulos com estruturas afetadas). A principal diferença deste estudo em relação ao trabalho de Silva et al. (2008), que avaliaram a toxidez de B em mamona, é a presença de numerosos grânulos de amido.

Como a biossíntese de amido está intimamente relacionada com a disponibilidade de sacarose no interior das células para metabolização (ZRENNER, et al., 1995) em condições de toxicidade, o B excedente pode aumentar a concentração do elemento no citoplasma (MATOH, 1997), e com base na propriedade do B em formar complexos com açucares, o excesso de B poderia indiretamente prejudicar a formação destes grãos de amido. Porém conforme Marschner (1995), o B não forma complexos com a sacarose, e sim com polióis, de maneira que o B excedente nas células das plantas de soja provavelmente não formou complexo algum com a sacarose, deixando esta toda disponível para a síntese do amido e consequentemente observamos a presença de numerosos grãos de amido.

Ainda, em trabalho avaliando altas doses de B em duas espécies de *Citrus*, Huang et al. (2014) não verificaram aumento no número de grãos de amido, porém verificaram um aumento no tamanho destes grãos de amido, além disso os resultados mostraram que os tilacóides apresentavam-se bem organizados dentro dos cloroplastos. Esta leve desorganização das células, pode ser justificado graças à baixa dose de Ca no tratamento, que juntamente com a dose mais alta de B, pode ter agravado as alterações observadas nas células.

A combinação da menor dose de B (3,125B) junto a maior dose de Ca (7,25Ca) provocou alterações nos cloroplastos e desorganização dos tilacóides, bem como ruptura da parede celular e da membrana do cloroplasto (Figuras 31C e 33C). Também foi observado aumento no número de plastoglóbulos e grãos de amido. Houve espessamento da lamela

média (Figura 33C e Tabela 3), componente estrutural localizado entre duas paredes celulares adjacentes. Essa maior espessura da lamela média pode ser explicada devido à função estrutural exercida pelo B, em conjunto com polissacarídeos presentes na pectina, especificamente na formação do dímero B-Rhamnogalacturonan-2 (B-RGH-II) (KOBAYASHI et al., 1996; ISHII; MATSUNAGA, 1996; O'NEILL et al., 1996), através de uma ligação borato-diol éster. Estas ligações cruzadas formam um reticulado macromolecular que controla o crescimento celular (FLEISCHER et al., 1999), bem como as propriedades mecânicas da parede celular (ISHII et al., 2001).

O fornecimento da dose mais baixa de B às plantas de soja pode ter comprometido a formação deste complexo, o que resultou no aumento de monômeros de RGH-II, tornando a lamela média mais espessa (Figura 33C e Tabela 3). Já nos nódulos das plantas submetidas a este tratamento (maior dose de Ca com a menor dose de B), houve alteração ou aumento de uma camada de células do córtex interno (Figuras 32G, H, I). Neste caso o fornecimento da maior dose de Ca às plantas pode ter agravado os efeitos negativos da deficiência de B na ultraestrutura da parede celular (diferentemente do encontrado em outras análises), chegando à ruptura da parede celular (Figura 33C).

Dentre os tratamentos avaliados, aquele com a combinação de doses de Ca e B mais equilibrada (tratamento controle) não apresentou desordens, com parede celular e lamela média bem formadas (Figura 33E), sem alterações nas quantidades de grãos de amidos, e com os cloroplasto apresentando as pilhas dos tilacóides bem organizadas (Figura 31E). Para as imagens dos nódulos, não foram observadas alterações importantes na sua estrutura deste órgão (Figuras 32M, N, O), realçando novamente a importância da nutrição equilibrada do Ca e do B para que a formação das estruturas celulares (parede celular e organelas) ocorra adequadamente, e que isso reflita no desenvolvimento das plantas.

Por outro lado nas plantas submetidas às menores doses de Ca e B (1,75Ca e 3,125B) foram observadas pequenas desordens, como cloroplastos evidenciando numerosos grãos de amido e moderada desorganização dos tilacóides (Figura 31D), alterações ultraestruturais que não diferiram muito daquelas observadas nas plantas submetidas aos demais tratamentos; o que não era esperado. Por se tratarem ainda das menores doses de ambos os nutrientes, eles não se encontravam em desequilíbrio na solução nutritiva, sendo a relação Ca:B de 550, todavia, não refletindo em quantidades suficientes para o atendimento do metabolismo vegetal.

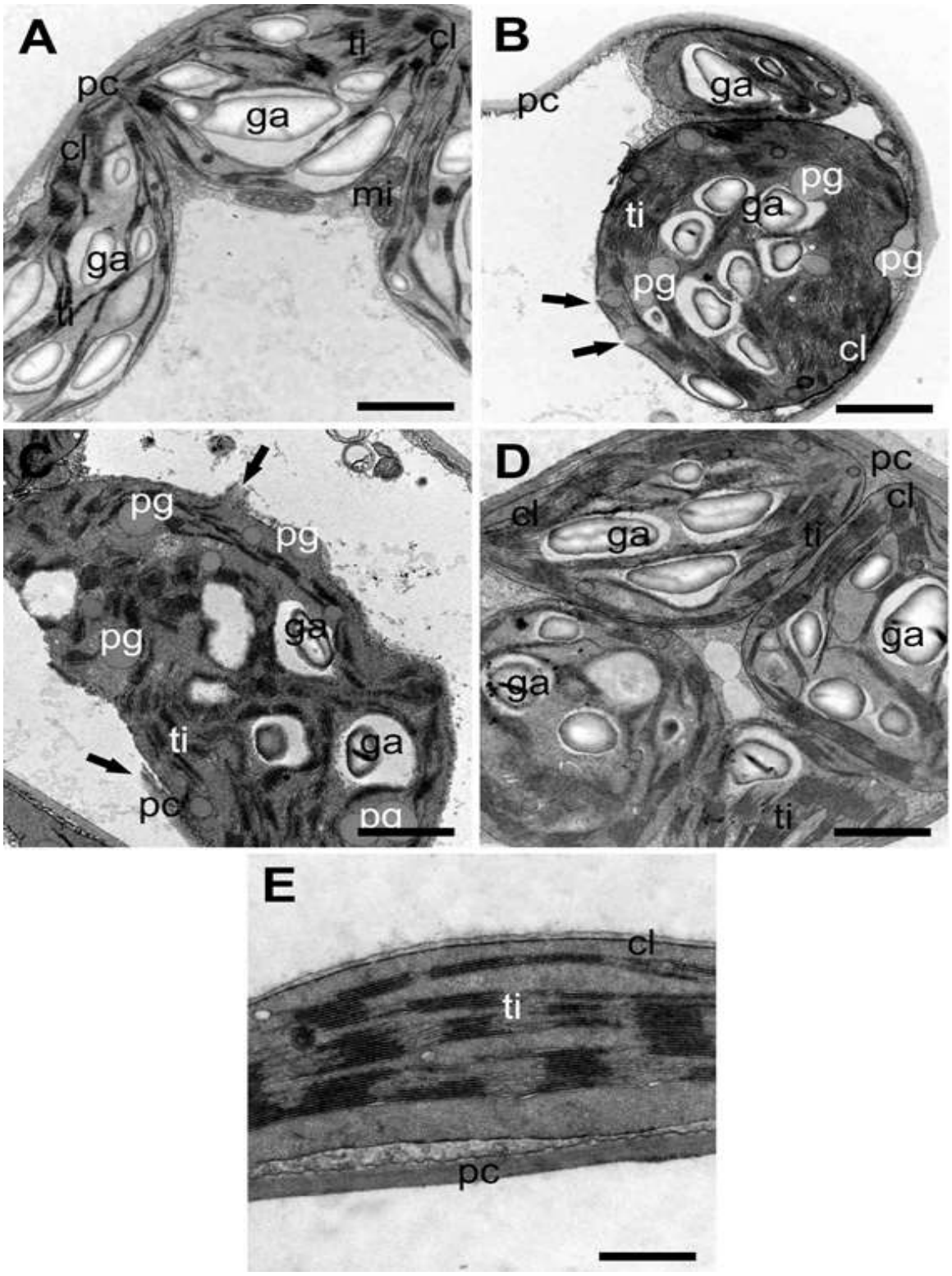

Figura 31 - Ultraestrutura do mesofilo foliar de plantas de soja cultivada em solução nutritiva com diferentes doses de Ca (mmol L^{-1}) e B (µmol L^{-1}). A) 50B e 7,25Ca; B) 50B e 1,75Ca; C) 3,125B e 7,25Ca; D) 3,125B e 1,75Ca; E) controle – 12,5B e 4,25Ca. [(1)] **cl**: cloroplasto; **ga**: grão de amido; **ti**: tilacóide; **pc**: parede celular; **pg**: plastoglóbulos; **mi**: mitocondria. Barras: 2 µm

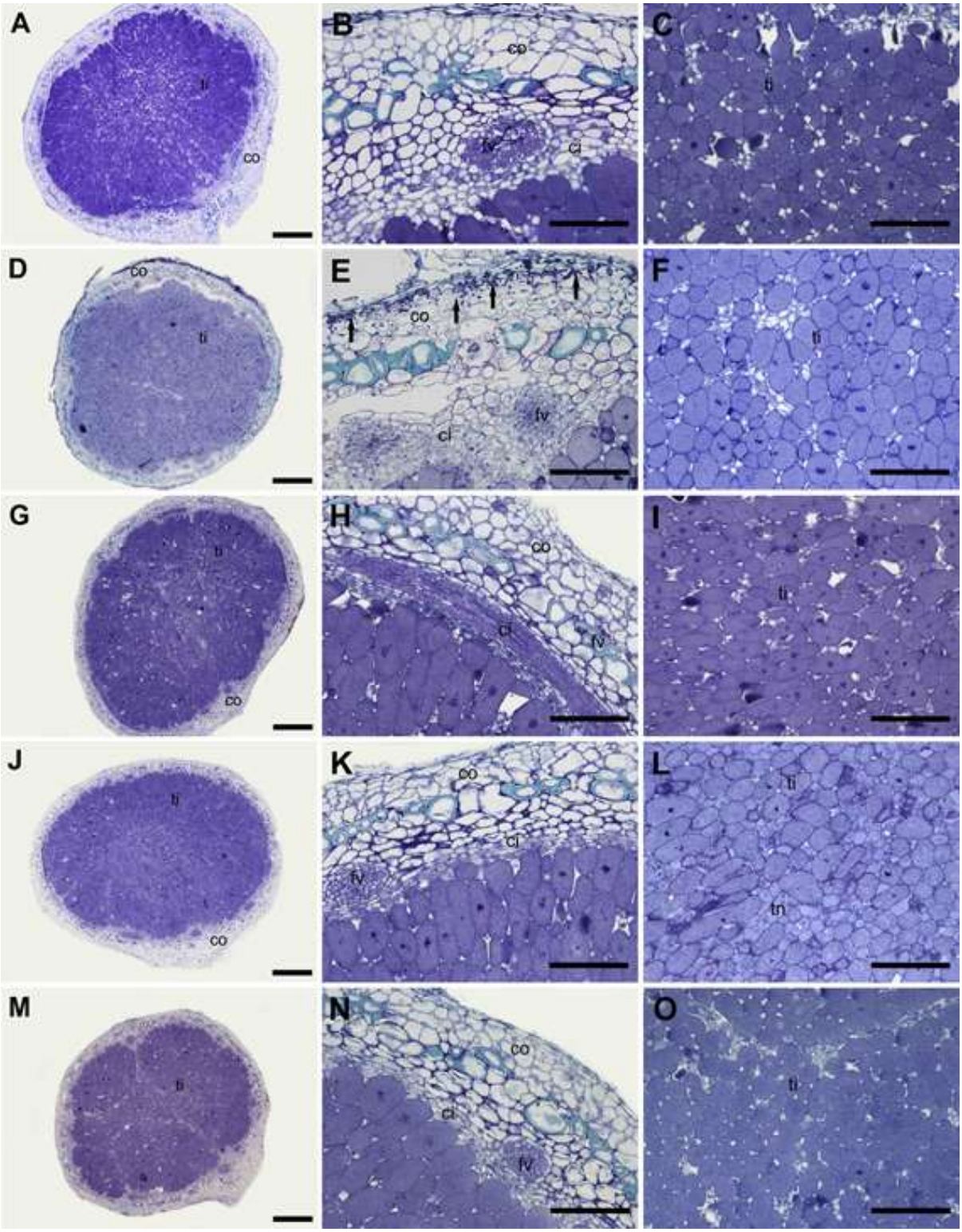

Figura 32 - Secções transversais de nódulos de raiz de soja cultivada em solução nutritiva com combinações de doses de Ca (mmol L^{-1}) e B (µmol L^{-1}). A-C) 50B e 7,25Ca; D-F) 50B e 1,75Ca; G-I) 3,125B e 7,25Ca; J-L) 3,125B e 1,75Ca; M-O) controle – 12,5B e 4,25Ca. [(1)] **co**: cortex; **fv**: feixe vascular; **ci**: cortex interno; **ti**: tecido infectado; **tn**: tecido não infectado; setas indicam bactérias fixadoras de N_2 penetrando nos tecidos. Barras: A,D,G,J,M= 600 µm; B,C,E,F,H,I,K,L,N,O = 150 µm

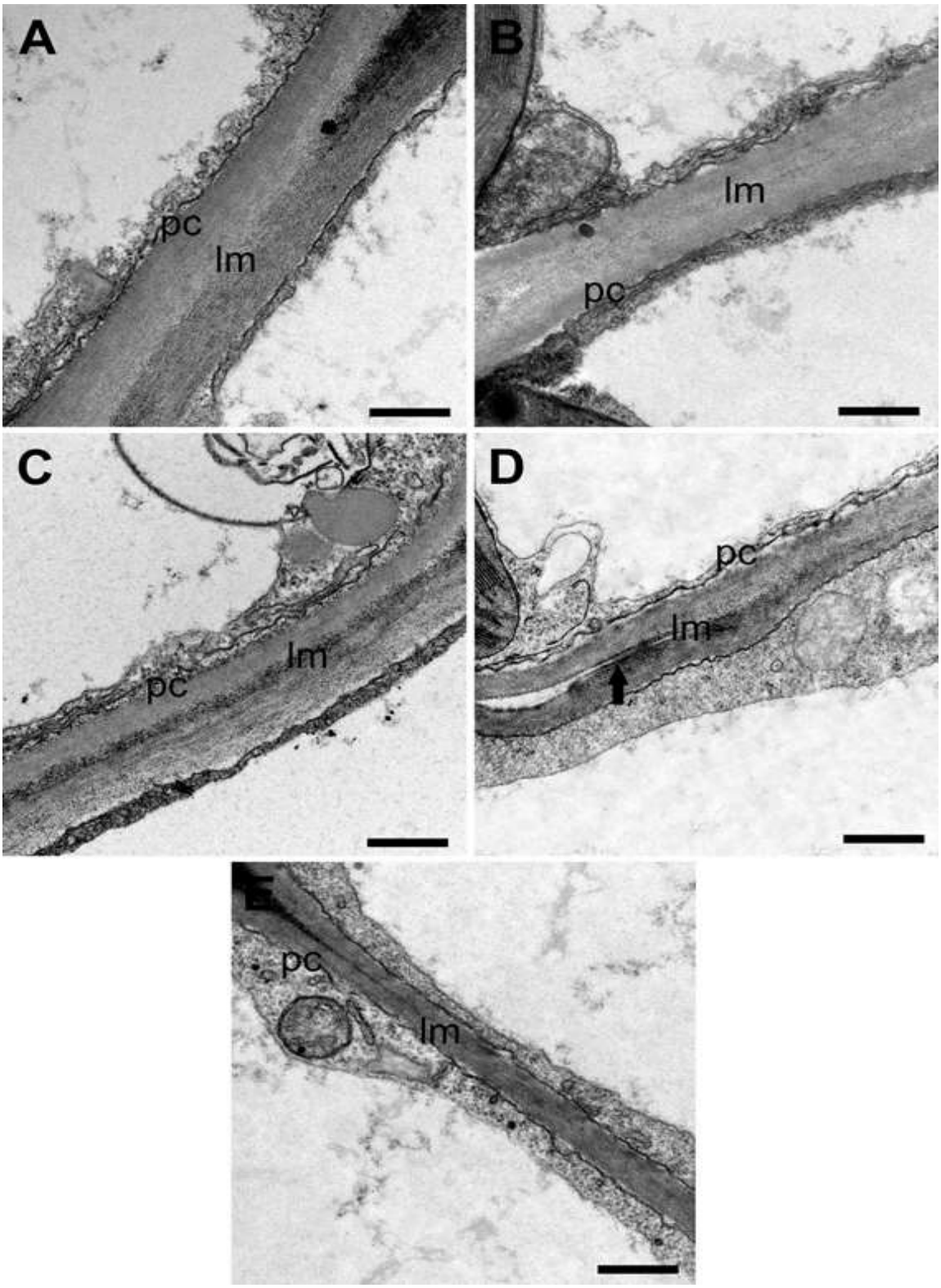

Figura 33 - Ultraestrutura do mesofilo foliar evidenciando a parede celular de plantas de soja cultivado em solução nutritiva. A) 50B e 7,25Ca; B) 50B e 1,75Ca; C) 3,125B e 7,25Ca; D) 3,125B e 1,75Ca; E) controle – 12,5B e 4,25Ca. [(1)] **pc**: parede celular; **lm**: lamela média. Barras: 0,5 µm

Outra razão para que os sintomas esperados de deficiência severa não tenham se manifestado significativamente, pode ser explicado pelo fato dos nutrientes apresentarem certo equilíbrio na solução nutritiva, porém, limitando o desenvolvimento vegetal. Pelo observado de maneira geral, os grandes desbalanços nutricionais entre o Ca e o B foram os responsáveis pelas maiores alterações ultraestruturais observadas no mesófilo foliar, e não necessariamente o baixo fornecimento de Ca e B. Ou seja, a relação Ca:B, tanto na solução, quanto no tecido vegetal, não pode ser entendida como parâmetro exclusivo de equilíbrio nutricional.

Analisando-se os nódulos da soja submetida às menores doses de Ca e B, pode-se verificar aumento no numero de tecidos não infectados pelas bactérias (*Rhizobium*), o que pode influenciar diretamente a capacidade de fixar N_2 por estes nódulos, e por sua vez explicar a menor atividade da N-ase observada nas plantas submetidas ao mesmo tratamento (1,75Ca e 3,125B), no primeiro experimento. Redondo-Nieto et al. (2003) verificaram em plantas de ervilha deficientes em B, que uma aplicação adicional de Ca estimulou a infecção das raízes por bactérias do gênero *Rhizobium*.

Tabela 3 - Espessura da lamela média do mesófilo foliar das plantas de soja, cultivar BRS 284, em função das combinações de Ca e de B na solução nutritiva, avaliadas no estádio fenológico R1[(1)]

Tratamentos		**Espessura de lamela média e parede celular (µm)**
1,75Ca	3,125B	0,47 c
1,75Ca	50B	0,51 c
4,25Ca	12,5B	0,25 d
7,25Ca	3,125B	0,66 b
7,25Ca	50B	0,80 a

(1) Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES

1. O aumento no fornecimento de Ca ameniza os efeitos negativos do baixo suprimento de B na produção de biomassa das plantas e de grãos, no comprimento e superfície de raízes e na atividade da nitrogenase.
2. Os desequilíbrios nutricionais entre o Ca e o B – maior suprimento de Ca e menor de B, ou o inverso - promovem severas alterações ultraestruturais no mesófilo.
3. A massa fresca de nódulos, o número de camadas de células no córtex dos nódulos e a atividade da nitrogenase aumentam com o suprimento de Ca e B.
4. A produção de grãos e o rendimento de óleo são significativamente reduzidos com as deficiências de B e Ca.
5. A combinação de doses de Ca de 4,25 mmol L^{-1} e B de 12,5 µmol L^{-1} promovem os maiores acúmulos de Ca, B, N, K e Mg nas folhas, maior produção de biomassa das plantas e de grãos e maior rendimento de óleo, indicando relação Ca:B adequada na solução nutritiva e nas folhas de 350:1 e 700:1, respectivamente.
6. A relação Ca:B, tanto na solução, quanto no tecido vegetal, não pode ser entendida como parâmetro exclusivo de equilíbrio nutricional.

REFERÊNCIAS

ABREU, I.; CERDA, M. E.; NANCLARES, M. P.; BAENA, I.; LLORET, J.; BONILLA, I.; BOLAÑOS, L.; REGUERA, M. Boron deficiency affects rhizobia cell surface polysaccharides important for suppression of plant defense mechanisms during legume recognition and for development of nitrogen-fixing symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 361, p. 361-395, 2012.

ALI, A. H. N.; JARVIS, B. C. Effects of auxin and boron on nucleic acid metabolism and cell division during adventitious root regeneration. **New Phytology**, New York, v. 108, p. 383-391, 1988.

ANDOSCH, A.; AFFENZELLER, M. J.; LÜTZ, C.; LÜTZ-MEINDL, U. A freshwater green alga under cadmium stress: ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 169, p. 1489-1500, 2012.

ANDREEV, I. M.; ANDREEVA, I. N. ; KOZHARINOVA, G. M.; DUBROVO, P. N.; KRYOLOVA, V. V.; IZMAILOV, S. F. Accumulation of calcium and its involvment in the control of nitrogenase activity in the symbiossomes of broad bean root nodules. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 47, p. 10-16, 2000.

AOCS. **Official Procedure Am 5-04:** rapid determination of Oil/Fat utilizing high temperature solvent extraction. Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/CrudeFat_0504_013009.pdf>. Acesso em: out. 2014.

AZEVEDO, W. R.; FAQUIN, V.; MOREIRA, F. M. S.; OLIVEIRA JR., A. C.; LISBOA, C. C. Efeito do boro na nodulação da ervilha cultivada em solos de várzea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, p. 1137-1143, 2002.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 24, p. 23–58, 2005.

BASTÍAS, E.; GONZÁLEZ-MORO, M. B.; GONZÁLEZ-MURUA, C. Interactive effects of excess boron and salinity on histological and ultrastructural leaves of *Zea mays* amylacea from the Lluta Valley (Arica-Chile). **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 40, p. 581-595, 2013.

BENINNI, E. R. Y.; TAKAHASHI, H. W.; NEVES, C. S. V. J. Manejo do cálcio em alface de cultivo hidropônico. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 21, p. 605-610, 2003.

BLEVINS, D. G.; LUKASZEWSKI, K. M. Boron in plant structure and function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 481–500, 1998.

BOLAÑOS, L.; ESTEBAN, E.; LORENZO, C.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; FELIPE, M. R.; GÁRATE, A.; BONILLA I. Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (*Pisum sativum*) – *Rhizobium* nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 85–90, 1994.

BOLAÑOS, L.; CEBRIÁN, A.; REDONDO-NIETO, M.; RIVILLA, R.; BONILLA I. Lectin-like glycoprotein *PsNLEC-1* is not correctly glycosylated and targeted in boron deficient pea nodules. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 663–670, 2001.

BOX JUNIOR, J. E. Modern methods for root investigations. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant roots:** the ridden half. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 193-237.

BUSH, D. S. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 95–122, 1995.

CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, p. 71-83, 1997.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency causes a drastic decrease in nitrate content and nitrate reductase activity, and increases the content of carbohydrates in leaves from tobacco plants. **Planta**, Berlin, v. 209, p. 528-536, 1999.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; REXACH J.; HERRERA-RODRÍGUEZ M. B.; NAVARRO-GOCHICOA M. T.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron deficiency and transcript level changes. **Plant Science**, Shannon, v. 181, p.58–89, 2011.

CARPENA, R. O.; ESTEBAN, E.; SARRO, M. J.; PEÑALOSA, J.; GÁRATE, A.; LUCENA, J. J.; ZORNOZA, P. Boron and calcium distribution in nitrogen-fixing pea plants. **Plant Science**, Shannon, v. 151, p. 163-170, 2000.

CHATTERJIE, C.; SINHA, P.; NAUTIYAL, N.; AGARWALA, S. C.; SHARMA, C. P. Metabolic changes associated with boron-calcium interaction in maize. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 33, p. 607-617, 1987.

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the genetic base of soybean: a multidisciplinary approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 27, p. 295-341, 2008.

CLARK, R. B. Physiological aspects of calcium, magnesium and molybdenum deficiencies in plants. In: ADAMS, F. (Ed.). **Soil acidity and liming.** 2. ed. Madison: ASA; CSSA, SSSA, 1984. p. 99-170.

CLARKSON, D. T. Calcium transport between tissues and its distribution in the plant. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 7, p. 449–456, 1984.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamentos de safra**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2015.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKUTI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Brasília, DF: Embrapa Soja, 2007. 12 p. (Circular Técnica, 43).

DALTON, D. A.; RUSSEL, S. A.; HANUS, F. J.; PASCOE, G. A.; EVANS, H. J. Enzymatic reaction of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 83, p. 3811-3815, 1986.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrentes. In: FERNANDES, M. (Ed.) **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327-354.

DONG, T.; XIA, R.; XIAO, Z.; WANG, P.; SONG, W. Effect of pre-harvest application of calcium and boron on dietary fibre, hydrolases and ultrastructure in '*Cara Cara*' navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 121, p. 272–277, 2009.

DONG, X.; WROLSTAD, R. E.; SUGAR, D. Extending shelf life of fresh-cut pears. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 65, p. 181–186, 2000.

EL-HAMDAOUI, A; REDONDO-NIETO, M.; RIVILLA, R.; BONILLA, I.; BOLAÑOS, L. Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum*-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 1003–1011, 2003.

EMBRAPA. **Cultivares de soja:** macrorregiões 1, 2 e 3 centro sul do Brasil. 2014. 60 p. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/114394/1/Cultivares-de-soja-macrorregioes-1-2-e 3-centro-sul-do-Brasil.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2014.

EPSTEIN, E.: BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants:** principles and perspectives. 2. ed. Sunderland: Sinauer, 2005. 400 p.

EVANGELISTA, R. M.; CHITARRA, A. B.; CHITARRA, M. I. F. Mudanças na ultra-estrutura da parede celular de manga '*tommy atkins*' tratadas com cloreto de cálcio na pré-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, p. 254-257, 2002.

FERGUSON, I. B.; WATKINS, C. B. Bitter-pit in apple fruit. **Horticultural Reviews**, New York, v. 11, p. 289-355, 1989.

FERREIRA, J. A.; MAFRA, I.; SOARES, M. R.; EVTUGUIN, D. V. Dimeric calcium complexes of arabinan-rich pectic polysaccharides from *Olea europaea* L. cell walls. **Carbohydrate polymers**, Oxford, v. 65, p. 535-543, 2006.

FLEISCHER, A.; O'NEILL, M. A.; EHWALD, R. The pore size of nongraminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide *rhamnogalacturonan II*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, p. 829–838, 1999.

FRANCO, H. C. J.; LAVRES JUNIOR, J.; OLIVEIRA JUNIOR, O.; MATIAS, G. C. S.; CABRAL, C. P.; MALAVOLTA, E. Optimum ratio of calcium and boron in the nutrient solution or in castor bean shoot for fruit yield and seed oil content. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 35, p. 413-427, 2012.

FUNAKAWA, H.; MIWA, K. Synthesis of borate cross-linked *rhamnogalacturonan II*. **Frontiers in Plant Science**. v. 6, n. 223, 2015. doi:10.3389/fpls.2015.00223.

GALLAHER, R. N.; BROWN, R. H.; ASHLEY, D. A.; JONES JUNIOR, J. B. Photosynthesis and $^{14}CO_2$ photosynthate translocations from calcium: deficient leaves of crops. **Crop Science**, Madison, v. 16, p. 116-119, 1976.

GINSBURG, B. Z. Evidence for a protein gel structure cross-linked by metal cations in the intercellular cement of plant tissue. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 12, p. 85-107, 1961.

GLENN, G. M.; POOVAIAH, B. W. Calcium-mediated postharvest changes in texture and cell wall structure and composition in '*golden delicious*' apples. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. Alexandria, v. 115, p. 962-968, 1990.

GOLDBACH, H. E.; HUANG, L.; WIMMER, M. A. Boron functions in plants and animals: recent advances in boron research and open questions. In: XU, F. et al. (Ed.). **Advances in plant and animal boron nutrition**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 3-25.

GONZÁLEZ-FONTES, A.; NAVARRO-GOCHICOA, T.; CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; HERRERA-RODRÍGUEZ, M. B.; QUILES-PANDO, C.; REXACH, J. Is Ca^{2+} involved in the signal transduction pathway of boron deficiency? New hypotheses for sensing boron deprivation. **Plant Science**, Shannon, v. 217-218, p. 135-139, 2014.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; MATTHIADIS, A.; SÁEZ, A.; LONG, T. A. Fixating on metals: new insights into the role of metals in nodulation and symbiotic nitrogen fixation. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 1-6, 2014.

GREENWOOD, E. A. N.; HALLSWORTH, E. G. Studies on the nutrition of forage legumes. II. Some interactions of Ca, P, Cu and Mo on the growth and chemical composition of *Trifolium subterraneum* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 12, p. 97–127, 1960.

GUPTA, U. C. Boron nutrition of crops. **Advances in Agronomy,** San Diego, v. 31, p. 273-307, 1979.

GUPTA, U. C. **Boron and its role in crop production**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 250 p.

GUPTA, U. C. Yield response to boron and factors affecting its uptake by crops. In: SINGH, K.; MORI, S.; WELCH, R. M. (Ed.). **Perspectives on the micronutrient nutrition of crops**. Jodhpur: Scientific Publishers, 2001. p. 91-118.

HABIB, R. Total root length as estimated from small sub-samples. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 267-274, 1988.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HAVLIN, J. L.; BEATON, J. D.; TISDALE, S. L.; NELSON, W. L. **Soil fertility and fertilizers:** an introduction to nutrient management. 7. ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2005. 528 p.

HERMANS, C.; HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J.; VERBRUGGEN, N. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 610–617, 2006.

HUANG, J. H.; CAI, Z. J.; WEN, S. X.; GUO, P.; YE, X.; LIN, G. Z.; CHEN, L. S. Effects of boron toxicity on root and leaf anatomy in two *Citrus* species differing in boron tolerance. **Trees**, New York, v. 28, p. 1653-1666, 2014.

HUANG, J. W. W.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. Quantification of calcium fluxes using a calcium-selective vibrating microelectrode. **Planta**, Berlin, v. 188, p. 414–421, 1992.

HUANG, S. S.; KIRCHOFF, B. K.; LIAO, J. P. Effect of heat shock on ultrastructure and calcium distribution in *Lavandula pinnata* L. glandular trichomes. **Protoplasma**, Wien, v. 250, p. 185-196, 2013.

ISHIDA, A.; NUKAYA A.; SHIGEOKA, H. Effect of applied concentrations of boron and calcium on growth, vase life and leaf marginal burn in chrysanthemums. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Kyoto, v. 57, p. 273–278, 1988.

ISHII T.; MATSUNAGA, T.; HAYASHI, N. Formation of *rhamnogalacturonan II:* borate dimer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 1698–1705, 2001.

ISHII, T.; MATSUNAGA, T. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan. II. Complex from cell walls of sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 284, p. 1-9, 1996.

JABEEN, N.; AHMAD, R.; SULTANA, R.; SALEEM, R.; AMBRAT. Investigations on foliar spray of boron and manganese on oil content and concentrations of fatty acids in seeds of sunflower plant raised through saline water irrigation, **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 36, p. 1001-1011, 2011.

JARRELL, W. M.; BEVERLY, R. B. The dilution effect in plant nutrition studies. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 34, p. 197–224, 1981.

JOSTEN, P.; KUTSCHERA, U. The micronutrient boron causes the development of adventitious roots in sunflower cuttings. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 337–342, 1999.

KANWAL, S.; RAHMATULLAH, K.; AZIZ, M. T.; MAQSOOD, A.; ABBAS, N. Critical ratio of calcium and boron in maize shoot for optimum growth. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 31, p. 1535–1542, 2008.

KEREN, R.; BINGHAM, F. T. Boron in water, soils, and plants. **Advances in Soil Science**, New York, v. 1, p. 229–276, 1985.

KOBAYASHI, M.; MATOH, T.; AZUMA, J. Two chains of *rhamnogalacturonan II* are cross-linked by borate–diol ester bonds in higher plant cell walls. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, p. 1017–1020, 1996.

KOCHIAN, L.V. Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. In: MORTVEDT, J.J. (Ed.). **Micronutrients in agriculture.** 2. ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. p. 251-270.

KONSAENG, S.; DELL, B.; RERKASEM, B. Boron mobility in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 330, p. 281-289, 2010.

KOSHIBA, T.; KOBAYASHI, M.; ISHIHARA, A.; MATOH, T. Boron nutrition of cultured tobacco BY-2 cells. VI. Calcium is involved in early responses to boron deprivation. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 51, p. 323-327, 2010.

KRETSINGER, R. H. Evolution of the informational role of calcium in eukaryotes. In: WASSERMAN, R. H.; CORRADINO, R. A.; CARAFOLI, E.; KRETSINGER, R. H.; MACLENNAN, D. H.; SIEGELIAL, F. L. (Ed.). **Calcium-binding proteins and calcium function**. New York: North Holland, 1977. p. 63–72.

KUMAR, D.; SIDHU, S. S. Response of soybean to soil applied sulfur and boron in a calcareous soil. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 36 p. 1795-1807, 2013.

KUO, C. Y.; YEH, D. M. Effects of boric acid concentration and shading on growth, leaf physiology, and anatomy of *Guzmania*. **Hortscience**, Alexandria, v. 41, p. 618–621, 2006.

LARBI, A.; GARGOURI , K.; AYADI , M.; DHIAB, A. B.; MSALLEM, M. Effect of foliar boron application on growth, reproduction, and oil quality of olive trees conducted under a high density planting system. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 34, p. 2083-2094, 2011.

LAVRES JUNIOR, J.; MORAES, M. F.; CABRAL, C. P.; MALAVOLTA, E. Influência genotípica na absorção e na toxidez de manganês em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 173-181, 2008.

LAVRES JUNIOR, J.; MALAVOLTA, E.; NOGUEIRA, N. L.; MORAES, M. F.; REIS, A. R.; ROSSI, M. L.; CABRAL. C. P. Changes in anatomy and root cell ultrastructure of soybean genotypes under manganese stress. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.33, n.2, p. 395-403, 2009.

LAVRES JUNIOR, J.; REIS, A. R.; ROSSI, M. L.; CABRAL, C. P.; NOGUEIRA, N. L.; MALAVOLTA, E. Changes in the ultrastructure of three soybean cultivars in response to manganese supply in solution culture. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 287-294, 2010.

LAVRES JUNIOR, J.; CABRAL, C. P.; ROSSI, M. L.; NOGUEIRA, T. A. R.; NOGUEIRA, N. L.; MALAVOLTA, E. Deficiency Symptoms and Uptake of Micronutrients by Castor Bean Grown in Nutrient Solution. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 233-242, 2012.

LEWIS, D. Boron lignification and the origin of vascular plants: a unified hypotesis. **New Phytologist**, New York, v. 84, p. 209–229, 1980.

LITTELL, R. C.; MOTT, G. O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings,** Belle Glade, v. 34, p. 94-97, 1975.

LOOMIS, W. D.; DURST, R. W. Chemistry and biology of boron. **Biofactors**, Oxford, v. 3, p. 229-239, 1992.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2005. 151 p.

LOWTER, W. L.; LONERAGAN, J. F. Calcium and nodulation in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). **Plant Physiology,** Rockville, v. 43, p. 1362–1366, 1968.

LUFT, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, New York, v. 9, p. 409-414, 1961.

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

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

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

MANFREDINI, D. **Cálcio e boro para soja-perene:** características anatômicas e agronômicas e concentração de nutrientes. 2008. 103 f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

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

MASCARENHAS, J. P.; MACHLIS, L. Chemotropic response of the pollen of Antirrhinum majus to calcium. **Plant Physiology**, Rockville, v. 39, p. 70-77, 1964.

MATAS, M. A.; GONZÁLEZ-FONTES, A.; CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J. Effect of boron supply on nitrate concentration and its reduction in roots and leaves of tobacco plants. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 53, p. 120–124, 2009.

MATOH, T.; ISHIGAKI, K.; OHNO, K.; AZUMA, J. Isolation and characterization of a boron–polysaccharide complex from radish roots. **Plant Cell Physiology,** Kyoto, v. 34, p. 639–642, 1993.

MATOH, T. Boron in plant cell walls. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 193, p. 59-70, 1997.

MATTOS JUNIOR, D.; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. Calagem e adubação dos citros. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 209, p. 39-46, 2001.

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

MILLS, H. A.; BENTON-JONES JUNIOR, J. **Plant analysis handbook.** II. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide. Athens: MicroMacro Publishing, 1997. 422 p.

NOORDWIJK, M. V.; FLORIS, J. Loss of dry weight during washing and storage of root samples. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 53, p. 239-243, 1979.

OERTLI, J. J.; ROTH, J. A. Boron nutrition of sugar beet, cotton, and soybean. **Agronomy Journal**, Madison, v. 61, p. 191-195, 1969.

O'NEILL, M.A.; WARRENFELTZ, D.; KATES K. *Rhamnogalacturonan. II*: A pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester: in vitro conditions for the formation and hydrolysis of the dimer. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 271 p. 22923–22930, 1996.

OZAKI, T.; AMBE, S.; ABE, T.; FRANCIS, A. J. Competitive inhibition and selectivity enhancement by Ca in the uptake of inorganic elements (Be, Na, Mg, K, Ca, Sc, Mn, Co, Zn, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Ce, Pm, Gd, Hf) by carrot (*Daucus carota* cv. *U.S. harumakigosun*). **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 103, p. 69–82, 2005.

PAN, Y.; WANG, Z.; YANG, L.; WANG, Z.; SHI, L.; NARAN, R.; AZADI, P.; XU, F. Differences in cell wall components and allocation of boron to cell walls confer variations in sensitivities of *Brassica napus* cultivars to boron deficiency. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 354, p. 383-394, 2012.

PAPADAKIS, I. E.; DIMASSI, K. N.; BOSABALIDIS, A. M.; THERIOS, I. N.; PATAKAS, A.; GIANNAKOULA, A. Effects of B excess on some physiological and anatomical parameters of '*Navelina*' orange plants grafted on two rootstocks. **Environmental and Experimental Botany**, Kidlington, v. 51, p. 247–257, 2004.

PARR, A. J.; LONGHMAN, B. C. Boron and membrane function in plants. In: ROBB, D. A.; PIERPOINT, W. S. (Ed.). **Metal and micronutrients:** uptake and utilization by plants. London: Academic Press, 1983. p. 87-107.

PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: *Rhamnogalacturonan II*: a structure in quest of a function. **Biochimie**, Paris, v. 85, p. 109-121, 2003.

PFEFFER, H.; DANNEL F.; ROMHELD V. Are the connections between phenol metabolism, ascorbate metabolism and membrane integrity in leaves of boron-deficient sunflower plants? **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 479–485, 1998.

POLAT, H.; VENGOSH, A.; PANKRATOV, I.; POLAT, M. A new methodology for removal of boron from water by coal and fly ash. **Desalination**, Amsterdam, v. 164, p. 173–188, 2004.

RAMÓN, A. M.; CARPENA, R. O.; GÁRATE, A. The effects of short-term deficiency of boron on K, Ca and Mg distribution in leaves and roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. In: INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM, 11., 1989, Wageningen. **Plant nutrition physiology and applications; proceedings…** Dordrecht: Kluwer Academic, 1990. p. 287–290.

REDONDO-NIETO, M.; MAUNOURY, N.; MERGAERT, P.; KONDOROSI, E.; BONILLA, I.; BOLAÑOS, L. Boron and calcium induce major changes in gene expression during legume nodule organogenesis. Does boron have a role in signalling? **New Phytologist**, Hoboken, v. 195, p. 14–19, 2012.

REDONDO-NIETO, M.; RIVILLA, R.; EL-HAMDAOUI, A.; BONILLA, I.; BOLAÑOS, L. Boron deficiency affects early infection events in the pea–*Rhizobium* symbiotic interaction. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, p. 819–823, 2001.

REDONDO-NIETO, M.; WILMOT, A. R.; EL-HAMDAOUI, A; BONILLA, I.; BOLAÑOS, L. Relationship between boron and calcium in the N_2-fixing legume–rhizobia symbiosis. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 26, p. 1905–1915, 2003.

REGUERA, M.; ABREU, I.; BREWIN, N. J.; BONILLA, I.; BOLAÑOS, L. Borate promotes the formation of a complex between legume *AGP-extensin* and *Rhamnogalacturonan II* and enhances production of *Rhizobium* capsular polysaccharide during infection thread development in *Pisum sativum* symbiotic root nodules. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 33, p. 2112–2120, 2010a.

REGUERA, M.; ESPÍ, A.; BOLAÑOS, L.; BONILLA, I.; REDONDO-NIETO, M. Endoreduplication before cell differentiation fails in boron-deficient legume nodules. Is boron involved in signalling during cell cycle regulation? **New Phytologist**, Malden, v. 183, p. 8–12, 2009.

REGUERA, M.; WIMMER, M,; BUSTOS, P.; GOLDBACH, H. E.; BOLAÑOS, L, BONILLA, I. Ligands of boron in *Pisum sativum* nodules are involved in regulation of oxygen concentration and rhizobial infection. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 33, p. 1039–1048, 2010b.

REYNOLDS, E. S. Use of lead citrate at high pH as an eletron-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROSOLEM, C. A. **Nutrição mineral e adubação da soja**. Piracicaba: POTAFOS, 1980. 80 p.

SAADATI, S.; MOALLEMI, N.; MORTAZAVI, S. M. H.; SEYYEDNEJAD, S. M. Effects of zinc and boron foliar application on soluble carbohydrate and oil contents of three olive cultivars during fruit ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 164, p. 30-34, 2013.

SALVADOR, J. O.; MOREIRA, A.; MURAOKA, T. Sintomas de deficiência de micronutrientes e composição mineral de folhas em mudas de goiabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 9, p. 1655-1662. 1999.

SANTOS, A. R.; MATTOS, W. T.; SILVA, A. A.; MONTEIRO, F. A.; CORRÊA, B. D.; GUPTA, U. C. Boron nutrition and yield of alfalfa cultivar *crioula* in relation to boron supply. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 496-500, 2004.

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

SANTOS, F. P.; OLIVEIRA, R. H.; ROSOLEM, C. A. Resposta do boro aplicado via solução nutritiva no algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Anais eletrônicos...** Viçosa: SBCS, 2003.

SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 1, p. 231-233, 1975.

SHAMS, M.; ETEMADI, N.; BANINASAB, B.; RAMIN, A. A.; KHOSHGOFTARMANESH, A. H. Effect of boron and calcium on growth and quality of '*easy lover'* cut rose. **Journal of Plant Nutrition,** Philadelphia, v. 35, p. 1303-1313, 2012.

SINHA, P.; CHATTERJEE, C. Influence of low boron on yield and seed quality of soybean. **Indian Journal of Agricultural Research**, New Delhi, v.37, p.193–198, 2003.

SILVA, D. H. **Boro em mamoneira**: Aspectos morfológicos e fisológicos relacionados à deficiência e toxicidade. 2007, 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SILVA, D. H.; ROSSI, M. L.; BOARETTO, A. E.; NOGUEIRA, N. L.; MURAOKA, T. Boron affects the growth and ultrastructure of castor bean plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 659-664, 2008.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição química e valor proteico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 571-576, 2006.

SILVA, P. R. F.; FREITAS, T. F. S. Biodisel: the charge and the bond of the fuel producing. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 843-851, 2008.

SHORROCKS, V. M. The occurrence and correction of boron deficiency. In: DELL, B.; BROWN, P. H.; BELL, R. W. **Boron in soils and plants:** reviews. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 121-148.

SMYTH, D. A.; DUGGER, W. M. Effects of boron deficiency on ^{86}rubidium uptake and photosynthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, p. 692-695, 1980.

SNEDDEN, W.A.; FROMM, H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. **New Phytologist**, London, v. 151, p. 35–66, 2001.

SOTIROPOULOS, T. E.; THERIOS, I. N.; DIMASSI, K. N.; BOSABALIDIS A.; KOFIDIS, G. Nutritional status, growth, CO_2 assimilation, and leaf anatomical responses in two kiwifruit species under boron toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 1249–1261, 2002.

STREETER, J. G. Effect of elevated calcium concentration in infected cells of soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodules on nitrogenase activity and N input to the plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 997–1003, 1998.

SUZUKI, K.; SHONO, M.; EGAWA, Y. Localization of calcium in the pericarp cells of tomato fruits during the development of blossom-end rot. **Protoplasma**, Vienna, v. 222, p. 149-156, 2003.

TAIZ, L. Células vegetais. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 29-54.

TAKANO, J.; MIWA, K.; FUJIWARA, T. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. **Trends in Plant Science**, London, v. 13, p. 451–457, 2008.

TANG, P.; DELA FUENTE, R. The transport of indole-3-acetic acid in boron- and calcium-deficient sunflower hypocotyl segments. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, p. 646–650, 1986.

TEASDALE, R. D.; RICHARDS, D. K. Boron deficiency in cultured pine cells. Quantitative studies of the interaction with Ca and Mg. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 1071–1077, 1990.

TING, I. P. **Plant physiology**. Reading: Addison-Wesley, 1982. 642p.

TISDALE, S. L.; NELSON, W. L.; BEATON, J. D. S**oil fertility and fertilizers**. 4. ed. New York: MacMillan, 1985. 754 p.

TOUCHTON, J. T.; BOSWELL, F. C.; MARCHANT, W. H. Boron for soybeans grown in Georgia. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 11, p. 369-378, 1980.

VASCONCELOS, E. D.; REIS M. S.; SEDYIAMA T.; CRUZ, C. D. Análise não-paramétrica da sanidade de sementes e índices de eliminação e classificação de genótipos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, p. 341-348, 2008.

VIETS, F. G. Calcium and other polyvalent cations as accelerators of ion accumulation by excised barley roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 19, p. 69–79, 1944.

VOLLAND, S.; BAYER, E.; BAUMGARTNER, V.; ANDOSCH, A.; LÜTZ, C.; SIMA, E.; LÜTZ-MEINDL, U. Rescue of heavy metal effects on cell physiology of the algal model system *Micrasterias* by divalent ions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 171, p. 154-163, 2014.

WEBB, M. A. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 751–761, 1999.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 2, p. 487–511, 2003.

WU, G.; LI, M.; ZHONG, F.; FU, C.; SUN, J.; YU, L. *Lonicera confusa* has an anatomical mechanism to respond to calcium-rich environment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 338, p. 343-353, 2011.

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

YAMAGISHI, M.; YAMAMOTO, Y. Effects of boron on nodule development and symbiotic nitrogen fixation in soybean plants. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v. 40, p. 265–274, 1994.

YAMAUCHI, T.; HARA, T.; SONODA, Y. Distribution of calcium and boron in the pectin fraction of tomato leaf cell wall. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 27, p. 727–732, 1986.

ZAMBIAZI, R. C.; PRZYBYLSKI, R.; ZAMBIAZI, M. W.; MENDONÇA, C. B. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, p. 111-120, 2007.

ZEHIROV, G.; GEORGIEV, G. Alteration in cell permeability, apoplastic and tissue compartatation of solutes in the root and nodules of boron deficient N_2 fixing soybean plants. **Comptes Rendus Bulgarian Academy Sciences**, Sofia, v. 54, p. 71–74, 2001.

ZEHIROV, G.; GEORGIEV, G. Effects of boron starvation on the apoplastic and total solute concentration influencing nodule growth and acetylene reduction rate. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, Special Issue, p. 367-373, 2003.

ZHANG, F. J.; ZHANG, K. K.; DU, C. Z.; LI, J.; XING, Y. X.; YANG, L. T.; LI, Y. R. Effect of drought stress on anatomical structure and chloroplast ultrastructure in leaves of sugarcane. **Sugar Technology**, New Delhi, v. 17, p. 41-48, 2015.

ZRENNER, R.; SALANOUBAT, M.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum*, L.). **Plant Journal**, Oxford, v. 7, p. 97-107, 1995.

APÊNDICES

Apêndice A - Folhas de soja (BRS 284) cultivada com as doses de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e 12,5 µmol L^{-1} de B na solução nutritiva

Apêndice B - Folhas de planta de soja cultivada com as menores doses de Ca (1,75Ca) e B (3,125B) na solução nutritiva apresentando severos sintomas de deficiência de B

Apêndice C - Folhas de soja cultivada com as maiores doses de Ca (7,25Ca) e menores de B (3,125B) na solução nutritiva apresentando sintomas de deficiência de B (folhas mal formadas)

Apêndice D - Folhas de planta de soja (BRS 284) cultivada com as menores doses de Ca (1,75Ca) e B (3,125B) (esquerda) e com as doses de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e 12,5 µmol L^{-1} de B (direita) na solução nutritiva

Apêndice E - Folhas de soja cultivada em solução nutritiva com o fornecimento de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e 3,125 µmol L^{-1} de B, apresentando sintomas iniciais de deficiência de B

Apêndice F - Folhas de soja (BRS 284) cultivada com a menor dose de Ca (1,75Ca) e a maior dose de B (50B) em solução nutritiva apresentando sintomas severos de toxicidade ao B

Apêndice G - Folhas de planta de soja cultivada com as doses de 4,25 mmol L^{-1} de Ca e 12,5 µmol L^{-1} de B (esquerda) e com as maiores doses de Ca (7,25Ca) e B (50B) (direita) na solução nutritiva

Apêndice H - Raiz de planta de soja cultivada com a menor dose de Ca (1,75Ca) e a maior dose de B (50B) apresentando sintomas severos de deficiência de Ca

Apêndice I - Raiz de planta de soja submetida a doses de 4,25 mmol L^{-1} Ca e 12,5 µmol L^{-1} B na solução nutritiva iniciando processo de nodulação

Apêndice J - Raiz de planta de soja submetida às menores doses de Ca (1,75Ca) e B (3,125B) na solução nutritiva, apresentando sintomas de deficiências

Apêndice K - Folha de soja submetida à menor dose de Ca (1,75Ca) e à maior dose de B (50B) na solução nutritiva

Apêndice L - Visão geral do experimento I instalado na casa de vegetação