

Capítulo 6

Perspectivas de Uso de Métodos Diagnósticos Alternativos: Testes Bioquímicos

Jairo Osvaldo Cazetta¹

Ivana Machado Fonseca²

Renato de Mello Prado³

6.1 Introdução

Os nutrientes minerais desempenham basicamente três tipos de funções na vida das plantas: estrutural, constituinte de moléculas de enzimas e coenzimas ou atuando como ativadores enzimáticos. O nutriente classificado como de função estrutural é aquele que faz parte da constituição de moléculas da estrutura das organelas, células, tecidos e órgãos das plantas.

¹ Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor do Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, km 5, Jaboticabal-SP, 14.884-900, cazetta@fcav.unesp.br

² Engenheira Agrônoma, Mestre, Doutoranda em Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, ivanamfonseca@gmail.com

³ Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor do Departamento de Solos e Adubos, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, rmp Prado@fcav.unesp.br

Desse modo, ocorrendo escassez desse elemento, a planta poderá não ser bem formada e não se desenvolverá adequadamente. A falta de nutriente constituinte de enzimas e coenzimas poderá causar a redução do teor daquela enzima, acúmulo do substrato e diminuição do produto da reação catalisada. Por sua vez, a deficiência de um nutriente com função de ativador enzimático não resultaria em redução do teor da enzima, mas, mesmo assim, poderia ocorrer o acúmulo de substrato e diminuição do produto da reação, pois a enzima, mesmo presente, estaria pouco ativa na planta. De qualquer maneira, a falta de qualquer elemento essencial, independentemente de sua função, causará diminuição do desempenho do vegetal e menor produtividade agrícola.

De modo geral, a severa deficiência dos nutrientes minerais pode ser identificada por sintomas visuais que podem ser agrupados em seis categorias: a) crescimento reduzido; b) clorose uniforme ou em manchas nas folhas; c) clorose internerval; d) necrose; e) coloração purpúrea; f) deformações (PRADO, 2008). Entretanto, uma deficiência pouco pronunciada é difícil de ser detectada por sintomas visuais, mas podem causar significativa redução na produção e na produtividade das culturas. Por isso, existe grande interesse em se desenvolverem métodos que possam prevenir ou remediar a deficiência de nutrientes, visando a maximizar a produção e a minimizar os prejuízos.

Uma das formas de precaver a deficiência é a realização da análise do solo para avaliar sua fertilidade, que pode ser tomada como base para realizar as correções e planejar melhor os programas de adubações. Porém, apesar do desenvolvimento dos métodos químicos de extração e análise do solo, nem sempre pode ser assegurado que os teores de nutrientes detectados na análise são os realmente disponíveis para as plantas, especialmente referentes aos micronutrientes. Além disso, a presença do nutriente no solo também não assegura que será absorvido na quantidade e na proporção adequada pelas plantas. Por isso, normalmente, se realiza também a análise foliar. Essa análise tem a vantagem de ser relativamente rápida e de indicar a quantidade do nutriente absorvida (teor total), mas não permite inferir sobre qual a proporção dessa quantidade que estaria metabolicamente ativa na planta. Devido a esses motivos, tem sido dada grande importância para os testes bioquímicos, pois estes tendem a refletir melhor a concentração metabolicamente ativa dos nutrientes e, assim, indicar mais adequadamente

o estado nutricional da planta, mas são ainda pouco usados. Portanto, objetivou-se discutir os aspectos importantes relacionados a esse tema.

6.2 Limitações da análise foliar para fins de avaliar a nutrição das plantas

A análise química foliar tradicional tem as vantagens de ser rápida e acessível, pois as rotinas analíticas são relativamente simples e, por isso, são efetuadas por muitos laboratórios, uma vez que consiste no preparo dos extratos pela digestão completa da amostra via úmida ou via seca, com posterior quantificação dos nutrientes no extrato inorgânico.

Um dos problemas da determinação do teor total de determinado nutriente no tecido foliar é que esta não distingue os teores metabolicamente ativos e inativos, o que pode induzir equívocos sobre o real estado nutricional da planta (BAR-*AKIVA*, 1961; *LAVON*; *GOLDSCHMIDT*, 1999; *SRIVASTAVA et al.*, 2000). Esse aspecto pode ser ilustrado analisando os resultados obtidos por *Ruiz et al.* (2000) (Tabela 1), que evidenciam a grande discrepância entre os teores totais e teores livres de K, Ca e Mg no tecido foliar. Outro fato importante a ser discutido é que, no meio agrônômico, é bastante difundida a ideia de que nutrientes não estruturais, como exemplo o potássio, encontram-se livres no tecido foliar e são facilmente extraídos da amostra, o que também não corresponde à realidade. Tanto para o potássio como para outros nutrientes, os teores do elemento livre representam apenas uma fração dos teores totais detectados após a digestão completa das amostras (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito de concentrações crescentes de Ca^{2+} ($\text{Ca1} = 1,25$; $\text{Ca2} = 2,50$ e $\text{Ca3} = 5,00 \text{ mmol dm}^{-3}$) na solução nutritiva sobre as concentrações ($\mu\text{mol g}^{-1}$) de K, Ca e Mg totais e livres na matéria seca de plantas de tabaco. Médias \pm desvio-padrão, $n=6$; *** significativo ($P<0,001$), DMS=diferença mínima significativa (RUIZ et al., 2000).

| Tratamentos | K total | Mg total | Ca total | K ⁺ livre | Mg ²⁺ Livre | Ca ²⁺ livre |
|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Ca 1 | 772,5 \pm 26,4 | 720,5 \pm 23,5 | 556,5 \pm 24,2 | 265,3 \pm 17,0 | 307,9 \pm 17,2 | 308,9 \pm 21,6 |
| Ca 2 | 970,3 \pm 27,1 | 584,7 \pm 20,2 | 863,0 \pm 28,6 | 453,0 \pm 20,1 | 433,3 \pm 20,0 | 244,0 \pm 20,1 |
| Ca 3 | 444,6 \pm 25,2 | 288,5 \pm 18,7 | 1241,2 \pm 30,8 | 148,2 \pm 15,8 | 130,9 \pm 14,3 | 669,9 \pm 25,4 |
| Significância | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| DMS _(0,05) | 54,5 | 25,3 | 59,8 | 35,7 | 23,3 | 17,7 |

Suspeita-se que o mesmo comportamento ocorra com micronutrientes e, provavelmente, com muito mais discrepâncias entre os teores livre e totais, principalmente no caso dos elementos metálicos, que possuem maior tendência de formar quelatos e outros compostos complexos. Essa indicação é reforçada pelos resultados obtidos por Hernandez (2009), que estudou os teores de manganês nos tecidos de folha, caule e raiz de mudas de caramboleira (Tabela 2). Essas mesmas amostras foram submetidas a sucessivas extrações com soluções de crescente polaridade e, mesmo assim, a maior parte do manganês ainda foi encontrada no resíduo remanescente, extraída apenas quando foi realizada a completa digestão ácida daquele material (Tabela 2).

Tabela 2 - Extração de manganês das folhas, caule e raízes de mudas de caramboleira, cultivadas em hidroponia (HERNANDES, 2009).

| Extrator | Mn em Folhas | | Mn em Caule | | Mn em Raízes | |
|----------|--------------|----------|-------------|----------|--------------|----------|
| | | | | | | |
| Água | 43d | (6,95%) | 5d | (2,53%) | 16d | (2,35%) |
| DTPA | 65c | (10,50%) | 25c | (12,63%) | 45c | (6,63%) |
| HCl 1N | 139b | (22,45%) | 38b | (19,19%) | 142b | (20,92%) |
| Residual | 372a | (60,10%) | 130a | (65,65%) | 476a | (70,10%) |

Pelas informações da literatura discutidas, pode-se inferir que o método de análise foliar com a digestão completa da amostra pode não refletir o real estado nutricional das plantas, o que é bastante preocupante. E ainda, esses resultados (Tabelas 1 e 2) também sugerem que métodos diferentes, ou um mesmo método executado com adaptações aleatórias, de acordo com a conveniência ou com a condição de cada laboratório, podem levar a resultados distintos. Portanto, podem não ser comparáveis quando se confrontam resultados de pesquisas distintas ou, ainda, sujeitos a interpretações equivocadas sobre a nutrição das plantas.

Dentro desse contexto, pode ser encontrada, no recém-publicado manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes da Embrapa (MIYAZAWA et al., 2009), a proposta de diferentes formas de extração dos nutrientes do tecido vegetal, ao invés de se buscar uma metodologia-padrão, o que, frente ao acima exposto, parece preocupante. Dentre os métodos relacionados no referido manual, pode-se destacar a proposta de extração com solução de HCl 1 mol dm⁻³ (processo sem digestão), onde está descrito que tal método é aplicável para a determinação total de B, Ca, Cd, Co, Cu, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb e Zn. Embora tal método tenha sido proposto com base no trabalho de Miyazawa et al. (1984), os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2 sugerem que nem sempre será possível realizar a extração do teor total com HCl 1 mol dm⁻³.

Ressalta-se que, no trabalho de Hernandes (2009), cada amostra foi submetida a extrações sucessivas e subsequentes, sendo três repetições (três vezes) de extração com água, três com solução de DTPA e três com solução de HCl 1 mol dm⁻³. Mesmo assim, o resíduo remanescente, após todas essas extrações sucessivas, ainda continha a maior proporção do Mn total (Tabela 2). Poderia ser argumentado que a caramboleira não seja o melhor exemplo a ser considerado, mas sugere fortemente que a extração com HCl 1 mol dm⁻³ (uma única vez) não poderia ser generalizada para todos os tipos de plantas e, também, que os resultados obtidos por diferentes métodos não possam ser confrontados como sendo iguais. Por outro lado, frente ao que vem sendo discutido, é bem possível que o método sem digestão (MIYAZAWA et al., 1984) represente melhor o teor metabolicamente ativo dos nutrientes do que os métodos de digestão total.

Considerando que a análise do solo pode não ser um guia seguro para

uma a fertilização do solo que garanta a nutrição plena da cultura, por não fornecer informações sobre a capacidade de absorção de nutrientes da planta, e que a análise foliar tradicional tem a vantagem de indicar a qualidade e a quantidade de nutrientes absorvidos, mas é incapaz de diferenciar entre as partes metabolicamente ativas e inativas dos elementos, desde a década de 60 vem sendo sugerida a incorporação de aspectos fisiológicos e ecológicos para compor o diagnóstico, usando processos metabólicos (BAR-AKIVA, 1961; BAR-AKIVA, 1972; LAVON e GOLDSCHMIDT, 1999). Pois, apesar da intensa investigação no domínio da análise das plantas e os avanços tecnológicos em instrumentação, ainda existem muitas dificuldades na interpretação dos resultados obtidos pela análise foliar do elemento mineral. Em função disso, de longa data, vêm sendo buscados métodos alternativos.

6.3 Desenvolvimento dos primeiros testes alternativos (aplicações foliares, injeção de nutriente nas plantas, teste da meia-folha)

Uma das primeiras propostas foi a pulverização de algumas plantas com o nutriente a ser avaliado e comparar os efeitos com as plantas não tratadas ou, ainda, a pulverização de algumas folhas ou órgãos da planta com sintoma de deficiência e comparar os efeitos com as respectivas partes não tratadas ou, então, acompanhar o desaparecimento ou a evolução dos sintomas numa planta pulverizada (MALAVOLTA, 1980).

Outro sistema alternativo de diagnose mineral foi a injeção foliar proposto por W.A. Roach, por volta de 1940, e consiste em colocar a solução num pequeno recipiente e fornecê-la através de um pavio de algodão em contato com um corte feito na folha. Na modificação proposta por P.T. Alvim, é feita uma lingueta cortando a lâmina foliar, e a extremidade livre da lingueta é mergulhada numa solução do nutriente em estudo contida em uma cápsula de gelatina. Desse modo, se o elemento fornecido estiver deficiente na folha, a mesma o absorve, e o sintoma de deficiência desaparece naquela região da folha (ROACH, 1939; MALAVOLTA, 1980).

Em 1945, B.N. Lal também fez uma série de experiências com esse mesmo tipo de método, nas quais primeiramente eram desenvolvidos

testes com soluções de corantes e, então, os métodos que apresentavam as melhores formas de absorção e distribuição eram usados para injetar soluções contendo N, P, K Mg e Fe, respectivamente, em plantas cultivadas em areia com solução nutritiva contendo todos os nutrientes, exceto aquele a ser injetado para estudo (LAL, 1945).

Para estudar a clorose que aparecia em folhas de mudas de café, Costa e Mendes (1951) perceberam que a absorção da solução de ferro pulverizada na superfície da folha não era muito eficiente para uma rápida observação dos resultados. Por isso, adaptaram uma técnica de prévia abrasão da superfície de metade da folha usando o abrasivo carborundum, com posterior aplicação da solução de nutriente nessa área com o auxílio de algodão embebido. No período de 10 a 40 dias, era feita a comparação dos lados tratados e não tratados, para a observação do desaparecimento ou evolução dos sintomas.

A partir do desenvolvimento dessas primeiras experiências, uma série de outros tipos de testes envolvendo a incubação de parte do tecido da planta e também a extração e determinação de íons, compostos orgânicos específicos e enzimas passaram a ser estudados. Esses métodos, que denominaremos daqui por diante como métodos bioquímicos, serão discutidos a seguir.

6.4 Aspectos gerais sobre testes bioquímicos

Os testes bioquímicos são aqueles em que se procura diagnosticar a deficiência ou o nível de um específico nutriente mineral da planta através da medida de alterações na atividade de enzimas (testes enzimáticos), no acúmulo ou desaparecimento de certos metabólitos, na resposta imunológica, no perfil proteico ou, ainda, na expressão de determinados genes, eventos esses relacionados a vias metabólicas dependentes direta ou indiretamente do nutriente em consideração. Naturalmente, frente a uma deficiência mineral, a planta pode desencadear vários desses eventos ao mesmo tempo, pois geralmente estão interligados pelas vias metabólicas. Entretanto, neste capítulo, serão considerados em grupos distintos por questões meramente didáticas.

6.4.1 Diagnose com base na atividade enzimática (Testes enzimáticos)

Dentre os primeiros pesquisadores que procuram desenvolver métodos bioquímicos, destaca-se um grupo de Israel, liderado por Bar-akiva, que desenvolveu vários estudos com cítrus, a partir de 1961. A sequência de trabalhos desenvolvidos por aquele grupo pode ser encontrada numa revisão publicada por Lavon e Goldsmith (1999).

A partir daqueles estudos considerados pioneiros e do desenvolvimento dos equipamentos e de técnicas de análises química e bioquímica, muitos trabalhos têm dado atenção às respostas bioquímicas das plantas em função do estado nutricional.

Ressalta-se que os testes bioquímicos não fornecem diretamente a concentração de nutrientes minerais nas plantas, entretanto a atividade de determinada enzima ou a alteração no teor de certas substâncias permite a indicação da suficiência ou deficiência de um nutriente relacionado. O teste pode ser executado em tecido deficiente ou no tecido em que o elemento suspeito foi infiltrado para reativar o sistema enzimático, sendo realizado em extratos de tecido foliar ou pela incubação de partes do próprio tecido a fim de fornecer testes mais rápidos (BAR-AKIVA, 1984).

Diante da importância dos micronutrientes na vida das plantas por serem átomos constituintes de moléculas de enzimas ou de macromoléculas fundamentais, como é o caso do Fe, Cu, Mn, Zn e Mo, existe maior possibilidade de sucesso na busca de correlação entre suas deficiências e a atividade de enzimas específicas. Por isso, existem vários trabalhos com foco nesses nutrientes. Por exemplo, testes envolvendo peroxidase foram utilizados com sucesso para distinguir as deficiências de ferro e manganês em cítrus (*Citrus spp. L.*) (BAR-AKIVA, 1961; BAR-AKIVA et al., 1967). Neste caso, na deficiência de ferro, a atividade da peroxidase é inibida, enquanto na de manganês a peroxidase pode ter sua atividade aumentada. Isso ocorre pelo fato de o ferro ser um componente da peroxidase, enquanto o manganês não. No mesmo sentido, são encontradas evidências de associações entre a redução da atividade da catalase e da peroxidase com deficiência de ferro em grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) (KARUR et al., 1984), soja (LEIDI et al., 1986), milho (NENOVA e STOYANOV, 1995) e girassol (RANIERI et al., 2001).

Com respeito à deficiência de ferro e manganês, García e Galindo (1991) também propuseram a determinação da atividade da clorofilase como

indicador bioquímico para detectar o estado nutricional de plantas de cítrus.

Existem fortes evidências também da relação entre a atividade da anidrase carbônica com a deficiência de zinco em cítrus (BAR-AKIVA; LAVON 1969), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (CHATTERJEE et al., 1998), grama-preta (*Vigna mungo* L.) (PANDEY et al., 2002) e pecã (*Carya illinoensis* Koch) (SNIR, 1983).

A atividade da álcool desidrogenase também reduz sua atividade em raízes de plantas de arroz inundado, deficientes em zinco (MOORE; PATRICK, 1988).

Polle et al. (1992) relataram que as atividades da superóxido dismutase e algumas outras enzimas de proteção aumentaram em folhas de Noruega spruce (*Picea abies* L.) deficientes em manganês. A aconitase e a catalase também reduzem suas atividades na deficiência de ferro, mas aumentam na deficiência de manganês (VALENZUELA; ROMERO, 1988), e, de acordo com García et al. (1990), a aconitase tem-se mostrado mais precisa que a peroxidase, na detecção e diferenciação das deficiências de Fe e Mn.

Uma vez que o molibdênio é importante na estrutura da molécula da redutase do nitrato, a deficiência nesse nutriente impõe redução da atividade dessa enzima no tecido das folhas das plantas (SHAKED; BAR-AKIVA, 1967; CAZETTA; VILLELA, 2004).

No caso dos macronutrientes, por serem elementos que possuem várias funções na vida das plantas, normalmente suas deficiências afetam muitos sistemas fisiológicos ao mesmo tempo, o que dificulta o estabelecimento de testes bioquímicos específicos. Entretanto, Besford (2006) observou que a atividade da fosfatase ácida foi significativamente elevada nos extratos de folhas de plantas de milho, trigo, aveia, cevada, abóbora e tomate, quando cultivadas em solução nutritiva com baixa concentração de fósforo, tendo concluído que a medida da atividade dessa enzima pode ser útil como indicador da deficiência de fósforo nas culturas. Achituv e Bar-akiva (1976) verificaram que também existe a possibilidade de diagnosticar a deficiência de P pela medida da atividade da GOT (glutamato-oxaloacetato transaminase), pois observaram boa correlação entre o teor de P e a atividade desta enzima, bem como a possibilidade de diferenciar as deficiências de P e Zn, usando a infiltração do tecido foliar em soluções com e sem esses

nutrientes.

Na literatura, existem vários trabalhos que também sugerem a possibilidade do uso da piruvato kinase como indicador fisiológico do estado nutricional das plantas relacionada ao teor de K, Ca e Mg (LAVON; GOLDSMITH, 1999; RUIZ et al., 1999; RUIZ et al.; 2000). Por exemplo, quando plantas de tabaco foram cultivadas em solução nutritiva com crescentes concentrações de cálcio, Ruiz et al. (2000) observaram diminuição do teor de K e Mg das folhas e também na atividade da piruvato kinase, sugerindo que esta enzima pode ser usada como um bioindicador do conteúdo, bem como do balanço entre os níveis de Ca, Mg e K. Com relação à deficiência de potássio, Lavon et al. (1995) verificaram aumentos significativos da atividade de amilases e invertases ácidas em plantas de cítrus, o que também interferia no acúmulo de carboidratos solúveis, fato que não era característico nas plantas deficientes em cálcio e magnésio.

A redutase do nitrato tem boas perspectivas de ser usada para diagnosticar o estado nutricional das plantas em nitrogênio, com os primeiros estudos desenvolvidos com plantas de cítrus por Bar-akiva e Sterbaum (1965), mas existem muitos trabalhos envolvendo a nutrição com esse macronutriente e a atividade dessa enzima, podendo citar como exemplos os ensaios com videira (BAR-AKIVA et al., 1967); gramíneas forrageiras (BAR-AKIVA et al., 1970); feijoeiro (CAMACHO et al., 1995) e café (REIS et al., 2009).

A atividade da redutase do nitrato foi usada com sucesso para determinar o nível de nitrogênio em folhas de cítrus (BAR-AKIVA, 1969), observando-se a atividade inicial da enzima e o aumento da atividade quando o tecido da folha era incubado com solução contendo elevada concentração de nitrogênio na forma de nitrato.

É interessante notar que Bar-akiva foi o primeiro pesquisador a adotar o conceito de “reativação” da atividade de metaloenzimas. Tal conceito foi desenvolvido através da técnica que consiste em incubar uma parte do tecido foliar em meio de incubação sem o elemento a ser diagnosticado e outra parte em outro meio de incubação contendo o elemento de que a planta é supostamente deficiente, visando a observar a diferença, ou reativação, na atividade enzimática. Esse efeito de reativação enzimática foi constatado pelo estímulo da atividade da peroxidase, ascorbato oxigenase e redutase do

nitrato em folhas de videira deficientes em Fe, Cu e Mo, respectivamente, após a adição do elemento na solução onde o tecido foliar foi incubado. No caso da piruvato kinase para avaliar K e Mg, o método da reativação é mais complicado porque esta enzima é ativada por ambos, sendo que, na presença de um deles, o efeito do outro é pouco pronunciado. Entretanto, quando os tecidos foram incubados em meios deficientes em cálcio, a atividade da piruvato kinase sempre foi muito mais elevada em comparação com a incubação na solução-controle (contendo todos os íons, inclusive Ca), pois a presença de Ca inibe a atividade desta enzima (LAVON; GOLDSMITH, 1999).

O conceito e o método da reativação da atividade enzimática são importantes pelo fato de se usar tecido da mesma planta e o diagnóstico ser realizado com base no grau da reativação ou inibição da atividade da enzima específica, não requerendo a comparação com a atividade de plantas bem nutridas ou com uma escala de valores que pudessem ser considerados normais (LAVON; GOLDSMITH, 1999). Isso é um avanço importante, pois o valor absoluto da atividade das enzimas, geralmente, é bastante dependente do genótipo, do manejo e das condições edafoclimáticas reinantes no momento da amostragem das plantas (LEMAITRE et al., 2008).

Um grande número de trabalhos tem sido desenvolvido nos últimos 50 anos, envolvendo a possibilidade de utilização de enzimas para a aplicação na diagnose do estado nutricional das plantas (MALAVOLTA et al., 1997; LAVON; GOLDSMITH, 1999; SRIVASTAVA; SINGH, 2006), sendo que as melhores perspectivas de aplicação prática são as enzimas apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Enzimas com atividades relacionadas à deficiência de nutrientes específicos e com perspectiva de aplicação em testes bioquímicos para a avaliação do estado nutricional das plantas (MALAVOLTA et al., 1997; LAVON; GOLDSMITH, 1999; SRIVASTAVA; SINGH, 2006)

| Nutriente deficiente | Respostas enzimáticas relacionadas |
|----------------------|---|
| N | Redução da atividade da sintetase da glutamina, Redutase do nitrato, Glutamato desidrogenase, Fosfoenol-piruvato carboxilase e Ribulose-bifosfato carboxilase. |
| P | Redução da atividade da Fosfatase, Ribonuclease, Glutamato-Oxaloacetato transaminase, Citrato sintetase, Aconitase, enzima málica, Fosfoenol-piruvato carboxilase e Succinato desidrogenase; Aumento da atividade da Arginase e Arginina descarboxilase. |
| K | Aumento da atividade das enzimas: Cadaverina, invertase ácida e β -amilase. Redução da atividade da N-carbamil putrescina amino-hidrolase e da piruvato kinase |
| Ca | Redução da atividade da Succinato desidrogenase, Redutase do nitrato e Ribulose-bifosfato carboxilase. Aumento da atividade da piruvato kinase. |
| Mg | Redução da atividade da Invertase ácida; Aumento da atividade da Invertase alcalina. |
| B | Redução da atividade da ATPase e da Fenilalanina amônia liase. |
| Cu | Redução da atividade da Oxidase do ácido ascórbico. |
| Fe | Redução da atividade da Peroxidase, Aldolase e Aconitase; Aumento da atividade da Peroxidase. |
| Mn | Redução da atividade da Catalase, Fenilalanina amônia liase, Tirosina amônia liase e Polifenoloxidase. |
| Mo | Redução da atividade da Redutase do nitrato e da Peroxidase. |
| Ni | Atividade da urease. |
| Zn | Redução da atividade da Anidrase carbônica, Redutase do nitrato e Aldolase. |

6.4.2 Diagnose com base em alterações no teor de metabólitos específicos

Quando uma planta está sob estresse fisiológico, incluindo deficiências de macronutrientes e micronutrientes, ocorrem limitações de certos eventos fisiológicos e distorções no metabolismo, que podem induzir o acúmulo ou a diminuição de certos compostos no tecido vegetal (RABE, 1990; LAVON et al., 1995). Nos casos em que existe correlação entre o teor de um composto com o estado nutricional de um nutriente mineral, pode ser estabelecido um teste bioquímico para avaliar o estado nutricional da planta com relação a tal nutriente.

O acúmulo de metabólitos mais simples pode ocorrer devido aos processos de degradação de macromoléculas (LAVON et al., 1995) ou, então, por nova biossíntese (RABE; LOVATT, 1984). Entre os compostos nitrogenados que se acumulam nas plantas em função da deficiência de nutrientes estão vários aminoácidos, com destaque para a arginina que aparece na maioria das deficiências, até compostos mais específicos, como a putrescina e enzimas relacionadas, que se acumulam mais na deficiência de potássio (RABE, 1990). Referente a compostos não nitrogenados que podem acumular-se nos tecidos, encontra-se o exemplo da xilose em folhas de cítrus deficientes em manganês (BAR-AKIVA, 1961). Outro exemplo é o acúmulo de maltose e outros açúcares solúveis em folhas deficientes em potássio. Nesse contexto, existem indícios de que o acúmulo de maltose esteja relacionado à degradação do amido, em função de se ter observado um aumento paralelo na atividade da alfa-amilase e, no caso dos açúcares solúveis, devido ao aumento na atividade da invertase ácida (LAVON; GOLDSMITH, 1999).

Tem sido demonstrado que o boro possui a característica de fazer ligação cruzada entre dois monômeros de ramnogalacturonana, para formar complexos que estabilizam a parede celular das plantas, sendo que a relação do teor de complexos boratos com o teor total de monômeros livres parece ser um bom indicador da deficiência de boro (MATSUNAGA; ISHII, 2006).

De forma geral, a deficiência em um nutriente essencial, seja ele macronutriente, seja micronutriente, interfere em um ou mais processos fisiológicos, com reflexos em diferentes vias metabólicas, pois estas formam

sistemas integrados que mantêm a vida e o desenvolvimento das plantas. Desse modo, não é fácil identificar compostos cuja concentração varie em função do nível de um único nutriente. Entretanto, existem algumas respostas metabólicas mais diretamente relacionadas à falta de alguns nutrientes, com boas possibilidades de serem usadas na diagnose do estado nutricional das plantas (Tabela 4).

Tabela 4 - Metabólitos relacionados com a deficiência de nutrientes específicos e com perspectiva de aplicação em testes bioquímicos para a avaliação do estado nutricional das plantas (RABE 1990; MALAVOLTA et al., 1997; LAVON; GOLDSMITH, 1999; SRIVASTAVA et al., 2006).

| Nutriente deficiente | Resposta metabólica da planta |
|----------------------|--|
| N | Acúmulo de Asparagina, Prolina, Amônio e Açúcares totais; Redução do teor de Clorofila. |
| P | Acúmulo de Arginina, Prolina, Lisina, Histidina, Citrulina, Ornitina e Aminoácidos livres. |
| K | Aumento dos teores de Ácido piperólico, Putrescina e Maltose. |
| Fe | Acúmulo de Ácido cítrico. |
| Mn | Acúmulo de Xilose. |
| Zn | Acúmulo de Açúcares não redutores, Arginina, Prolina, Aminoácidos livres; Redução dos níveis de Auxina. |
| B | Redução do teor de complexos Açúcar-borato. |

6.4.3 Testes biotecnológicos

Com o desenvolvimento da biotecnologia, também surgiram outras possibilidades de se avaliar o estado nutricional das plantas. Como exemplo, pode ser citado o trabalho de Zeinab e Salama (2001), que utilizaram a eletroforese com a técnica SDS-PAGE para analisar o perfil proteico de folhas de ervilha deficientes em cobre, verificando o aparecimento de

intensas bandas correspondendo a proteínas de elevada massa molecular (94KD e 67KD) nas folhas deficientes em cobre, o que pode ser usado como bioindicador dessa deficiência.

Os testes imunológicos para proteínas específicas também podem ter boas perspectivas no campo da diagnose com testes bioquímicos, pois o teste de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) permitiu detectar alterações significativas do teor da proteína fenolase em plantas de trigo e algodão deficientes em zinco, com a vantagem de ser um teste relativamente rápido e barato (RAO; OWNBY, 1993).

A deficiência de zinco foi associada com uma diminuição do RNA mensageiro para a anidrase carbônica, juntamente com uma diminuição na atividade desta enzima do arroz (*Oryza sativa* L.), indicando que essa técnica seria um método rápido para detectar a deficiência deste micronutriente nas plantas (SASAKI et al., 1998).

Almansa et al. (1989) verificaram alterações no padrão isoenzimático da superóxido dismutase em plantas deficientes em ferro, manganês e cobre, sugerindo que tais variações poderiam ser utilizadas como marcadores moleculares para diferenciar tais deficiências em plantas de cítrus.

O estudo dos genes relacionados aos transportadores de macronutrientes e de micronutrientes tem sido realizado usando as mais variadas técnicas. Esse tipo de estudo começa a definir melhor as bases moleculares que regulam a absorção de macronutrientes e micronutrientes e, em muitos casos, tem sido demonstrado que a disponibilidade do nutriente afeta a transcrição do gene do transportador (CORUZZI; BUSH, 2001).

Uma vez que a medida da expressão gênica envolve a detecção de RNAm de proteínas específicas, enzimáticas ou não, esse método bioquímico poderia ser adaptado para analisar a expressão de qualquer das enzimas citadas anteriormente neste capítulo, bem como suas isoenzimas. Portanto, é uma técnica com grandes potencialidades de ser aplicada com sucesso.

6.5 Dificuldades atuais para implantação de testes bioquímicos como rotina

Os métodos tradicionais de análise química foliar, de forma geral, utilizam coleta das amostras sem grandes preocupações com o horário e o tempo de amostragem, transporte e conservação das amostras, pois as

análises não serão realizadas no tecido vivo, mas no material seco em estufas a $65\pm 5^{\circ}\text{C}$. Após a secagem, é realizada uma moagem da matéria seca que, além de facilitar o procedimento analítico, tem a importantíssima função de homogeneizar a amostra composta, trazida do campo, de modo que qualquer porção do material moído será representativa da amostra. A seguir, uma parte do material moído é submetida à digestão completa através do ataque com ácidos (via úmida) ou incineração na mufla (via seca), e esse procedimento é realizado sempre da mesma forma, independentemente da espécie ou da parte da planta a ser analisada. Posteriormente, os nutrientes são quantificados no extrato inorgânico, usando técnicas analíticas consagradas, bastante simples, conhecidas e difundidas em praticamente todos os laboratórios agrônômicos. Esse procedimento é aplicado para praticamente todo e qualquer material vegetal, o que facilita a aplicação desse tipo de análise, pois as únicas adaptações, quando eventualmente requeridas, são simples alterações na diluição dos extratos para o ajuste na faixa ótima de trabalho analítico.

No caso da maioria dos testes bioquímicos, a análise deve ser feita utilizando o tecido vivo. Portanto, a forma, o horário e o tempo da amostragem, bem como a maneira de conservar e transportar as amostras assumem uma grande importância para o bom resultado das determinações subsequentes.

Esses aspectos variam bastante entre espécies, pois, enquanto algumas plantas possuem folhas mais coriáceas e boa durabilidade, outras são extremamente delicadas e sensíveis, sujeitas ao rápido murchamento e degeneração. Além disso, os extratos precisam ser preparados de forma distinta, dependendo da substância a ser analisada. Mesmo considerando uma mesma planta, a análise de distintos órgãos, geralmente, requer adaptação da metodologia. Por exemplo, quando o teste requer a incubação do tecido foliar fresco num meio aquoso, é preciso incluir surfactantes e/ou outros tensoativos que induzam a submersão do tecido e diminuam a tensão superficial do líquido para promover o contato do tecido com o meio, para que as reações desejadas ocorram. Nesse contexto, Cazetta e Villela (2004) demonstraram que modificações tanto no tipo quanto na concentração de solventes e tensoativos no meio alteram significativamente o resultado obtido para a atividade da redutase do nitrato. Do mesmo modo, observaram diferenças nos resultados variando a concentração do substrato da enzima,

o pH, a concentração da solução-tampão, bem como no teste realizado com ou sem a infiltração a vácuo, que consiste em variáveis que precisam ser otimizadas para cada espécie vegetal, ou mesmo distintos tecidos de uma mesma planta. Como exemplo, mesmo usando um tensoativo bastante eficiente tem-se o problema de que, se por um lado o uso de concentrações muito baixas não é suficiente para promover o adequado contato do tecido com o meio de incubação, por outro lado, pequenas elevações na concentração podem causar prejuízos significativos nos resultados (Figuras 1 e 2).

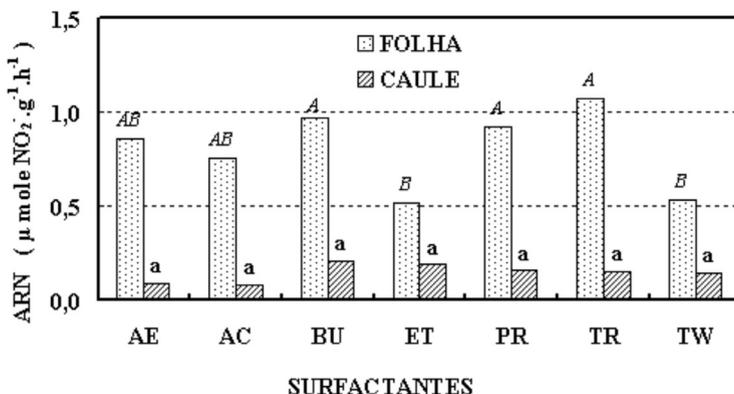


Figura 1 - Atividade da redutase do nitrato (ARN) determinada no tecido de folha e caule de *Brachiaria radicans* incubado em meio reacional contendo diferentes surfactantes (AE, acetato de etila; AC, acetona; BU, butanol; ET, etanol; PR, n-propanol; TR, triton-X-100; TW, tween-80). Para cada tecido, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%) (CAZETTA;VILLELA, 2004).

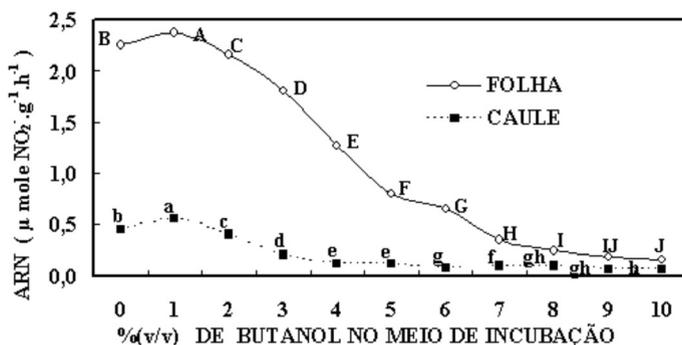


Figura 2. Atividade da redutase do nitrato (ARN) determinada no tecido de folha e caule de *Brachiaria radicans* incubado em meio reacional contendo diferentes concentrações de butanol. Para cada tecido, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%) (CAZETTA; VILLELA, 2004).

O processo da infiltração a vácuo pode ser necessário em tecidos pubescentes ou esponjosos, caso contrário a solução do meio de incubação não consegue entrar nas lacunas do tecido, o que impede o contato com as células, fato que também influi nos resultados (Figura 3).

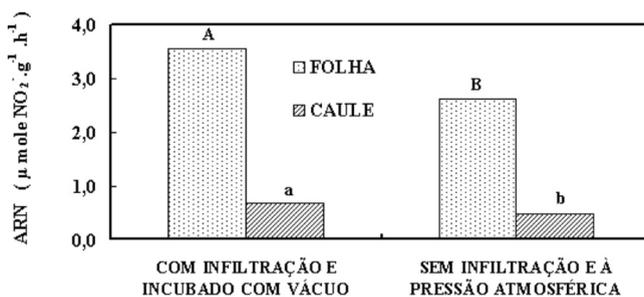


Figura 3. Atividade da redutase do nitrato (ARN) determinada no tecido de folha e caule de *Brachiaria radicans* com e sem infiltração a vácuo. Para cada tecido, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%) (CAZETTA; VILLELA, 2004).

Outro aspecto que contribui na dificuldade de implementação generalizada dos testes bioquímicos são as interações entre distintos fatores que podem interferir nos resultados. Como exemplo desse aspecto, pode-se citar que Bar-akiva e Lavon (1969) verificaram a relação da atividade da anidrase carbônica com a deficiência de zinco em condições controladas, mas concluíram também que a validação do método enzimático, como técnica para diagnóstico de plantas sob as condições de campo, dependia do estudo sobre procedimentos de amostragem, interferências das variáveis ambientais, inclusive de outros nutrientes.

Mesmo com os conhecimentos de fisiologia vegetal de que se dispõem atualmente, vários aspectos ainda são de difícil compreensão e domínio, necessitando de extensa pesquisa para que seja possível estabelecer métodos adequados. Dentre esses aspectos que precisam de atenção da pesquisa, podem ser citados: a) Esclarecimento das interações e coordenações das vias metabólicas direta ou indiretamente relacionadas aos distintos nutrientes; b) Conhecimento das respostas bioquímicas em relação a diferentes sistemas de fornecimento dos nutrientes, pois muitos resultados são obtidos em condições de hidroponia ou completamente distintas das reais situações no campo; c) Compreensão da interação das deficiências múltiplas que podem estar ocorrendo ao mesmo tempo, pois a maioria das pesquisas trabalha apenas com a omissão do nutriente de interesse para verificar se tem respostas bioquímicas, mantendo os demais em níveis adequados; d) Estabelecer o relacionamento causal entre os vários mecanismos de sinalização e transdução pelos quais a deficiência no sistema radicular consegue coordenar mudanças na fisiologia da parte aérea (SRIVASTAVA et al., 2006).

A necessidade de infraestrutura e pessoal especializado, mesmo referente aos técnicos de laboratório, é também um aspecto limitante, pois ainda são poucos os laboratórios que possuem as condições mínimas, bem como pessoal especializado para absorver e aplicar os métodos bioquímicos de forma correta e segura.

6.6 Perspectivas

Embora hoje ainda existam muitas dúvidas e aspectos a serem

esclarecidos, a biologia molecular tem-se expandido muito e vem estimulando a formação de pessoal e a criação de empresas especializadas em produtos, equipamentos e técnicas que, dia a dia, promovem condições mais práticas, seguras e acessíveis para que mais laboratórios utilizem e familiarizem-se com técnicas bioquímicas.

O desenvolvimento de biossensores, por exemplo, é uma área que poderá revolucionar a diagnose por testes bioquímicos, facilitando o estudo e o uso desse tipo de teste. Os biossensores são definidos como aparelhos analíticos compactos que incorporam um elemento (sensor) de reconhecimento biométrico ou biológico (ácido nucleico, enzima, anticorpo, receptor, tecido ou célula), associado com um sistema de transdução que permita processar o sinal produzido quando o sensor entra em contato com a substância a ser analisada (VELASCO-GARCIA; MOTTRAM, 2003; COCK et al., 2009). Para a maioria das aplicações, os limites de detecção dos biossensores atualmente em teste são satisfatórios ou excessivos. Embora muitos sensores ainda tenham pouca durabilidade, tem sido estudada a técnica da imobilização das enzimas sensoras, a qual possui perspectiva de sucesso para manter a estabilidade e a atividade das mesmas, aumentando a vida útil e a aplicabilidade dos biossensores (TOTHIL, 2001).

Ao lado dos biossensores, tem sido esperado um grande impacto do uso comercial de marcadores bioquímicos na identificação de deficiências nutricionais, pelo desenvolvimento de testes rápidos (“kits”) num futuro próximo, similares aos “kits” que já são usados para diagnosticar uma grande variedade de viroses (SRIVASTAVA et al., 2006).

6.7 Conclusões

A análise do solo não garante que a planta vá absorver os nutrientes de forma qualitativa e quantitativamente adequada, e a análise foliar tradicional não diferencia a fração fisiologicamente ativa e inativa dos nutrientes na planta. Por isso, existe uma necessidade e uma crescente busca da comunidade científica por formas de diagnose mais eficientes e/ou complementares. Os testes bioquímicos representam uma alternativa importante, pois podem refletir melhor a concentração metabolicamente

ativa dos nutrientes e a real condição nutricional das plantas em determinado momento da cultura.

A grande demanda e o interesse pelos métodos bioquímicos de diagnose são evidentes pela grande quantidade de estudos que se encontra na literatura, que têm sido desenvolvidos nesse sentido.

Pelo fato de os micronutrientes Fe, Cu, Mn, Zn e Mo serem constituintes de enzimas específicas, a pesquisa de testes bioquímicos para diagnosticar a deficiência destes elementos já se encontra bastante avançada.

Devido aos macronutrientes terem participação em muitos aspectos fisiológicos e haver forte interação entre as vias metabólicas desses nutrientes, há maior dificuldade em se estabelecerem testes bioquímicos específicos. Porém, existem boas perspectivas de sucesso, mas que demandam maior esforço da pesquisa para serem estabelecidos métodos bioquímicos seguros e práticos.

Os métodos bioquímicos tradicionais ainda encontram barreiras para uma aplicação prática e generalizada no meio agrônomo devido à dificuldade de padronização da metodologia para as diferentes culturas e a falta de pessoal e infraestrutura adequada para absorver essa tecnologia. Entretanto, o grande avanço da pesquisa com marcadores moleculares e o desenvolvimento de biossensores têm criado a expectativa de grande impacto, num futuro próximo, do uso comercial de equipamento e “kits” práticos para a diagnose de deficiências de nutrientes baseados em testes bioquímicos.

6.8 Literatura citada

- ACHITUV, M.; BAR- AKIVA, A. Glutamic-oxaloacetic transaminase in leaves of phosphorus-deficient citrus plants. **Physiologia Plantarum**, v.36, p.368-373, 1976.
- ALMANSA, M.S.; RÍO, A.; ALCARAZ, C.F.; SEVILHA, F. Isoenzyme pattern on superoxide dismutase in different varieties of citrus plants. **Physiologia Plantarum**, v.76, p.563-568, 1989.
- BAR- AKIVA, A. Biochemical indications as a means of distinguishing between iron and manganese deficiency symptoms in citrus plants. **Nature**, v.190, p.647-648, 1961.

- BAR-AKIVA, A. Leaf analysis: possible limitations. **Proceedings**. 18th International Hort. Congress. v.4, p.333–345, 1972.
- BAR-AKIVA, A. Substitutes for benzidine as H-donors in the peroxidase assay for rapid diagnosis of iron deficiency in plants. **Communication Soil Science and Plant Analysis**, v.15, p.929–934, 1984.
- BAR-AKIVA, A.; STERBAUM, J. Possible use of the nitrate reductase activity of leaves as a measure of the nitrogen requirement in citrus trees. **Plant and Cell Physiology**, v.6, p.575–577, 1965.
- BAR-AKIVA, A.; SAGIV, J.; LESHEM, J. Nitrate reductase activity as an indicator for assessing the nitrogen requirement of grass crops. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v.21, p.405–407, 1970.
- BAR-AKIVA, A.; KAPLAN, M.; LAVON, R. The use of biochemical indicator for diagnosing micronutrient deficiencies of grapefruit trees under field conditions. **Agrochemical**, v.11, p.283–288, 1967.
- BAR-AKIVA, A.; LAVON, R. Carbonic anhydrase activity as an indicator of zinc deficiency in citrus leaves. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.44, p.359–362, 1969.
- BESFORD, R.T. Phosphorus nutrition and acid phosphatase in the leaves of seven plant species. **Journal of the science of food and agriculture**, v.30, p.281–285, 2006.
- CAMACHO, R.; CALVACHE, A.M.; FALCÃO, N.; FERNANDEZ, F.; DEMATTÊ, J.A.M.; MALAVOLTA, E. Avaliação do estado nutricional do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em solução nutritiva, com variação no fornecimento de N, P e K. **Scientia Agricola**, v.52, p.422–425, 1995.
- CAZETTA, J.O.; VILLELA, L.C.V. Nitrate reductase activity in leaves and stems of Tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). **Scientia Agricola**, v.61, p.640–648, 2004.
- CHATTERJEE, C.; JAIN, R.; DUBE, B. K.; NAUTIYAL, N. Use of carbonic anhydrase for determining zinc status of sugar cane. **Tropical Agriculture**, v.75, p.480–483, 1998.
- COCK, L.S.; ARENAS, A.M.Z.; APONTE, A.A. Use of enzymatic biosensors as quality indices: A synopsis of present and future trends in food industry. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.69, p.270–280, 2009.
- CORUZZI, G.; BUSH, D.R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, v.25, p.61–64, 2001.
- COSTA, A.S.; MENDES, J.E.T. Clorose das folhas do cafeeiro excelsa. **Bragantia**, v.11, p.222–226, 1951.
- GARCÍA, A.L.; GALINDO, L.; SANCHEZ-BLANCO, M.J.; TORRECILLAS, A. Peroxidase assay using 3,3',5,5'tetramethyl benzidine as H-donor for rapid diagnosis of the iron deficiency in citrus. **Scientia Horticulturae**, v.92, p.251–255, 1990.

- GARCÍA, A.L.; GALINDO, L. Chlorophyllase activity as biochemical indicator of Mn and Fe deficiencies in citrus. **Photosynthesis**, v.25, p.351–357, 1991.
- HERNANDES, A. **Influência do manganês no crescimento e na composição mineral de mudas de caramboleira**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.
- KARUR, N.P.; TAKKAR, P.N.; NAYYAR, V.K. Catalase, peroxidase, and chlorophyll relationship to yield and iron deficiency chlorosis in Cicer genotypes. **Journal Plant Nutrition**, v.7, p.1.213–1.220, 1984.
- LAL, B.N. Plant-injection methods for the diagnosis of mineral deficiencies in tobacco and soybean. **Annals of Botany**, v.IX, n.35, p.283–295, 1945.
- LAVON, R.; GOLDSMITH, E.E.; SALOMON, R.; FRANK, A. Effect of potassium, magnesium, and calcium deficiencies on carbohydrate pools and metabolism in citrus leaves. **Journal of American Society of Horticultural Sciences**, v.120, p.54–58, 1995.
- LAVON, R.; GOLDSCHMIDT, E.E. Enzymatic methods for detection of mineral element deficiencies in citrus leaves: a mini-review. **Journal Plant Nutrition**, v.22, p.139–150, 1999.
- LEIDI, E.O.; GOMEZ, M.; GUARDIA, M.D. de la. Evaluation of catalase and peroxidase activity as indicators of Fe and Mn nutrition for soybean. **Journal Plant Nutrition**, v.9, p.1.239–1.249, 1986.
- LEMAITRE, T.; GAUFICHON, L.; BOUTET-MERCEY, S.; CHRIST, A.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in arabidopsis thaliana Wassileskija Accession. **Plant and Cell Physiology**, v.49, p.1.056–1.065, 2008.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319p.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251p.
- MATSUNAGA, T.; ISHII, T. Borate cross-linked total thamnogalacturonan II ratio in cell walls for the biochemical diagnosis of boron deficiency in hydroponically grown pumpkin. **Analytical Sciences**, v.22, p.1.125–1.127, 2006.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.M. Avaliação de métodos com e sem digestão para extração de elementos em tecidos de plantas. **Ciência e Cultura**, v.36, p.1.953–1.958, 1984.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; MURAOKA, T.; CARMO, C.A.F.S.; MELO, W.J. Análise química de tecido vegetal. Parte 2, Cap. 2. In: SILVA, F.C. (Ed.) **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. (2.ed.), Brasília: Embrapa Informática Tecnológica, 2009. p.191–233. 627p.

- MOORE JR., P.A.; PATRICK JR., W.H. Effect of zinc deficiency on alcohol dehydrogenase activity and nutrient uptake in rice. **Agronomy Journal**, v.80, p.882–885, 1988.
- NENOVA, V.; STOYANOV, I. Physiological and biochemical changes in young maize plants under iron deficiency. 2. Catalase, peroxidase, and nitrate reductase activities in leaves. **Journal Plant Nutrition**, v. 18, p.2.081–2.091, 1995.
- PANDEY, N.; PATHAK, G.C.; SINGH, A.K.; SHARMA, C.P. Enzymic changes in response to zinc nutrition. **Journal Plant Physiology**, v.159, p.1.151–1.153, 2002.
- PRADO, R.M. **Nutrição de Plantas**. São Paulo: Editora UNESP, 2008, v.1. p.407.
- POLLE, A.; CHAKRABARTI, K.; CHAKRABARTI, S.; SEIFERT, F.; SCHRAMMEL, P.; RENNENBERG, H. Antioxidants and manganese deficiency in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.) trees. **Plant Physiology**, v.99, p.1.084–1.089, 1992.
- RANIERI, A.; CASTAGNA, A.; BALDAN, B.; SOLDATINI, G. F. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.25–35, 2001.
- RABE, E.; LOVATT, C.J. Stress physiology: *De novo* arginine biosynthesis in leaves of phosphorus deficient citrus and Poncirus species. **Plant Physiology**, v.76, p.747-752, 1984.
- RABE, E. Stress Physiology: The functional significance of the accumulation of nitrogen-containing compounds. **Journal of Horticultural Science**, v.65, p.231-243, 1990.
- RAO, N.R.; OWNBY, J.D. Development of an ELISA for estimation of the copper nutritional status of wheat and cotton. **Plant and Soil**, v.155/156, p.453-456, 1993.
- REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; GALLO, L.A.; MALAVOLTA, J.E.; MORAES, M.F.; LAVRES JUNIOR, J. Nitrate reductase and glutamine synthetase activity in coffee leaves during fruit development. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.315-324, 2009.
- ROACH, W.A. Plant Injection as a physiological method. **Annals of Botany**, v.3, p.155-226, 1939.
- RUIZ, J.M.; MORENO, D.A.; ROMERO, L. Pyruvate kinase activity as an indicator of the level of cations (K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+}) in leaves and fruits of the cucumber: the role of potassium fertilization. **Journal of agriculture and food chemistry**, v.47, p.845-849, 1999.
- RUIZ, J.M.; LÓPEZ-CANTARERO, I.; ROMERO, L. Relationship between calcium and pyruvate kinase. **Biologia Plantarum**, v.43, p.359-362, 2000.
- SASAKI, H.; HIROSE, T.; WATANABE, Y.; OHSUGI, R. Carbonic anhydrase activity and CO_2 -transfer resistance in Zn-deficient rice leaves. **Plant Physiology**, v.118, p.929–934, 1998.

- SHAKED, A.; BAR-AKIVA, A. Nitrate reductase activity as an indicator of molybdenum requirements of citrus plants. **Phytochemistry**, v.6, p.347-350, 1967.
- SNIR, I. Carbonic anhydrase activity as an indicator of zinc deficiency in pecan leaves. **Plant and Soil**, v.74, p.287-289, 1983.
- SRIVASTAVA, A.K.; SINGH, S.; HUCHCHE, A.D.; RAM, L. Yield based leaf and soil test interpretations for Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) in central India. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.32, p.585-599, 2000.
- SRIVASTVA, A.K.; SINGH, S. Biochemical markers and nutrient constraints diagnosis in citrus: a perspective. **Journal of Plant Nutrition**, v.29, p.827- 855, 2006.
- TOTHIL, I.E. Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector. **Computers and Electronics in Agriculture**, v.30, p.205-218, 2001.
- VALENZUELA, J.L.; ROMERO, L. Biochemical indicators and iron index for the appraisal of the mineral status in leaves of cucumber and tomato. **Journal of Plant Nutrition**, v.11, p.1.177-1.184, 1988.
- VELASCO-GARCÍA, M.N.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems. Review paper. **Biosystems Engineering**, v.84, p.1-12, 2003.
- ZEINAB, L.; SALAMA, A. Diagnosis of copper deficiency through growth, nutrient uptake and some biochemical reactions in *Pisum sativum* L. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.4, p.299-302, 2001.