

APLICABILIDADE DOS BIOTESTES ^{15}N E ^{32}P NA AVALIAÇÃO DO ESTADO DE NUTRIÇÃO DE PLANTAS DE *EUCALYPTUS GLOBULUS* LABILL CULTIVADAS EM VASO

A. Azevedo¹, M. Madeira² & J. Dighton³

RESUMO

A avaliação do estado nutritivo de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill cultivadas em vaso, foi efectuada pela técnica dos biotestes das raízes e pelas análises foliar e radical. O estudo decorreu durante 9 semanas, tendo os nutrientes N e P sido veiculados através de soluções nutritivas contendo as concentrações de 1, 2, 4, 8, 12, 20, 50 e 100 mg L⁻¹. Em cada solução apenas variou um nutriente, sendo a concentração no outro máxima (i.e. 100 mg L⁻¹).

As plantas de *E. globulus* responderam, significativamente, à variação da concentração em N e P nas soluções nutritivas do ensaio. Essa resposta foi, todavia, mais pronunciada em relação ao N do que em relação ao P. Qualquer das técnicas expressou significativamente a variação da concentração em N e P das soluções nutritivas do ensaio. Os biotestes ^{15}N e ^{32}P apresentaram correlações negativas com os teores em N e P das folhas e das raízes. Além disso, os biotestes apresentaram correlações mais estreitas com os parâmetros da biomassa do que nos casos da análise foliar e radical. Deste modo, os resultados sugerem que os biotestes ^{15}N e ^{32}P apresentam potencial para serem utilizados em estudos desta natureza.

ABSTRACT

Root bioassays, leaf analysis and root analysis were used to evaluate the nutritive status of plants of *Eucalyptus globulus* Labill grown in pots. The trials were nine weeks long. N and P were supplied through nutritive solutions containing 1, 2, 4, 8, 12, 20, 50 and 100 mg L⁻¹. A single nutrient was made to vary at each solution, while the other was kept at its maximum content (100 mg L⁻¹).

A significant positive response of the plants to the increasing content of the nutrient was observed for both nutrients, mainly for N. All evaluation techniques were able to detect the variation of content of both N or P in the nutritive solutions. ^{15}N and ^{32}P bioassays showed negative correlations with the N and P contents of leaves and roots. Besides, among the three evaluation techniques, data from bioassays presented the strongest correlation with biomass data. The results, therefore, suggest that ^{15}N and ^{32}P bioassays may be used in this type of studies.

INTRODUÇÃO

As técnicas de rotina normalmente utilizadas para a avaliação do estado nutritivo

¹Sector de Geociências, Escola Superior Agrária de Santarém, Quinta do Galinheiro, ap. 202, 2000 Santarém (a_azevedo@esa-santarem.pt)

²Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1399 Lisboa Codex

³Division of Pinelands Research, Department of Biology, Rutgers University, New Jersey 08102, USA

das florestas têm sido i) a *sintomatologia visual* e ii) os *resultados da análise foliar e, em menor escala, radical*. A sintomatologia visual, para além de não permitir o diagnóstico de *carências dissimuladas* (provocadas por factores meteorológicos e por fenómenos de antagonismo iónico) *ou mascaradas* (pelo mau estado sanitário das árvores) apresenta um interesse reduzido enquanto técnica a utilizar no planeamento da fertilização (Santos, 1991). A sua aplicabilidade quase se restringe a situações de carência (ou toxicidade) severas (Coutinho, 1989) e deve ser encarada, sobretudo, como complemento de outros métodos (Santos, 1991).

Em alternativa, recorre-se à análise de plantas e considera-se que o teor de um nutriente naquelas varia com a quantidade assimilável no solo (Smilde, 1985). Todavia, o teor em nutrientes varia, também, com a espécie, com a parte da planta analisada, com a taxa do crescimento vegetativo, com a interacção entre a nutrição e a água disponível e com a idade, obrigando, não só, a uma padronização rigorosa da amostragem (Santos, 1991), mas também a dispor de padrões que nos permitam identificar tanto as deficiências em nutrientes como os seus *níveis críticos* (*sensu* Epstein, 1972) (Mead, 1984; Adams & Allen, 1985; Sherriff *et al.*, 1986). Além disso, embora se lhe reconheça importância na compreensão de situações desfavoráveis (nem que seja pela comparação dos resultados aos de plantas que se considerem normais), não tem constituído, por si só, um indicador válido na detecção de deficiências de espécies florestais, quer em coníferas (McIntosh, 1984), quer em *E. globulus* (Lamb, 1977; Cromer *et al.*, 1981; Grove, 1990).

A técnica dos biotestes foi proposta como uma alternativa às técnicas mencionadas. Baseia-se na resposta fisiológica de raízes finas e integra a disponibilidade dos nutrientes no solo e a necessidade destes

pelas plantas (Harrison & Helliwell, 1979; Jones *et al.*, 1987; Jones *et al.*, 1991). Inicialmente desenvolvidos com o objectivo de se dispor de um método de rotina rápido e seguro, que permitisse identificar o estado nutritivo do solo antes do aparecimento de qualquer sintomatologia visual nas plantas, atribui-se-lhes, actualmente, grande potencialidade como ferramenta de investigação, mormente no que respeita à detecção e classificação de micorrizas mais favoráveis (Dighton & Coleman, 1992). Enquanto técnica de rotina, Harrison & Helliwell (1979), Jones *et al.* (1987) e Jones *et al.* (1991) consideram serem os biotestes mais vantajosos do que a análise foliar. Com efeito, citando esses autores, não só (1) a amostragem de raízes é mais fácil que a de folhas, mas também (2) o seu uso é mais válido já que, sendo por essa parte da planta que se dá a maior absorção de nutrientes, a resposta à fertilização pode ser detectada aproximadamente um mês depois da aplicação, enquanto que as variações no conteúdo foliar podem levar um ou dois anos. Acresce, ainda, referir que (3) enquanto os biotestes se baseiam numa resposta metabólica, a análise foliar mede unicamente um determinado valor de nutriente.

Não obstante basear-se num princípio há muito conhecido, a técnica dos biotestes é praticamente desconhecida em Portugal. Com o objectivo de se contribuir para o seu conhecimento e aplicabilidade discute-se, no presente trabalho, o potencial de aplicação dos biotestes ^{15}N e ^{32}P na avaliação do estado nutritivo de plantas de *E. globulus* Labill, cultivadas em vaso, em comparação com as análises foliar e radical.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio decorreu no Horto de Química Agrícola do Instituto Superior de Agronomia, entre 5 de Julho e 5 de Setembro de

1994. As plantas utilizadas encontravam-se enraizadas numa mistura de turfa e esfervite, e apresentavam 4 meses e meio após enraizamento e quatro semanas e meia de aclimação às condições ambientais. A transplantação efectuou-se de raiz nua, repicando-se para cada vaso, apenas, uma planta. Os vasos permitiam drenagem livre, tendo o substrato correspondido a areia quartzosa. A disposição dos vasos no Horto não obedeceu a um esquema aleatório, optando-se pela sua colocação em blocos. Os nutrientes foram veiculados por intermédio de soluções nutritivas, cuja composição foi adaptada de Hewitt & Smith (1975). Em cada solução fez-se variar a concentração de azoto (N) e fósforo (P) em oito níveis, tendo estes correspondido às concentrações, em triplicado, de 1, 2, 4, 8, 12, 20, 50 e 100 mg L⁻¹. Qualquer que fosse o nutriente em estudo, a concentração no outro foi sempre a máxima considerada (i.e. 100 mg L⁻¹). As soluções nutritivas foram adicionadas duas vezes por semana. Para evitar-se a acumulação de nutrientes utilizou-se um volume de solução que permitisse a reposição das condições iniciais. Nos restantes dias os vasos foram pesados e, se necessário, regados com água corrente. O crescimento (em altura) foi acompanhado por medições quinzenais, tendo o ensaio terminado 9 semanas após a repicagem.

As amostragens iniciaram-se com a colheita de raízes para os biotestes. Ainda com as plantas envasadas, tomaram-se amostras com 10 a 20 cm de comprimento e 1 a 3 mm de diâmetro, numa quantidade, em peso fresco, não inferior à correspondente a 2 g para o bioteste do N (Harrison & Helliwell, 1979) e 0,5 g para o bioteste do fósforo (Jones *et al.*, 1991). Para se evitarem potenciais danos causados por desidratação, as raízes foram mantidas, durante a amostragem e enquanto não processadas, entre folhas de papel humedecido.

A separação entre a parte radical e a parte aérea efectuou-se seccionando a planta ao nível do colo. Na parte aérea separaram-se os ramos das folhas, seleccionando-se para a análise foliar os terceiros ou os quartos pares de folhas completamente desenvolvidas (contadas a partir da base distal dos ramos), localizados no terço superior da planta e nas direcções correspondentes às quatro coordenadas polares (Jones & Dighton, 1993). As raízes foram separadas do substrato arenoso através da imersão do conjunto numa tina com água corrente, ao que se seguiu uma passagem rápida em fluxo contínuo de água. Para a análise radical, tomaram-se amostras idênticas às referidas para os biotestes: 10 a 20 cm de comprimento e 1 a 3 mm de diâmetro com um peso fresco não inferior a 2 g. Para que o valor do peso seco da raiz não fosse afectado pela toma das amostragens (biotestes e análise radical), calculou-se um factor de correcção que teve em consideração a relação entre o peso fresco da raiz e o seu peso após secagem.

Todo o material vegetal foi seco em estufa a 80 °C. Antes da moenda a 60 *mesh* pesaram-se as componentes folhas, ramos+caules e raízes. Os teores em N e P foram determinados por via húmida, seguindo-se o método de Kjeldahl no caso do N e a digestão em meio ácido (mistura nítrico-perclórica) no caso do P (Jones & Case, 1990). O doseamento do P efectuou-se por colorimetria seguindo-se, para o desenvolvimento da cor, o método de Murphy & Riley (Watanabe & Olsen, 1965).

A metodologia seguida nos biotestes ³²P e ¹⁵N está descrita, respectivamente, em Harrison & Helliwell (1979) e Jones *et al.* (1991). As raízes foram lavadas com água corrente (aleatoriamente no caso do P e separadas por tratamentos no caso do N), removendo-se todas as partículas terrosas que apresentavam. Seguiu-se um pré-trata-

mento de 30 minutos em soluções de concentração conhecida em cálcio (5×10^{-4} M $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no caso do N e 5×10^{-4} M $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no caso do P), concluído o qual se transferiram as raízes para as soluções contendo os isótopos mencionados. No caso do N, os tratamentos foram processados separadamente, imergindo-se as raízes durante 2 horas em soluções contendo 5×10^{-4} M de $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 1 mg $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ L^{-1} enriquecido em 20% com $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. O N não absorvido foi eliminado pela passagem das raízes por um fluxo de água corrente, durante 15 minutos. A quantificação do N ($\text{ng N mg raiz}^{-1} 2 \text{ h}^{-1}$) foi efectuada em espectrometria de massa no ITE - Merlewood Research Station, segundo a metodologia referida em Barrie & Lemley (1989), Harris & Paul (1989) e Schepers *et al.* (1989). No bioteste do P os procedimentos foram idênticos. A solução utilizada foi de 5×10^{-6} M KH_2PO_4 à qual se adicionou uma quantidade de 1-1,5 MBq de ^{32}P , na forma de ortofosfato primário. A imersão das raízes efectuou-se durante 15 minutos, concluídos os quais se procedeu à sua passagem por água corrente (5 minutos). Posteriormente, seleccionaram-se sub-amostras com 50-200 mg de peso fresco, que foram colocadas em frascos contendo 15 ml de água destilada. A actividade destas raízes, juntamente com a de dois padrões contendo uma alíquota de 0,5 ml de solução radioactiva inicial (antes da imersão das raízes), foi medida através da radiação de *Cerenkov*, num contador de cintilações BECKMAN LS 3801. Após a contagem, retiraram-se as raízes dos frascos e procedeu-se, após enxugo, à sua pesagem. Os frascos foram fechados e a sua radioactividade, novamente, medida. Pela diferença entre leituras, com e sem raízes, obteve-se o ^{32}P absorvido. Para que essa absorção se pudesse expressar em $\text{pg P mg de raiz}^{-1} 15 \text{ min}^{-1}$, os valores do ^{32}P (medidos em *contagens por minuto*) foram

corrigidos da radioactividade residual, do decaimento natural do isótopo e da eficiência do próprio aparelho na contagem.

No tratamento estatístico dos dados utilizaram-se as aplicações Statview IITM, Excel 5.0 e SuperANOVA, para sistema Macintosh. A resposta das plantas ao N e ao P foi observada em modo gráfico, considerando-se os níveis como variável independente e os parâmetros como variável dependente. Consoante a tendência, ajustou-se, para cada par de variáveis, uma função quadrática ou logarítmica ou, ainda, exponencial, no caso dos biotestes. A análise de variância da regressão efectuou-se em Statview IITM tendo-se procedido ao teste de Duncan (*Duncan New Multiple Range*), para a comparação entre as médias ($P < 0,05$). Para a comparação entre técnicas consideraram-se estas como variável independente e os parâmetros como variáveis dependentes. O princípio adoptado foi, todavia, o do melhor ajustamento da função.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Varição da concentração em azoto

Efeito na produção de biomassa

A influência da disponibilidade de N na produção de biomassa e no seu crescimento foi altamente significativa ($P < 0,001$) para todos os parâmetro em estudo. As correlações mais elevadas verificaram-se entre os valores relativos ao peso da totalidade da parte aérea e as concentrações de N na solução nutritiva ($r^2 = 99\%$). Essa correlação baixou, ligeiramente, quando se considerou a altura das plantas e o peso da sua biomassa radical (respectivamente 94% e 93%). O valor mais elevado em altura verificou-se na concentração correspondente a 100 mg de N L^{-1} de solução e foi de 78,5 cm (Figura 1). Foi, também, nessa concentração que se

verificaram os valores mais elevados no que respeita ao peso seco das raízes, ao peso seco da parte aérea e ao peso seco das folhas (respectivamente 9,96, 46,35 e 29,60 g). As plantas que «cresceram» em concentrações de N inferiores a 12 mg L⁻¹ apresentaram, durante o ensaio, cor amarelada. Essa coloração passou a avermelhada, tendo as plantas acabado por fenecer quando as concentrações em N foram inferiores a 4 mg L⁻¹. Verificou-se, também, que até à concentração correspondente a 20 mg N L⁻¹ as plantas apresentaram fraca ramificação. Na concentração igual ou superior a 50 mg N L⁻¹, as plantas não apresentaram sinais evidentes de carência em N. No entanto, constatou-se que, para esse nível em N, as plantas apresentaram metade do peso de biomassa verificada para a concentração máxima de N (i.e. 100 mg L⁻¹) (Figura 1). Estes resultados sugerem, por isso, que a sintomatologia visual não se mostrou uma técnica adequada para a avaliação do estado nutritivo das plantas. A influência do N no crescimento de plantas de *Eucalyptus sp.* tem sido documentada por muitos autores. Ericsson (1992), em ensaios com plantas de *E. globulus*, Donald & Schutz (1977) e Dighton

et al. (1993), em ensaios com plantas de *E. grandis*, e Grove (1988), em ensaios com plantas de *E. diversicolor*, evidenciaram não só a elevada resposta dessas plantas ao N, o que corrobora os resultados por nós encontrados, como sugerem ser o N, comparativamente ao P e ao K, o nutriente que mais condiciona o crescimento destas plantas.

Efeito no influxo de ¹⁵N e nos teores de N foliar e N radical

O teor de N das folhas e das raízes aumentou com o acréscimo da concentração de N na solução nutritiva (Figura 2). Esta variação foi altamente significativa (P<0,001) tanto no que respeita à análise foliar como radical. Também os teores de N obtidos por estas técnicas apresentaram correlações muito elevadas com a concentração de N na solução nutritiva (99% para a análise foliar e 95% para a análise radical). Os valores mais elevados do teor em N (foliar e radical) foram obtidos para o nível de N mais elevado (i.e. 100 mg L⁻¹, a que corresponderam valores de 31,8 mg g⁻¹ (nas folhas) e 17,8 mg g⁻¹ (nas raízes) (Figura 2). No que respeita ao influxo em N, verificou-

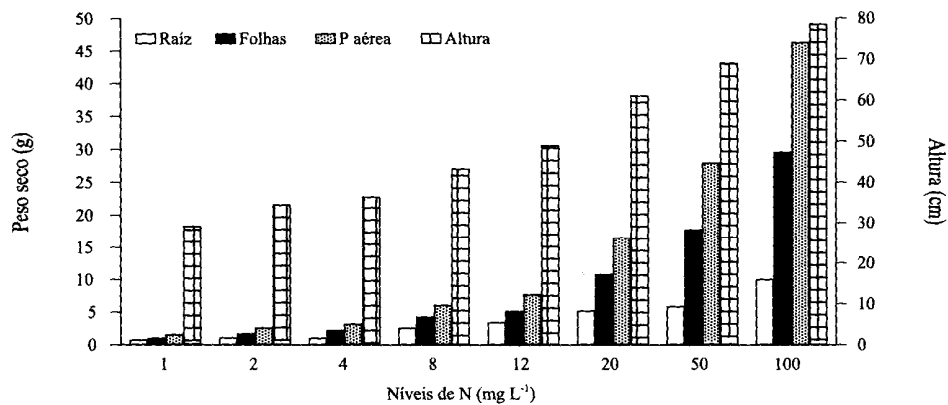


Figura 1. Efeito da variação da concentração de N na altura e na formação de biomassa.

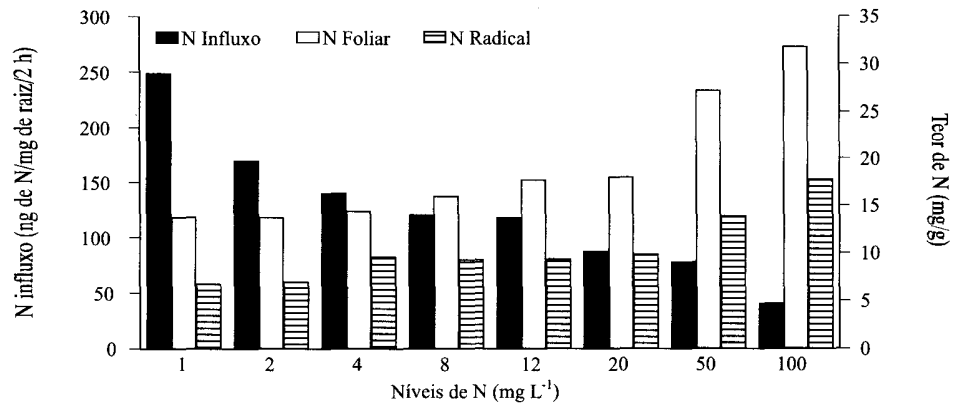


Figura 2. Variação do influxo de ^{15}N e dos teores de N nas folhas e nas raízes com a concentração de N da solução nutritiva.

se que, ao contrário das técnicas de rotina, este decresceu com o acréscimo do teor de N na solução nutritiva. O coeficiente de correlação obtido (82,3%), embora menos elevado do que os mencionados para as análises foliar e radical, foi, ainda assim, muito significativo ($P < 0,01$).

Estes resultados corroboram os obtidos por Jones *et al.* (1991) e Dighton *et al.* (1993) em plantas de *P. sylvestris*, *P. sitchensis* e *E. grandis*. O influxo de N mais elevado foi determinado para as raízes das plantas que cresceram em solução nutritiva com a concentração de 1 mg de N L⁻¹ diminuindo depois, sucessivamente, até à concentração de 100 mg de N L⁻¹ (Figura 2). A partir do nível 1 mg de N L⁻¹ os influxos de ^{15}N para as raízes deixaram, porém, de ser significativamente diferentes ($P > 0,05$). Estes resultados assemelham-se, de um modo geral, aos encontrados por outros autores. Em ensaios conduzidos em laboratório com plântulas de *E. globulus*, Ericsson (1992) obteve, para condições ótimas de crescimento, teores de N nas folhas da ordem de 38 mg g⁻¹. Sheriff & Nambiar (1991) e Dighton *et al.* (1993), por seu turno, em estudos em vaso com plantas de *E. globulus*

e *E. grandis*, obtiveram, quando o crescimento não era limitado em N, teores, respectivamente, de 20-25 mg g⁻¹ e 21 mg g⁻¹. Os resultados por nós obtidos (Figuras 1 e 2) indicam que as plantas apresentaram teores em N foliar mais baixos que o considerado por Ericsson (1992). Todavia, não só os acréscimos em biomassa aérea foram significativos para todos os níveis de N da solução ($P < 0,05$), como nos parece evidente que as plantas não esgotaram, nas condições do ensaio, o seu potencial produtivo. Nestas condições parece-nos que os resultados obtidos podem corroborar os obtidos por Ericsson (1992) e considerar como *valor crítico* (*sensu* Epstein, 1972) um teor em N semelhante ao por ele considerado. Relativamente aos valores encontrados por Sheriff & Nambiar (1991) e Dighton *et al.* (1993), parece-nos serem bastante baixos.

Ocorreu uma elevada correlação linear entre os teores de N nas folhas e nas raízes. Esses valores ajustam-se significativamente ao modelo linear $N(\text{radical}) = 0,5313 \times \%N(\text{foliar}) + 0,0343$ ($P < 0,001$, $r^2 = 94,31\%$). A correlação linear é, todavia, substancialmente menor quando se consideram os resultados obtidos pelo bioteste e os obtidos

pelas técnicas de rotina ($r=-0,7841$, quando as variáveis são o influxo em ^{15}N e teor em N da análise foliar e $r=-0,8371$, quando as variáveis são o influxo em ^{15}N e teor em N de análise radical). Porém, considerando modelos não lineares verificamos que as correlações aumentam, ajustando-se os valores significativamente ($P<0,01$) às seguintes funções: $N(\text{influxo})=291,28 \times \%N_{(\text{foliar})}^{-1,5982}$ ($P<0,01$; $r^2=84,24\%$) e $N(\text{influxo})=111,62 \times \%N_{(\text{radical})}^{-1,6235}$ ($P<0,01$; $r^2=88,51\%$).

Correlação entre as técnicas em estudo e os parâmetros da biomassa

Quando se expressam o crescimento ou os parâmetros da biomassa em função das técnicas em análise (Quadro 1) verifica-se que qualquer das técnicas apresentou correlações bastante estreitas com essas variáveis. Essa correlação foi altamente significativa ($P<0,001$) entre a altura ou a biomassa da raiz, bem como a da parte aérea e das folhas e os valores do bioteste. A correlação entre o peso das folhas e da parte aérea e os valores do bioteste e os do teor em N foliar e radical é, em qualquer dos casos, altamente significativa ($P<0,001$) e da mesma ordem de grandeza. Constata-se, assim, que embora pior correlacionados com a variação dos níveis de N na solução nutritiva, os biotestes, quando comparados com as técnicas usuais, apresentam, relativamente aos parâmetros considerados, igual ou mesmo maior *significado biológico*, especialmente quando se considera o crescimento em altura e o peso das raízes das plantas. Curiosamente, verifica-se que o maior valor de r^2 encontrado para o bioteste (98,6%), quando se exprimi o peso correspondente à biomassa radical em função do influxo em ^{15}N , coincidiu com o pior dos ajustamentos entre os parâmetros considerados e as técnicas usuais (respectivamente, $r^2=89,9\%$ para a

análise foliar e $r^2=87,6\%$ para a análise radical).

Variação da concentração em fósforo

Efeito na produção de biomassa

O efeito do P no crescimento foi menos pronunciado que o do N (Figuras 1 e 3). Todavia, os parâmetros altura, peso de raízes, peso da parte aérea e peso de folhas apresentaram respostas significativas ($P<0,05$) à variação da concentração em P na solução nutritiva. Estes resultados corroboram os que foram obtidos por Dighton *et al.* (1993) em plantas de *E. grandis*. O fraco ajustamento entre as variáveis facilmente se compreende pela observação da Figura 3. De um modo geral, a resposta das plantas ao P estabilizou logo que a concentração deste foi igual ou superior a 4 mg L^{-1} ; deixaram de se verificar diferenças significativas ($P>0,05$) entre a altura das plantas que cresceram em contacto com o teor de P na solução nutritiva superior a mais de 1 mg L^{-1} . Todavia, o valor em altura mais elevado, 82,3 cm, verificou-se na concentração correspondente a 12 mg P L^{-1} . Idênticos resultados foram obtidos no que toca ao peso da parte aérea e ao peso de raízes. Embora os valores mais elevados (44,02 g para a parte aérea e 9,39 g para o peso de raízes) se tenham observado quando a concentração de P foi de 8 mg L^{-1} , deixaram de se verificar acréscimos significativos em biomassa logo após a concentração em P de 4 mg L^{-1} . Estes dados corroboram as impressões colhidas na sintomatologia visual, onde se observou que as plantas apenas apresentavam sinais de carência (menor ramificação e desenvolvimento) para níveis de P inferiores a 4 mg L^{-1} . Estes resultados sugerem que as plantas estudadas apenas necessitam de uma quantidade relativamente pequena em P no substrato e que o efeito

QUADRO 1. Equações de regressão entre os valores da altura e dos parâmetros da biomassa e os resultados obtidos nos biotestes e nas análises foliar e radical. As estatísticas calcularam-se a partir dos valores médios dos parâmetros referidos para cada concentração (n=8) de N

Parâmetros (y)	Técnicas (x)	equação	r ²	P	S _{yx}
Altura (cm)	Bioteste	$0,0015x^2-0,6792x+107,2$	0,962	<0,001	4,030
	A. foliar	$-15,643x^2+95,004x-68,163$	0,937	=0,001	5,235
	A. radical	$-22,974x^2+100,57x-27,43$	0,868	0,006	7,582
Peso das raízes (g)	Bioteste	$0,0004x^2-0,1457x+15,213$	0,986	<0,001	0,440
	A. foliar	$-0,656x^2+7,377x-7,694$	0,899	0,003	1,185
	A. radical	$1,2092x^2+5,0126x-2,9865$	0,876	0,054	1,310
Peso da p. aérea (g)	Bioteste	$0,002x^2-0,7872x+73,948$	0,969	<0,001	3,270
	A. foliar	$3,881x^2+5,566x-12,4$	0,966	<0,001	3,453
	A. radical	$0,205x^2+2,184x-1,26$	0,969	<0,001	3,279
Peso das folhas (g)	Bioteste	$0,0013x^2-0,4958x+46,937$	0,973	<0,001	3,270
	A. foliar	$2,339x^2+4,031x-8,13$	0,963	<0,001	3,286
	A. radical	$0,127x^2+1,82x-0,663$	0,974	<0,001	1,922

Nota: S_{yx} - erro padrão da estimativa

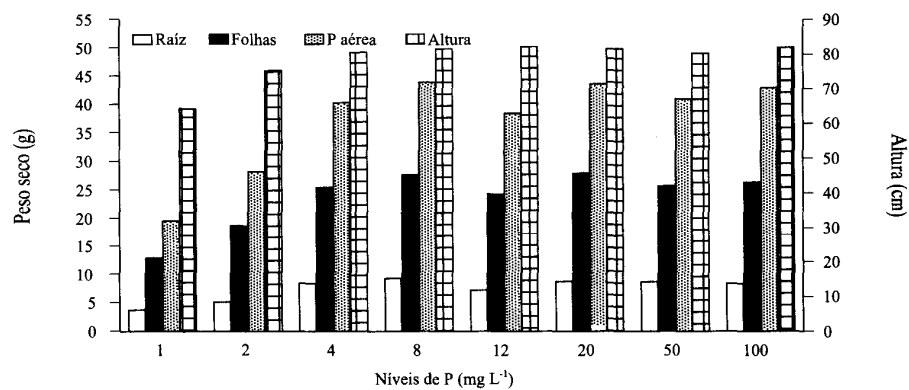


Figura 3. Efeito da variação da concentração de P na solução nutritiva no crescimento (em altura) e na formação de biomassa (raízes, folhas e parte aérea).

deste nutriente no crescimento é muito menor do que o verificado para o N. Idênticas constatações foram encontrados por Brito (1968), Ericsson *et al.* (1992), em plantas de *E. globulus*, por Dighton *et al.* (1993), em plantas de *E. grandis*, e por Crane & Raison (1980) em plantas de *E. delegatensis*.

Efeito no influxo de ³²P e nos teores de P foliar e radical

O teor de P nas folhas e raízes aumentou com o acréscimo de P na solução nutritiva (Figura 4). Verificaram-se coeficientes de correlação muito elevados (da ordem dos 95%) e altamente significativos (P<0,001) entre os teores em P obtidos pelas análises foliar e radical e os respectivos níveis das soluções nutritivas. Pela Figura 4 verifica-se que a percentagem em P mais elevada (3,6 mg g⁻¹ nas folhas e 9,1 mg g⁻¹ nas raízes) correspondeu à concentração máxima em P na solução nutritiva (i.e. 100 mg L⁻¹).

O influxo de ³²P decresceu com o aumento da concentração de P na solução nutritiva. O coeficiente de correlação entre o influxo de ³²P para as raízes e a concen-

tração de P na solução nutritiva, embora menos elevado (r²=54%) que o verificado para os teores foliares e radicais de P, foi, ainda assim, significativo (P<0,05). Os resultados do bioteste indicam que o valor mais elevado de influxo de ³²P (369 pg de P mg de raiz⁻¹ 15 min⁻¹) ocorreu na concentração em P correspondente a 1 mg L⁻¹. Embora se possa considerar que o influxo em ³²P tenha estabilizado logo que a concentração em P na solução foi superior a 8 mg P L⁻¹, verifica-se que apenas se registaram diferenças significativas (P<0,05) entre a concentração de 1 mg P L⁻¹ e as restantes. Deste modo, contrariamente às técnicas de rotina, em que se observaram acréscimos significativos (P<0,05) do teor em P para concentrações superiores a 8 mg L⁻¹, os biotestes não apresentaram, para essas concentrações, diferenças significativas de influxo de ³²P.

Se considerarmos o que anteriormente foi referido sobre a(s) concentrações de P acima da(s) qual(ais) não correspondiam, de um modo geral, acréscimos significativos em «crescimento» (Figura 3), verifica-se que o teor óptimo ou não limitante de P das folhas deverá corresponder a um teor próximo

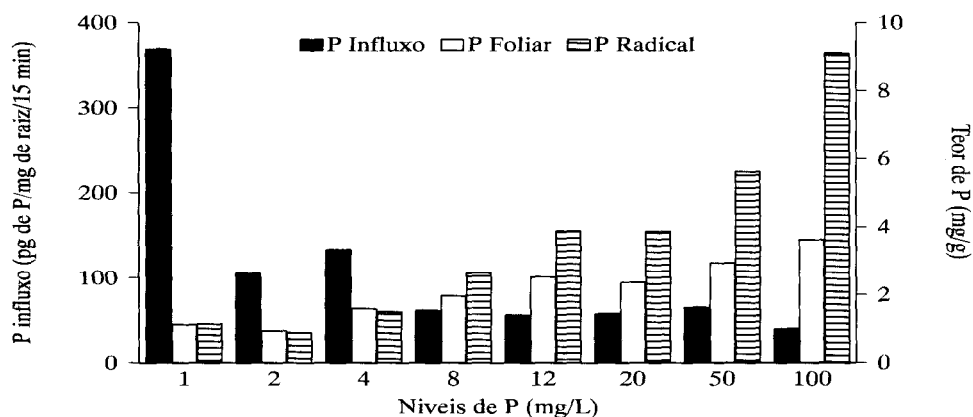


Figura 4. Variação do influxo de ³²P e dos teores de P nas folhas e nas raízes com a concentração de P na solução nutritiva.

de 1,6 mg g⁻¹. Ericsson (1992), utilizando plântulas de *E. globulus* cultivadas em ambiente controlado, sugere, como ótimo, um teor de P nas folhas de 4 mg g⁻¹. Idêntico valor é proposto por Dighton *et al.* (1993), para plantas de *E. grandis*.

Ocorreu uma elevada correlação linear entre os teores de P das folhas e das raízes. Esses valores ajustam-se significativamente ($P < 0,001$) ao seguinte modelo: $\%P(\text{radical}) = 2,9112 \times \%P(\text{foliar})$ ($P < 0,001$; $r^2 = 92,71\%$). O ajustamento entre variáveis é substancialmente menor quando se consideram os resultados obtidos pelo bioteste e os obtidos pelas análises foliar e radical. Os coeficientes de correlação linear foram, respectivamente, de $r = -0,6258$, quando as variáveis são o influxo em ³²P e teor em P da análise foliar e $r = -0,5403$, quando as variáveis são o influxo em ³²P e teor em P de análise radical. Se considerarmos, no entanto, modelos não lineares verificamos que as correlações aumentam, ajustando-se significativamente ($P < 0,05$) os valores às funções: $P(\text{bioteste}) = 12,49 \times \%P(\text{foliar})^{-1,1889}$ ($P < 0,05$; $r^2 = 61,68\%$) e $P(\text{bioteste}) = 35,16 \times \%P(\text{radion})^{-0,6916}$ ($P < 0,05$; $r^2 = 62,73\%$).

Não obstante o fraco ajustamento entre as variáveis, estas correlações estão de acordo com o princípio dos biotestes (Harrison & Helliwell, 1979). Saliente-se, também, que as espécies de *Eucalyptus sp.* são consideradas como muito pouco exigentes em P (Brito, 1968; Dighton *et al.*, 1993), o que está associado à elevada eficiência de utilização do P devido à retranslocação (Crane & Raison, 1980; Ericsson *et al.*, 1992). A correlação entre o influxo de ³²P e o teor de P foliar foi significativa ($P < 0,05$). Por outro lado, houve também resposta significativa ($P < 0,05$) entre o valor do bioteste e a concentração de P na solução nutritiva. A resposta à variação de P nesta solução foi, todavia, muito mais significativa ($P < 0,001$) no que respeita ao teor de P nas folhas e raízes.

Estes resultados sugerem que o bioteste, embora estando correlacionado com a análise foliar, é menos sensível do que esta. Por outro lado, Dighton *et al.* (1993) não encontraram correlação entre o influxo de ³²P e o teor de P foliar em plantas de *E. grandis*. Além disso, constatando que a resposta do influxo de ³²P à variação deste elemento na solução nutritiva foi mais significativa do que a respeitante ao teor de P foliar, concluíram que os resultados do bioteste seriam mais sensíveis do que os respeitantes à análise foliar para a avaliação de limitações nutritivas de P. Estas conclusões não estão, todavia, em total contradição com os nossos resultados. Com efeito, a grande resposta dos biotestes apenas ocorre para a concentração de P, na solução nutritiva, menor ou igual a 4 mg L⁻¹, concentração para a qual a resposta da análise foliar ou radical não foi aparentemente muito sensível (Figura 4). Assim, sugere-se que as conclusões apresentadas por Dighton *et al.* (1993) poderão ser aplicadas às plantas alvo de estudo quando estas crescem em situação de fraca disponibilidade de P.

Correlação entre as técnicas em estudo e os parâmetros da biomassa

O ajustamento entre as variáveis altura ou os diversos parâmetros da biomassa e os resultados obtidos pelas técnicas em análise, apenas apresentou valores significativos ($P < 0,01$) no que respeita ao bioteste (Quadro 2). Quanto às técnicas de rotina constata-se haver, sistematicamente, melhor correlação entre variáveis quando se consideram os resultados obtidos pela análise foliar. Os modelos obtidos são, todavia, não significativos. Deste modo, embora pior correlacionados com a variação da concentração em P nas soluções nutritivas, o bioteste é a técnica que apresenta mais significado biológico. Estes resultados expli-

QUADRO 2. Equações de regressão entre os valores da altura e dos parâmetros da biomassa e os resultados obtidos nos biotestes e nas análises foliar e radical. As estatísticas calcularam-se a partir dos valores médios dos parâmetros referidos para cada concentração (n=8) de P

Parâmetros (y)	Técnicas (x)	equação	r ²	P	s _{yx}
Altura (cm)	Bioteste	$85,31e^{-0,0008x}$	0,917	<0,001	2,051
	A. foliar	$-287,12x^2+174,54x-56,44$	0,574	0,119	4,828
	A. radical	$-33,76x^2+45,261x+68,982$	0,456	0,218	5,455
Peso das raízes (g)	Bioteste	$9,531e^{-0,0024x}$	0,700	0,004	1,323
	A. foliar	$-128,37x^2+71,629x-1,008$	0,666	0,064	4,996
	A. radical	$-13,026x^2+16,311x+4,222$	0,485	0,190	1,686
Peso da parte aérea (g)	Bioteste	$47,118e^{-0,0024x}$	0,808	<0,001	4,771
	A. foliar	$-511,51x^2+296,69x+0,808$	0,693	0,052	5,750
	A. radical	$-54,899x^2+71,447x+22,347$	0,530	0,151	7,114
Peso das folhas (g)	Bioteste	$29,528e^{-0,0022x}$	0,824	<0,001	2,736
	A. foliar	$-322,46x^2+182,27x+1,698$	0,664	0,065	3,574
	A. radical	$-34,303x^2+43,235x+14,837$	0,504	0,173	4,341

Nota: S_{yx} - erro padrão da estimativa.

cam-se pelo facto do influxo de ³²P estabilizar para concentrações em P na solução nutritiva da mesma ordem de grandeza das verificadas quando as plantas estabilizaram o seu «crescimento». Ao invés do bioteste, os teores em P nas folhas e nas raízes deram respostas significativas (P<0,05) quando já não se verificava «crescimento», o que em termos práticos as torna *estimadores* pouco sensíveis do comportamento da planta. À semelhança do constatado para o N, o valor em r² mais elevado (91,7%), respeitante à regressão não linear da altura em função do resultado dos biotestes, coincidiu com os menores valores dos ajustamentos para as técnicas usuais (respectivamente de 57,4% para a análise foliar e 45,6% para a análise radical).

CONCLUSÕES

As plantas de *E. globulus* estudadas responderam, significativamente, à variação da concentração em N e P nas soluções nutritivas do ensaio. A resposta foi mais pronunciada no caso do N do que no do P.

A influência do P no crescimento de *E. globulus* restringiu-se a concentrações baixas desse elemento na solução nutritiva.

Os resultados das análises foliar e radical, bem como dos biotestes ¹⁵N e ³²P, expressaram significativamente a variação da concentração em N e P das soluções nutritivas do ensaio.

Os biotestes ¹⁵N e ³²P apresentaram correlações negativas com os teores em N e P das folhas e das raízes, apresentando, além

disso, correlações mais estreitas com os parâmetros da biomassa do que nos casos da análise foliar e radical.

Os resultados sugerem que os biotestes ^{15}N e ^{32}P apresentam potencial para serem utilizados em estudos de nutrição controlada. Todavia, mais estudos são necessários para permitir uma melhor compreensão da aplicabilidade dos biotestes, mormente no que respeita à quantificação das necessidades nutritivas das plantas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Junta Nacional de Investigação Tecnológica (JNIT), no âmbito do projecto STRD/AGR/0052. Agradecemos ao Prof. Quelhas dos Santos, do Instituto Superior de Agronomia, a cedência das instalações do Horto de Química Agrícola, ao Prof. Carlos Martins, da Escola Superior de Medicina Veterinária de Lisboa, a utilização do Contador de Cintilações em Meio Líquido, à Celbi S.A a cedência das plantas e ao ITE-Merlewood Research Station a rapidez com que disponibilizou os resultados do bioteste do ^{15}N .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. B. & ALLEN, H. L. (1985). Nutrient properties in foliage of semi-mature loblolly pine. *Plant Soil*, **86**: 27-34.
- BARRIE, A. & LEMLEY, M. (1989). Automated $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ analysis of biological materials. *Int. Lab.*, **19**: 82-91.
- BRITO, F. M. V. (1968). Alguns resultados de ensaios de fertilização do eucalipto. *Rev. Agron.*, **LI**: 155-162.
- COUTINHO, J. L. (1989). *A Análise de Terra. Limitações, Correlação, Calibração e Interpretação dos Resultados*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
- CRANE, W. J. B. & RAISON, R. J. (1980). Removal of phosphorus in logs of harvesting *Eucalyptus delegatensis* and *Pinus radiata* forest on short and log rotations. *Aust. For.*, **43**: 253-260.
- CROMER, R., CAMERON, D., CAMERON, J. N., FLINN, D. W., NEILSEN, W. A., RAUPACH, M., SNOWDON, P. & WARING, H. D. (1981). Response of eucalypt species to fertilizer applied soon after planting at several sites. *Aust. For.*, **44**: 3-13.
- DIGHTON, J. & COLEMAN, D. C. (1992). Phosphorus relations of roots and mycorrhizas of *Rhododendron maximum* L. in the southern Appalachians, North Carolina. *Mycorrhiza*, **1**: 175-184.
- DIGHTON, J., JONES, H. E. & POSKITT, J. M. (1993). The use of nutrient bioassays to assess the response of *Eucalyptus grandis* to fertilizer application. 1. Interactions between nitrogen, phosphorus, and potassium in seedling nutrition. *Can. J. For. Res.*, **23**: 1-6.
- DONALD, D. G. M. & SCHUTZ, C. J. (1977). The response of eucalyptus to fertilizer application at planting: The Louw's Creek trial. *S. Afr. Bosbou-tydskrif*, **101**: 23-28.
- EPSTEIN, E. (1972). *Mineral Nutrition of Plants. Principles and Perspectives*. New York: Wiley, New York, U.S.A.
- ERICSSON, T. (1992). Mineral nutrient requirement of *Eucalyptus globulus* seedlings. In: J. S. Pereira & H. Pereira (eds.), *Eucalyptus for Biomass Production - The State of the Art*. (in press) CEC, Brussels, Belgium.
- ERICSSON, T., RYTTER, L. & LINDER, S. (1992). Nutritional dynamics and requirements of short rotation forests. In: C. P. Mitchell & J. B. Ford-Robertson (eds.), *Ecophysiology of Short Rotation Forest Crops*. pp 35-65. Elsevier Applied Science, New York, U.S.A.
- GROVE, T. S. (1988). Growth response of tree and understorey to applied nitrogen and phosphorus in Karri (*Eucalyptus diversicolor*) forestry. *For. Ecol. Manage.*, **23**: 87-103.
- GROVE, T. S. (1990). Twig and foliar nutrient concentrations in relation to nitrogen and phosphorus supply in a eucalypt (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) and a understorey legume (*Bossiaea laidlawiana* Tovey & Morris). *Plant Soil*, **126**: 265-275.
- HARRIS, D. & PAUL, E. A. (1989). Automated analysis of ^{15}N and ^{14}C in biological samples. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **20**: 949-959.
- HARRISON, A. F. & HELLIWELL, D. R. (1979). A bioassay for comparing phosphorus availability in soils. *J. Appl. Ecol.*, **16**: 491-505.
- HEWITT, E. J. & SMITH, T. A. (1975). *Plant Mineral Nutrition*. The English Universities Press, London, UK.
- JONES, J. B. & CASE, V. W. (1990). Sampling, handling and analysing tissue samples. pp 389-427. In: R. L. Westerman (ed.), *Soil Testing and*

Plant Analysis. 3th Edition, SSSA, Madison, USA.

JONES, H. & DIGHTON, J. (1993). The use of nutrients bioassays to assess the response of *Eucalyptus grandis* to fertilizer application. 2. A field experiment. *Can. J. For. Res.*, **23**: 7-13.

JONES, H. E., HARRISON, A. F. & DIGHTON, J. (1987). A ⁸⁶Rb bioassay to determine the potassium status of trees. *New Phytol.*, **107**: 695-708.

JONES, H. E., QUARMBY, C. & HARRISON, J. (1991). A root bioassay test for nitrogen deficiency in forest trees. *For. Ecol. Manage.*, **42**: 267-282.

LAMB, D. (1977). Relationships between growth and foliar nutrient concentrations in *Eucalyptus deglupta*. *Plant Soil*, **47**: 495-508.

MCINTOSH, R. (1984). *Fertilizer Experiments in Established Conifer Stands*. Forestry Commission Forest Record n° 127.

MEAD, D. J. (1984). Diagnosis of nutrient deficiencies in plantations. In: G. D. Bowen & E. K. S. Nambiar (eds.), *Nutrition of Plantation Forests*. Academic Press, London, UK.

SANTOS, J. Q. (1991). *Fertilização. Fundamentos da Utilização dos Adubos e Correctivos*. Publ. Europa América, Lisboa, Portugal.

SCHEPERS, J. S., FRANCIS, D. D. & THOMPSON, M. T. (1989). Simultaneous determination of total carbon, total nitrogen and ¹⁵N on soil and plant material. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, **20**: 949-959.

SHERRIFF, D. W. & NAMBIAR, E. K. S. (1991). Nitrogen nutrition, growth and gas exchange in *Eucalyptus globulus* Labill. seedlings. *Aust. J. Plant Physiol.*, **18**: 37-52.

SHERRIFF, D. W., NAMBIAR, E. K. S. & FIFE, D. N. (1986). Relationships between nutrient stress, carbon assimilation and water use efficiency in *Pinus radiata* D. Don needles, pp 73-88. In: R. J. Luxmoore, J. J. Landsberg, & J. B. Kauffman (eds.), *Tree Physiology*. Heron Publishing, Victoria, B. C. Canada.

SMILDE, K. W. (1985). *Establishment of Fertilizer Recommendations on the Basis of Soil Tests*. Rapport 17-85. Inst. Soil Fertility, Haren, Netherlands.

WATANABE, F. S. & OLSEN, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **29**: 677-678.