

FÁBIO ZANELLA

CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE DO SISTEMA
GS/GOGAT EM ALFAFA NODULADA SOB TRATAMENTO COM FÓSFORO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

FÁBIO ZANELLA

CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E ATIVIDADE DO SISTEMA
GS/GOGAT EM ALFAFA NODULADA SOB TRATAMENTO COM FÓSFORO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 7 de março de 2001.

Dr. Carlos A. Martinez y Huaman
(Conselheiro)

Prof. Paulo Roberto Mosquim
(Conselheiro)

Prof. Raimundo Santos Barros

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, pela orientação.

Aos conselheiros Carlos Alberto Martinez y Huaman e Paulo Roberto Mosquim, pelas críticas e sugestões.

Aos demais professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPÍTULO 1.....	5
PRODUÇÃO DE MASSA SECA E EXPANSÃO DA ÁREA FOLIAR EM ALFAFA NODULADA EM RESPOSTA AO FÓSFORO.....	5
RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	8
2.2. Determinação da área foliar e massa seca.....	10
2.3. Delineamento experimental e análise estatística.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
3.1. Área foliar e massa seca.....	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15

	Página
CAPÍTULO 2.....	18
EFEITO DO FÓSFORO SOBRE AS TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA <i>a</i> E TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E AMIDO EM ALFAFA NODULADA.....	18
RESUMO.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	21
2.2. Determinação das variáveis de trocas gasosas.....	23
2.3. Determinação das variáveis de fluorescência rápida.....	24
2.4. Determinação dos teores de clorofilas e carotenóides.....	24
2.5. Determinação dos teores de amido.....	24
2.6. Determinação dos teores de fosfato inorgânico (Pi).....	27
2.7. Delineamento experimental e análise estatística.....	27
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1. Teores de fosfato inorgânico	26
3.2. Teores de clorofilas e carotenóides.....	28
3.3. Variáveis de fluorescência rápida.....	30
3.4. Variáveis de trocas gasosas.....	34
3.5. Teores de amido.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
CAPÍTULO 3.....	47
ATIVIDADE DO SISTEMA GS/GOGAT EM ALFAFA NODULADA EM RESPOSTA AO FÓSFORO.....	47
RESUMO.....	47
1.INTRODUÇÃO.....	49
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	51
2.2. Preparo do extrato enzimático.....	53
2.3. Determinação da atividade da GS.....	54
2.4. Determinação da atividade da NADH-GOGAT.....	54
2.5. Delineamento experimental e análise estatística.....	55

	Página
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
3.1. Atividade do sistema GS/GOGAT.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CONCLUSÕES GERAIS	63

RESUMO

ZANELLA, Fábio, M.S. Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Crescimento, trocas gasosas e atividade do sistema GS/GOGAT em alfafa nodulada sob tratamento com fósforo.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Conselheiros: Carlos Alberto Martinez y Huaman e Paulo Roberto Mosquim.

Os teores de fosfato inorgânico em folhas e raízes aumentaram de forma linear em plantas de alfafa cv. Flórida 77 no estádio R8, correspondente a plantas com um a três nós com vagens verdes, quando em cultivo em solução nutritiva contendo fósforo nas concentrações 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³. A menor concentração o fósforo restringiu a expansão de área foliar e a massa seca da parte aérea e dos nódulos e resultou em uma relação entre massa seca das raízes e da parte aérea maior. O nível de suficiência de fósforo para as plantas, considerando-se os parâmetros de crescimento, foi de 0,20 mol m⁻³. Os teores de amido em folhas e raízes não foram significativamente alterados pela baixa disponibilidade de fósforo (0,02 mol P m⁻³). A essa concentração, a taxa de assimilação líquida do CO₂ foi menor do que nas plantas dos demais tratamentos; comportamento similar teve a eficiência fotoquímica do fotossistema II, avaliada pela razão F_v/F_m e F_v/F_0 . Conseqüentemente, o efeito do fósforo na redução da atividade fotossintética pareceu mais relacionado com a etapa fotoquímica da fotossíntese. Para as

variáveis de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, em plantas no estágio R8, a suficiência de fósforo foi atingida com $0,10 \text{ mol P m}^{-3}$. As plantas que cresceram sob $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ apresentaram um decréscimo nas atividades totais de sintetase da glutamina (GS) e de sintase do glutamato-dependente de NADH-GOGAT (NADH-GOGAT), tanto nas folhas como nos nódulos. Os resultados indicam que a GS respondeu mais do que a NADH-GOGAT aos aumentos nas concentrações de fósforo, mostrando-se a atividade das duas enzimas maior nos nódulos. A atividade do sistema GS/GOGAT em plantas de alfafa no estágio R8 foi mais pronunciada sob a concentração de $0,20 \text{ mol P m}^{-3}$, embora a suficiência de fósforo tenha sido alcançada na concentração de $0,10 \text{ mol P m}^{-3}$.

ABSTRACT

ZANELLA, F. Federal University of Viçosa, M.S., March of 2001. **Growth, gaseous exchanges and activity of the GS/GOGAT system in alfalfa noded plants under treatments with phosphorus.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Committee Members: Carlos Alberto Martinez y Huaman and Paulo Roberto Mosquim.

The inorganic phosphate contents in leaves and roots increased in a lineal way in plants of alfalfa cv. Florida 77 in the R8 stadium, corresponding to the plants from one to three green beans when in cultivation in nutritious solution with phosphorus at the levels of 0,02, 0,10, 0,20 and 1,00 mol m⁻³. The smallest phosphorus level restricted the leaf area expansion as well as dry mass of the aerial part and nodules wich resulted in a greater ratio beetwen dry mass of the roots and aerial part. It was reached a phosphorus sufficiency at the level of 0,20 mol m⁻³ for the plants being considered the growth parameters. The contents of starch in leaves and roots were not significantly altered by the lowest phosphorus (0,02 mol m⁻³), to that level the rate of liquid assimilation of the CO₂ was smaller than in the plants of the other treatments, similar behavior was observes about the fotosystem II photochemical efficiency, evaluated by the F_v/F_m and F_v/F_0 ratio. Thus, the low phosphorus effect in the reduction of the photosynthesis seemed more related with the fotochemical way of the photosynthesis. The phosphorus sufficiency for the gaseous exchanges and

chlorophyll *a* fluoresce was reached with 0,10 mol m⁻³. The GS/GOGAT activities under 0,02 mol m⁻³ was smaller in the leaves as in the nodules. The results indicate that GS answered more than NADH-GOGAT to the increases in phosphorus levels, being shown the two enzymes activity in the nodules. The activity of GS/GOGAT system in alfalfa plants in the R8 stadium was greater under 0,20 mol m⁻³, although the phosphorus sufficiency has been reached in the concentration of 0,10 mol m⁻³.

INTRODUÇÃO GERAL

A alfafa (*Medicago sativa* L.) é uma leguminosa conhecida como a rainha das forrageiras em razão de suas características nutricionais, qualidade excepcional de palatabilidade para os animais e, de sua produtividade. Ela pode ser utilizada na forma de feno, silagem, verde picado ou até sob pastejo rotativo. O elevado potencial de fixação do N_2 atmosférico proveniente da associação simbiótica *Medicago sativa-Sinorhizobium meliloti* praticamente isenta a planta de alfafa da necessidade de aplicação de nitrogênio no solo (VANCE e HEICHEL, 1991). As estimativas do N_2 fixado variam de 50 a 463 kg de N $ha^{-1} ano^{-1}$, com média de 200 kg de N $ha^{-1} ano^{-1}$. Contudo, a eficiência do processo de fixação biológica do N_2 atmosférico está diretamente relacionada com a disponibilidade de fósforo para a simbiose leguminosa-rizóbio (ISRAEL e RUFTY, 1988).

Os efeitos do fósforo sobre a fixação simbiótica de nitrogênio têm sido abordados em inúmeros estudos. Em plantas de alfafa dependentes da fixação simbiótica do N_2 a deficiência de fósforo resulta em redução do número, do tamanho e da massa dos nódulos, além de uma queda no conteúdo de nitrogênio na parte aérea (COLLINS et al., 1986; LANYON e GRIFFITH, 1988). As plantas de feijão submetidas à deficiência de fósforo são particularmente afetadas em sua nutrição nitrogenada, em razão do alto requerimento em fosfato para o pleno funcionamento da simbiose leguminosa-rizóbio (AL-NIEMI et al., 1997). Além disso, a disponibilidade de fósforo influencia o processo de fixação fotossintética do CO_2 e altera o crescimento e o desenvolvimento das plantas (FREDEEN et al., 1989; QIU e ISRAEL, 1994). A supressão de fósforo resulta numa menor taxa de assimilação líquida de CO_2 , das plantas de feijão (SILVA 1998) e soja (GOMES 1999) em todos os estádios de desenvolvimento.

O decréscimo da atividade fotossintética, sob deficiência de fósforo, tem sido associado com o decréscimo na atividade da Rubisco e regeneração da Ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) (RAO e TERRY, 1995). A baixa regeneração da RuBP pode, conseqüentemente, afetar a fotossíntese, em razão de uma redução da atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin, em particular da

cinase da ribulose-5-fosfato, e aumentar o influxo de carbono para a síntese de amido (LI et al., 1998).

As investigações referentes aos efeitos do fósforo sobre o crescimento da alfafa no Brasil, em sua maioria, têm sido realizadas comparando-se situações de déficit e suficiência desse elemento, não se considerando disponibilidades intermediárias desse elemento. O presente estudo objetivou avaliar as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila *a*, os teores de amido e pigmentos fotossintéticos e também a atividade do sistema GS/GOGAT em alfafa nodulada sob tratamento com fósforo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-NIEMI, T.S., KAHN, M.L., McDERMOTT, T.R. P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici*symbiosis. **Plant Physiol.**, v. 113, p. 1233-1242, 1997.
- COLLINS, M., LANG, D.J., KELLING, K.A. Effects of phosphorus, potassium, and sulfur on alfalfa nitrogen-fixation under field conditions. **Agron. J.**, v. 78, p. 959-963, 1986.
- FREDEEN, A.L., RAO, I.M., TERRY, N. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. **Plant Physiol.**, v. 89, p. 225-230, 1989.
- GOMES, F.T. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob supressão e ressuprimento de fosfato**. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1999, 112 p.
- ISRAEL, D.W.; RUFTY, J.T.W. Influence of phosphorus nutrition on phosphorus and nitrogen utilization efficiencies and associated physiological responses in soybean. **Crop Sci.**, v. 6, p. 954-960, 1988.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 313-349, 1991.
- LANYON, L.E., GRIFFITH, A. Nutrition and fertilizer use. In: HANSON, A.A., BARNES, D.K., HILL, R.R., (eds.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, p. 333-372, 1988.
- LI, R., VOLENEC, J.J., JOERN, B.C., CUNNINGHAM, S.M. Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. **Crop Sci.**, v. 36, p. 617-623, 1998.
- QIU, J., ISRAEL, D.W. Carbohydrate accumulation and utilization in soybean plants in response to altered phosphorus nutrition. **Physiol. Plant.**, v. 90, p. 722-728, 1994.
- RAO, I.M., TERRY, N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet IV. Changes with time following increased supply of

phosphate to low-phosphate plants. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1313-1321, 1995.

SILVA, D.M. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1998, 117 p.

VANCE, C.P., HEICHEL, G.H. Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 373-392, 1991.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DE MASSA SECA E EXPANSÃO DA ÁREA FOLIAR EM ALFAFA NODULADA EM RESPOSTA AO FÓSFORO

RESUMO

Estudou-se o efeito do fósforo fornecido em quatro concentrações sobre a produção de massa seca e expansão da área foliar em plantas de alfafa (*Medicago sativa* L. cv. Flórida 77) inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* estirpes BR 7408 e BR 7409. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em cultivo hidropônico, com as concentrações de fósforo correspondentes a 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³. As avaliações dos parâmetros investigados foram feitas nas plantas no estágio R8 (um a três nós com vagem verde). A expansão da área foliar e o acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes foram diminuídos nas plantas expostas a 0,02 mol P m⁻³, e tiveram valores similares sob as concentrações de 0,10 e 1,00 mol P m⁻³. A massa seca das raízes foi menos decrescida do que a da parte aérea, sob a concentração de 0,02 mol P m⁻³ em comparação com as demais, o que resultou em uma maior relação entre a massa seca das raízes e a massa seca da parte aérea. Os parâmetros analisados, de um modo geral, responderam melhor quando o cultivo ocorreu a 0,20 mol P m⁻³, concentração considerada suficiente para o crescimento da cultivar de alfafa ' Flórida 77 '.

1. INTRODUÇÃO

A produção contínua de alfafa geralmente ocasiona quedas significativas das “reservas” de fósforo no solo, o que justifica uma adequada adubação fosfatada a cada ciclo de produção, visando-se a manutenção de seu crescimento (NUERNBERG et al., 1990).

O fósforo influencia o crescimento e rendimento das culturas e representa em torno de 0,2% da massa seca vegetal (SCHACHTMAN, 1998). Em geral, a deficiência de fósforo reduz a biomassa dos nódulos e a fixação do N_2 de forma mais intensa do que o crescimento das plantas. Assim, inferiu-se que o efeito do fósforo sobre a fixação simbiótica de N_2 ocorre principalmente nos nódulos (BONETTI et al., 1984), onde o fósforo tem um papel específico na iniciação, crescimento e funcionamento da estrutura, além de envolver-se no processo de crescimento do hospedeiro (ISRAEL, 1987).

A deficiência de fósforo em plantas de alfafa dependentes da fixação biológica de N_2 resulta em redução do número, do tamanho e da massa seca dos nódulos (COLLINS et al., 1986; LANYON e GRIFFITH, 1988). A massa total e o comprimento das raízes aumentam com a adição de nutrientes ao solo, particularmente de fósforo (GOSS et al., 1992; KOVAR, 1992). A deficiência desse elemento interfere com o crescimento da planta mediante a redução da área foliar e o aparecimento de novas folhas (CROMER et al., 1993; RODRÍGUEZ et al., 1994). Em plantas de soja deficientes em fosfato, o crescimento da parte aérea e dos nódulos é mais afetado do que o da raiz, enquanto em plantas de alfafa observou-se o inverso (DREVON e HARTWIG, 1997).

Os estudos relativos aos efeitos do fósforo sobre o crescimento de plantas de alfafa no Brasil abordam, principalmente, situações de deficiência e suficiência desse nutriente. Este estudo objetivou investigar os efeitos do fósforo em várias concentrações sobre o acúmulo de massa seca e expansão

da área foliar em plantas de alfafa cv. Flórida 77 em simbiose com *Sinorhizobium meliloti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de alfafa, *Medicago sativa* (L.), cv. Flórida 77, cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite – EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG. Procedeu-se a desinfestação prévia das sementes de alfafa, mediante a imersão em etanol 70%, durante 1 minuto, seguida de cinco lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em bandejas plásticas contendo areia lavada e autoclavada (1hora/120°C), a uma profundidade aproximada de 5 mm, sendo o meio mantido úmido com água destilada. Após a germinação, as plântulas não receberam qualquer solução nutritiva até atingirem o estágio de desenvolvimento V2 (Tabela 1). Nesse estágio, elas foram retiradas do substrato, suas raízes lavadas em água destilada e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho. Em seguida, foi efetuada a inoculação no meio de cultura contendo o inóculo de *Sinorhizobium meliloti*.

No preparo do meio de cultura foram utilizadas duas estirpes de *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 e BR 7409, cultivadas separadamente em frascos Erlenmeyer com 50 mL de meio de extrato de levedura e manitol, pH 6,5, a 29°C, até atingirem a densidade óptica correspondente a 10^8 células mL⁻¹ do meio de cultura. Após o crescimento, as estirpes foram misturadas para a imediata inoculação. As plantas inoculadas foram transferidas para vasos de

Tabela 1 – Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de alfafa, *Medicago sativa* (L.)

Estádio	Definição ¹
V0	Abertura total dos cotilédones;
V2	Folha trifoliolada completamente desenvolvida no nó acima do nó das folhas unifolioladas;
V3	Folhas completamente desenvolvidas no 5º nó acima do nó das folhas unifolioladas;
V4	Folhas completamente desenvolvidas no 7º nó acima do nó das folhas unifolioladas;
R6	Um nó com uma flor aberta;
R8	Um a três nós com vagem verde;

¹ Adaptada da descrição de KALU e FICK (1981).

isopor revestidos internamente com sacos de polietileno, com capacidade para 5 L, contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1939), meia força, modificada (Tabela 2). O pH foi mantido em $6,0 \pm 0,3$, com ajustes diários, e a solução nutritiva renovada com base no consumo do potássio (mínimo de 35% da concentração inicial).

O experimento constituiu-se de quatro tratamentos com fósforo na solução nutritiva às concentrações: 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³. Toda a fase experimental foi conduzida durante os meses de fevereiro a julho de 2000, em Viçosa, MG (altitude 650 m, latitude 20,45°S). As plantas estiveram expostas às condições de luz, temperatura e comprimento do dia natural, em casa de vegetação pertencente a Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Tabela 2 – Composição química da solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1939), meia força, modificada

Elemento	Concentração (mol m ⁻³)	Elemento	Concentração (mmol m ⁻³)
K	3,00	Mn	18,00
Ca	3,00	B	46,00
Mg	1,00	Zn	1,50
P ¹	0,02 – 1,00	Cu	0,30
S	2,00	Mo	0,60
Cl	6,26-7,00	Fe	38,00
N ²	0,70	Co ³	0,75

¹Na forma de KH₂PO₄, cuja concentração foi variável conforme o tratamento imposto.

²Na forma de NH₄NO₃ (0,1 mol m⁻³) e KNO₃ (0,6 mol m⁻³), durante a primeira semana de crescimento.

³O CoCl₂ foi suprimido da solução nutritiva na terceira semana de crescimento.

2.2. Determinação da área foliar e massa seca

Os efeitos do fósforo sobre a área foliar, massa seca de nódulos, das raízes e das hastes, bem como a relação entre a massa seca das raízes e das hastes, foram avaliados quando as plantas de alfafa alcançaram o estágio R8 (Tabela 1). A área foliar das plantas foi determinada somando-se a área foliar total de quatro plantas por tratamento. Para isso, empregou-se um integrador fotoelétrico Delta AT, mod. MK2 (Delta-T Devices Ltd., Burwell, Cambridge, England). Foram separadas as partes, nódulos, raízes e parte aérea (hastes e folhas) e colocadas em sacos de papel, para a secagem em estufa de circulação forçada, a 70⁰C até a obtenção de peso de massa constante.

2.3. Delineamento experimental e análise estatística

Cada repetição foi constituída por um vaso com duas plantas, sendo quatro as repetições de cada tratamento, dispostas em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância em nível de 5% de significância pelo teste F.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Área foliar e massa seca

As variáveis de crescimento foram significativamente influenciadas ($P \leq 0,01$) pelas concentrações de fósforo (Tabela 3).

Tabela 3 – Variáveis de crescimento em plantas de alfafa influenciadas por diferentes níveis de fósforo (P) na solução nutritiva

P (mol m ⁻³)	Área foliar [†] -----m ² -----	Nódulos [†] -----g-----	Raiz [†] -----g-----	Haste [†] -----g-----	Raiz/P.aérea [†] -----g/g-----
0,02	0,10 ± 0,003	0,16 ± 0,026	47,93 ± 1,698	14,38 ± 0,571	2,28 ± 0,099
0,10	0,28 ± 0,012	0,44 ± 0,031	77,13 ± 2,782	33,13 ± 1,708	1,49 ± 0,068
0,20	0,41 ± 0,011	0,44 ± 0,019	73,48 ± 2,010	49,23 ± 4,827	1,02 ± 0,048
1,00	0,38 ± 0,011	0,42 ± 0,017	74,08 ± 2,059	38,31 ± 3,295	1,28 ± 0,060

[†] Média de quatro repetições ± desvio padrão.

A área foliar das plantas cultivadas em solução contendo $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ representou de 35,7 a 24,4% das obtidas sob as demais concentrações. O efeito negativo da baixa disponibilidade de fósforo sobre a expansão da área foliar foi também demonstrado em milho, em que fósforo a concentração de $0,001 \text{ mol m}^{-3}$ na solução nutritiva, fornecida 19 dias após o plantio, levou a um decréscimo de 65% na parte aérea das plantas (USUDA e SHIMOGAWARA, 1991). Plantas de soja submetidas a deficiência de fósforo, imposta por uma concentração de $0,05 \text{ mol m}^{-3}$ na solução nutritiva, tiveram uma área foliar 87% menor em relação às plantas bem supridas (QIU e ISRAEL, 1992). A limitação de fósforo promoveu também a diminuição na expansão foliar em girassol (RODRÍGUEZ et al., 1998) e em feijão (LIMA et al., 1999).

Os efeitos da limitação de fósforo sobre a expansão da área foliar são atribuídos a um declínio no alongamento celular, como consequência de um decréscimo na condutância hidráulica, que ocasiona um transporte reduzido de água e, conseqüentemente, uma diminuição da turgescência, necessária para o alongamento celular (RADIN e EIDENBOCK, 1986; RAO e TERRY, 1989).

O acúmulo de massa seca nos nódulos foi limitado pela deficiência de Pi induzida no tratamento sob a menor concentração e não diferiu nos outros três tratamentos (Tabela 3). Essas médias, com valores em torno de 0,42 a 0,44 g/planta, obtidas sob as concentrações 0,10, 0,20 e $1,00 \text{ mol P m}^{-3}$, foram bem distintas da obtida sob $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$, 0,16 g/planta. O principal efeito da deficiência de fósforo sobre a nodulação está na formação e no desenvolvimento dos nódulos e a nutrição fosfatada representa maior estímulo ao crescimento do nódulo do que ao próprio crescimento da planta hospedeira (YUPANQUI, 1997). O presente estudo a massa seca de raiz acrescida da parte aérea sob a concentração $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ (62,31 g) representou 50,78% da massa, em $0,20 \text{ mol P m}^{-3}$ (122,71 g). Já a massa de nódulos sob $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ (0,16 g) é apenas 36% da obtida sob $0,20 \text{ mol P m}^{-3}$ (0,44 g).

O acúmulo de massa seca das hastes de alfafa sob a concentração de $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ foi somente 29,2% do obtido sob $0,20 \text{ mol P m}^{-3}$ (Tabela 3). Nesse tratamento a relação massa seca raiz/parte aérea correspondeu a valor

próximo de 1, mostrando a expressiva contribuição da massa de hastes para o total de massa seca acumulada nesse estágio de crescimento.

O crescimento da planta de soja pode ser mais limitado pelo déficit de fósforo do que a fotossíntese (QIU e ISRAEL, 1992). Como consequência dessa suscetibilidade diferencial entre os processos de crescimento e partição de assimilados, pode haver uma manutenção do crescimento radicular, com um subsequente aumento na relação entre a massa seca da parte aérea e a do sistema radicular, tanto em soja (RUFTY et al., 1993) como em feijão (CAKMAK et al., 1994). Em beterraba açucareira, uma partição diferenciada de fotoassimilados, com transporte dirigido para as raízes, pode ter sido ocasionada pelo fato de que o efeito da deficiência de fósforo sobre a produção de fotoassimilados por área foliar ter sido menor do que a redução da expansão da área foliar (RAO e TERRY, 1995). O aumento na razão de massa seca raiz/haste, pode ser interpretado com uma resposta da planta em meio com limitação em fósforo, para aumentar a aquisição desse elemento (LI et al., 1998).

O crescimento da alfafa 'Flórida 77' foi drasticamente limitado nas plantas do tratamento correspondente a concentração de fósforo de $0,02 \text{ mol m}^{-3}$, sendo a suficiência alcançada sob $0,20 \text{ mol P m}^{-3}$, concentração em que ocorreram os maiores valores de biomassa acumulada e área foliar. Houve uma tendência de queda na massa seca e na área foliar quando se aumentou a concentração de fósforo acima de $0,20 \text{ mol m}^{-3}$ (Tabela 3), o que sugere que o fósforo fornecido à concentração de $1,00 \text{ mol m}^{-3}$ estaria sendo fitotóxico ou interferindo na disponibilidade de outros elementos minerais. O déficit de fósforo interferiu na partição de fotoassimilados entre a parte aérea e as raízes, refletindo em uma maior relação entre o acúmulo de massa seca de raízes e parte aérea, nas plantas submetidas a dosagem $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ em relação aos demais tratamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BONETTI, R., NAZARETH, M., MONTANHEIRO, S., SAITO, S.M.T. The effects of phosphate and soil moisture on the nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris*. **J. Agric. Sci.**, v. 103, p. 95-102, 1984.
- CAKMAK, I., HENGELER, C., MARSCHNER, H. Partitioning of shoot and root dry matter and carbohydrates in bean plants suffering from phosphorus, potassium and magnesium deficiency. **J. Exp. Bot.**, v. 45, p. 1245-1250, 1994.
- COLLINS, M., LANG, D.J., KELLING, K.A. Effects of phosphorus, potassium, and sulfur on alfalfa nitrogen-fixation under field conditions. **Agron. J.**, v. 78, p. 959-963, 1986.
- CROMER, R.N., KRIEDEMANN, P.E., SANDS, P.J., STEWART, L.G. Leaf growth and photosynthetic response to nitrogen and phosphorus in seedling trees of *Gmelia arborea*. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 20, p. 83-98, 1993.
- DREVON, J.J., HARTWIG, V.A. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. **Planta**, v. 201, p. 463-469, 1997.
- GOMES, F.T. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob supressão e ressuprimento de fosfato**. Tese

(Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1999, 100 p.

- GOSS, M.J., MILLER, M.H., BAILEY, L.D., GRANT, C.A. Root growth and distribution in relation to nutrient availability and uptake. **Proceedings of the Roots of Plant Nutrition Conference**, Potash and Phosphate Institute, Foundation for Agronomic Research, Champaign, Illinois, p. 30-40, 1992.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, Califórnia, **Agricultural Experimental Station**. (Circular 347), 39p. 1939.
- ISRAEL, D.W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiol.**, v. 84, p. 835-840, 1987.
- KALU, B.A., FICK, G.W. Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. **Crop Sci.**, v. 21, p. 267-271, 1981.
- KOVAR, J. Phosphorus and nitrogen placement: Effect on root growth. In: J.F. Retz (ed.), **Proceedings of the Roots of Plant Nutrition Conference**, Potash and Phosphate Institute, Foundation for Agronomic Research, Champaign, Illinois, p. 69-79, 1992.
- LANYON, L.E., GRIFFITH, A. Nutrition and fertilizer use. In: HANSON, A.A., BARNES, D.K., HILL, R.R., (eds.) **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison, Wisconsin, USA. American Society of Agronomy, p. 333-372, 1988.
- LIMA, J.D., MOSQUIM, P.R., DA MATTA, F.M. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **Photosynthetica**, v. 37, p. 113-121, 1999.
- LI, R., VOLENEC, J.J., JOERN, B.C., CUNNINGHAM, S.M. Effects os phosphorus nutrition on carbohydrate and protein metabolism in alfalfa roots. **J. Plant Nutr.**, v. 21, p. 459-474, 1998.
- NUERNBERG, N.J., MILAN, P.A., SILVEIRA, C.A. **Manual de produção de alfafa**. Florianópolis: Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária, 1990. 83 p.
- QIU, J., ISRAEL, D.W. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus-deficient soybean plants. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 316-323, 1992.
- RADIN, J.W., EIDENBOCK, M.P. Carbon accumulation during photosynthesis in leaves of nitrogen- and phosphorus-stressed cotton. **Plant Physiol.**, v. 82, p. 869-871, 1986.
- RAO, I.M., TERRY, N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet I. Changes in growth, gas exchange and Calvin cycle enzymes. **Plant Physiol.**, v. 90, p. 814-819, 1989.

- RAO, I.M., TERRY, N. Leaf phosphate status and photosynthesis and carbon partitioning in sugar beet IV. Changes with time following increased supply of phosphate to low-phosphate plants. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1313-1321, 1995.
- RODRÍGUEZ D., SANTA MARIA, G.E., POMAR, M.C. Phosphorus deficiency affects the early development of wheat plants. **J. Agron. Crop Sci.**, v. 173, p. 69-72, 1994.
- RODRÍGUEZ, D., ZUBILLAGA, M.M., PLOCHUK, E.L., KELTJENS, W.G., GOUDRIAAN, J., LAVADO, R.S. Leaf area expansion and assimilate production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) growing under low phosphorus conditions. **Plant and Soil**, v. 202, p.133-147, 1998.
- RUFTY, T.W., ISRAEL, D.W. VOLK, R.J., QIN, J., AS, T. Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. **J. Exp. Bot.**, v. 44, p. 879-891, 1993.
- SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J., AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 447-453, 1998.
- USUDA, H., SHIMOGAWARA, K. Phosphate deficiency in maize. I. Leaf phosphate status, growth, photosynthesis and carbon partitioning. **Plant Cell Physiol**, v. 32, p. 497-504, 1991.
- YUPANQUI, F.F.R. **Nutrição fosfatada e fotossíntese no sistema simbiótico *Medicago sativa-Rhizobium meliloti* em solos com diferentes disponibilidades de fósforo.** Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1997, 124 p.

CAPÍTULO 2

EFEITO DO FÓSFORO SOBRE TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E TEORES DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E AMIDO EM ALFAFA NODULADA

RESUMO

Este trabalho objetivou investigar o efeito do fósforo em várias concentrações sobre as trocas gasosas, a cinética da fluorescência da clorofila *a*, os teores de amido e de pigmentos fotossintéticos em plantas de alfafa (*Medicago sativa* L. cv. Flórida 77) inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* estirpes BR 7408 e BR 7409. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação e as plantas cultivadas em solução nutritiva com as concentrações de fósforo correspondentes a 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³, sendo realizadas as mensurações nas plantas no estádio R8 (um a três nós com vagem verde). Os resultados obtidos permitem concluir que não houve alteração significativa nos teores de clorofilas, de carotenóides e de amido nas plantas sob 0,02 mol P m⁻³. A deficiência de fósforo não provocou limitação da fotossíntese

pela via estomática. Os decréscimos na eficiência fotoquímica do FSII e na distribuição de energia no complexo coletor de luz do FSII nas plantas expostas a $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ seriam um indicativo de que a deficiência de fósforo interferiu na etapa fotoquímica da fotossíntese, levando a um decréscimo na assimilação líquida de CO_2 nas plantas expostas à menor concentração de fósforo.

1. INTRODUÇÃO

A participação do fósforo é reconhecidamente fundamental na fixação de carbono pelo mecanismo fotossintético (BROOKS, 1986; SIVAK e WALKER, 1986). A disponibilidade de fósforo influencia o processo de fixação fotossintética do CO_2 e altera o crescimento e o desenvolvimento das plantas (QIU e ISRAEL, 1994). O fósforo é essencial para o processo da fotossíntese, sendo requerido para a síntese do ATP e da triose fosfato (RAO, 1997). A limitação de fósforo diminui a expansão foliar, bem como a irradiância de saturação da fotossíntese por unidade de área foliar (RODRIGUEZ et al., 1998). A limitação de fósforo diminui a disponibilidade de fotoassimilados para os nódulos e, conseqüentemente, o fornecimento de ATP e poder redutor ao sistema nitrogenase (RAO, 1997).

A exportação de triose fosfato do cloroplasto é controlada por um translocador localizado na membrana interna do envelope cloroplastídico (FLIEGE et al., 1978). Mediante esse translocador, durante a fixação de CO_2 , a absorção líquida do P_i para dentro dos cloroplastos é contrabalançada principalmente pela liberação de triose fosfato produzida pela fotossíntese.

As limitações na exportação de triose fosfato para fora do cloroplasto e o subsequente decréscimo na síntese de sacarose são, freqüentemente, os fatores causadores do acúmulo de amido em folhas. Entretanto, o “turnover” e as mudanças das enzimas envolvidas na síntese de amido podem, também, desempenhar um papel no acúmulo desse carboidrato em plantas deficientes em Pi (RAO et al., 1990).

Em plantas cultivadas, de uma maneira geral, a deficiência de fósforo resulta em decréscimo da fotossíntese (BROOKS, 1986), provavelmente em razão do aumento da concentração de amido na folha (FREDEEN et al., 1989). Esse aumento é acompanhado pela atividade da pirofosforilase do ADPG, uma enzima regulatória chave envolvida na síntese de amido cloroplastídico (LI et al., 1998).

A análise da cinética da fluorescência permite a avaliação de algumas variáveis relacionadas à capacidade de absorção e transferência da energia, principalmente as dependentes do estado de oxidação das moléculas de quinona A (Q_A) e das mudanças conformacionais dos tilacóides (KRAUSE e WEIS, 1991).

Os parâmetros de fluorescência utilizados para estimar-se o desempenho funcional do fotossistema II (FSII) incluem a fluorescência inicial (F_0), a fluorescência máxima (F_m), a fluorescência variável (F_v) e a relação entre esses parâmetros (F_v/F_m e F_v/F_0) (LICHTENTHALER, 1992). Nas plantas em condições de deficiência de fósforo, geralmente, ocorre diminuição na relação F_v/F_m , refletindo a diminuição da eficiência das reações fotoquímicas da fotossíntese (BROOKS, 1986; GUIDI et al., 1994; JACOB, 1995). Outro parâmetro apresentado pela cinética de fluorescência rápida é a razão entre F_v/F_0 , geralmente considerada como um indicador mais sensível das variações nas taxas de conversão fotossintética do que a razão F_v/F_m , por responder prontamente a qualquer variação em F_0 ou em F_v (BABANI e LICHTENTHALER, 1996).

Neste estudo, objetivou-se avaliar os efeitos do fósforo a diferentes concentrações sobre as trocas gasosas, a cinética da fluorescência da clorofila *a*, bem como sobre os teores de amido e de pigmentos fotossintéticos em plantas de alfafa noduladas no estágio R8 de desenvolvimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de alfafa, *Medicago sativa* (L.), cv. Flórida 77, cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite – EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG.

Procedeu-se a desinfestação prévia das sementes de alfafa, mediante a imersão em etanol 70%, durante 1 minuto, seguida de cinco lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada e autoclavada (1hora, 120°C), a uma profundidade aproximada de 5 mm, sendo o meio mantido úmido com água destilada. Após a germinação, as plântulas não receberam qualquer solução nutritiva até atingirem o estágio de desenvolvimento V2 (Tabela 1). Nesse estágio, elas foram retiradas do substrato e suas raízes lavadas em água destilada e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho. Em seguida, foi efetuada a inoculação das plântulas no meio de cultura contendo o inóculo de *Sinorhizobium meliloti*.

No preparo do meio de cultura foram utilizadas duas estirpes de *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 e BR 7409, cultivadas separadamente em frascos Erlenmeyer, com 50 mL de meio de extrato de levedura e manitol, pH 6,5 a 29°C, até atingirem a densidade ótica correspondente a 10⁸ células mL⁻¹ do meio de cultura. Após o crescimento as estirpes foram misturadas para a

Tabela 1 – Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de alfafa, *Medicago sativa* (L.)

Estádio	Definição ¹
V0	Abertura total dos cotilédones;
V2	Folha trifoliolada completamente desenvolvida no nó acima do nó das folhas unifolioladas;
V3	Folhas completamente desenvolvidas no 5º nó acima do nó das folhas unifolioladas;
V4	Folhas completamente desenvolvidas no 7º nó acima do nó das folhas unifolioladas;
R6	Um nó com uma flor aberta;
R8	Um a três nós com vagem verde;

¹ Adaptada da descrição de KALU e FICK (1981).

imediate inoculação. As plantas inoculadas foram transferidas para vasos de isopor revestidos internamente com sacos de polietileno, com capacidade para 5 L, contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1939), meia força, modificada (Tabela 2). O pH foi mantido em 6,0 ± 0,3 com ajustes diários, e a solução nutritiva renovada com base no consumo do potássio (mínimo de 35% da concentração inicial).

O experimento constituiu-se de quatro tratamentos com o fósforo às concentrações, na solução nutritiva, correspondendo a 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³. Toda a fase experimental foi conduzida durante os meses de fevereiro a julho de 2000, em Viçosa, MG (altitude 650 m, latitude 20,45°S). As plantas estiveram expostas às condições de luz, temperatura e comprimento do dia natural, em casa de vegetação pertencente a Unidade de Crescimento de

Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, MG.

Tabela 2 – Composição química da solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1939), meia força, modificada

Elemento	Concentração (mol m ⁻³)	Elemento	Concentração (mmol m ⁻³)
K	3,00	Mn	18,00
Ca	3,00	B	46,00
Mg	1,00	Zn	1,50
P ¹	0,02 – 1,00	Cu	0,30
S	2,00	Mo	0,60
Cl	6,26-7,00	Fe	38,00
N ²	0,70	Co ³	0,75

¹Na forma de KH₂PO₄, cuja concentração foi variável conforme o tratamento imposto.

²Na forma de NH₄NO₃ (0,1 mol m³) e KNO₃ (0,6 mol m³), durante a primeira semana de crescimento.

³O CoCl₂ foi suprimido da solução nutritiva na terceira semana de crescimento.

2.2. Determinação das trocas gasosas

Foram elaboradas curvas de resposta da fotossíntese líquida (A) à radiação fotossinteticamente ativa (Q), para as quais utilizaram-se os níveis de 0, 50, 100, 200, 400, 600, 1000 e 1500 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Os valores de A foram ajustados de acordo com o modelo $A = A_{\text{max}} [1 - e^{-(b \cdot Q / A_{\text{max}})}] - R_d$, em que: A = taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); R_d = taxa respiratória ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); A_{max} = taxa de fotossíntese máxima ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); Q = fluxo de fótons fotossintéticos

na superfície da folha ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e b = inclina\u00e7\u00e3o inicial da curva de $A \times Q_s$. Mediante a constru\u00e7\u00e3o das curvas, utilizou-se uma densidade de fluxo de f\u00f3tons de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, nas avalia\u00e7\u00f5es dos par\u00e2metros das trocas gasosas.

As trocas gasosas referentes \u00e0 taxa de fotoss\u00edntese l\u00edquida (A), \u00e0 condut\u00e2ncia estom\u00e1tica (g_s), \u00e0 taxa de transpira\u00e7\u00e3o por unidade de \u00e1rea foliar (E) e, \u00e0s curvas de resposta da fotoss\u00edntese (A) ao fluxo de f\u00f3tons fotossint\u00e9ticos (Q), foram medidas com um analisador de gases a infravermelho port\u00e1til (IRGA), marca LI-Cor, modelo LI-6400 (LI-Cor, Lincoln, USA) em sistema aberto. Todas as caracter\u00edsticas foram avaliadas no fol\u00edolo central da primeira folha trifoliolada superior totalmente expandida, sob condi\u00e7\u00f5es de densidade de fluxo de f\u00f3tons de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, umidade relativa do ar de aproximadamente 80% e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Com os dados da concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 (C_i) e a concentra\u00e7\u00e3o ambiental de CO_2 (C_a) foi calculada a raz\u00e3o C_i/C_a .

2.3. Determina\u00e7\u00e3o das vari\u00e1veis de fluoresc\u00eancia r\u00e1pida

A determina\u00e7\u00e3o da cin\u00e9tica de fluoresc\u00eancia r\u00e1pida foi realizada no mesmo fol\u00edolo utilizado nas determina\u00e7\u00f5es das trocas gasosas, com um fluor\u00f4metro port\u00e1til modelo PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK), o qual mede os par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia inicial (F_0), fluoresc\u00eancia m\u00e1xima (F_m) e fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel (F_v), com os quais se estimaram as raz\u00f5es F_v/F_m e F_v/F_0 .

2.4. Determina\u00e7\u00e3o dos teores de clorofilas e caroten\u00f3ides

Os teores de clorofilas foram determinados em trif\u00f3lios localizados abaixo daqueles utilizados para as medi\u00e7\u00f5es de fotoss\u00edntese e fluoresc\u00eancia. A extra\u00e7\u00e3o da clorofila foi realizada em almofariz com acetona a 80% (ARNON, 1949). A absorv\u00e2ncia do extrato cet\u00f4nico foi medida a 647, 663 e 470 nm, em espectrofot\u00f4metro marca HITACHI, modelo U1100 (HITACHI, Ltd. Tokyo,

Japan). As concentrações de clorofila *a*, *b*, clorofila total e carotenóides foram calculadas com as fórmulas propostas por LICHTENTHALER (1987).

2.5. Determinação dos teores de amido

Os teores de amido foram determinados em trifólios localizados abaixo daqueles utilizados para as medições das trocas gasosas e também em raízes. Após a remoção dos açúcares solúveis totais com etanol 80% a quente, o precipitado resultante foi suspenso em ácido perclórico 30 % e mantido em repouso durante 30 minutos, sob agitações ocasionais. A suspensão foi centrifugada a 3000 *g*, durante 10 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, sendo o precipitado descartado e os sobrenadantes combinados num volume final de 50 mL com água destilada. Desse extrato, foi retirada uma alíquota para a quantificação do amido, por meio da reação com antrona (McCREADY et al., 1950). A concentração de amido na amostra foi determinada por comparação da absorbância obtida com a de uma curva padrão de glicose. Equivalentes de glicose foram multiplicados por 0,9 para se obter a quantidade de amido na amostra.

2.6. Determinação dos teores de fosfato inorgânico (Pi)

Os teores de fosfato inorgânico foram determinados no terceiro trifólio superior completamente expandido, a partir do ápice e em amostras de raízes finas, utilizando-se do método proposto por SMILLIE e KROTKOV (1960), e adaptado por HOUGE et al. (1970) e PEREIRA (1992). O material vegetal foi coletado e imerso em 2 mL de HClO₄ 0,2 N e imediatamente armazenado a – 80°C. As amostras foram maceradas em HClO₄ 0,2 N e centrifugadas a 3000 *g*, por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido em balão volumétrico de 25 mL e o resíduo ressuspenso, sendo o processo repetido por duas vezes, com o volume final ajustado para 25 mL, com HClO₄ 0,2 N. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação com molibdato de amônio (LINDEMAN, 1958).

2.7. Delineamento experimental e análise estatística

Cada repetição foi constituída por um vaso com duas plantas, sendo quatro as repetições de cada tratamento, e dispostas em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância em nível de 5% de significância, pelo teste F.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teores de fosfato inorgânico

Os teores de fosfato inorgânico (Pi) na massa fresca de folhas de alfafa foram de 0,099 mg g⁻¹ sob os tratamentos contendo 0,02 e 0,10 mol P m⁻³, 0,23 mg g⁻¹ sob 0,20 mol P m⁻³ e 1,03 mg g⁻¹ nas folhas das plantas crescidas sob 1,00 mol P m⁻³ (Figura 1).

Os teores de Pi nas folhas foram similares aos obtidos por GOMES (1999), de 0,93 a 1,43 mg g⁻¹ massa fresca em plantas de alfafa submetidas a supressão e ressuprimento de fosfato.

A concentração de Pi nas folhas não se alterou com o aumento da concentração de P na solução nutritiva de 0,02 para 0,10 mol m⁻³. Isso pode ser atribuído a um maior crescimento das plantas sob 0,10 mol P m⁻³, em relação às crescidas com 0,02 mol P m⁻³ (Capítulo 1, Figura 3), o que resultou

em uma “diluição” do fósforo em função de um maior acúmulo de biomassa nas plantas crescidas sob 0,10 mol P m⁻³.

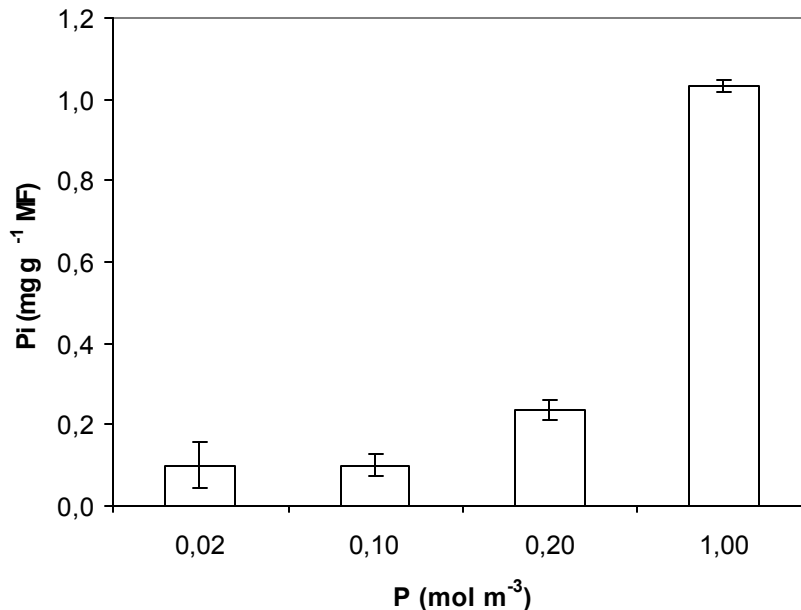


Figura 1 – Teores de fosfato inorgânico (Pi) na massa fresca (MF) de folhas de plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em várias concentrações na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

O fósforo, fornecido em diversas concentrações na solução nutritiva, influenciou significativamente ($P \leq 0,01$) os teores de Pi encontrados nas raízes, a exemplo dos resultados obtidos em plantas de alfafa por LI et al. (1998). Os teores de Pi em raízes de alfafa variaram de forma similar aos das folhas, no que se refere as concentrações de 0,02 e 0,10 mol P m⁻³ na solução nutritiva (Figura 2).

Em plantas de alfafa em estádios reprodutivos, os teores de Pi nas raízes foram inferiores aos observados nas folhas (Figuras 1 e 2).

Possivelmente, os menores teores de Pi nas raízes se deveram à maior remobilização do elemento para a parte aérea e órgãos reprodutivos, além de uma queda no processo de absorção, como observado em feijão (SNAPP e LYNCH, 1996).

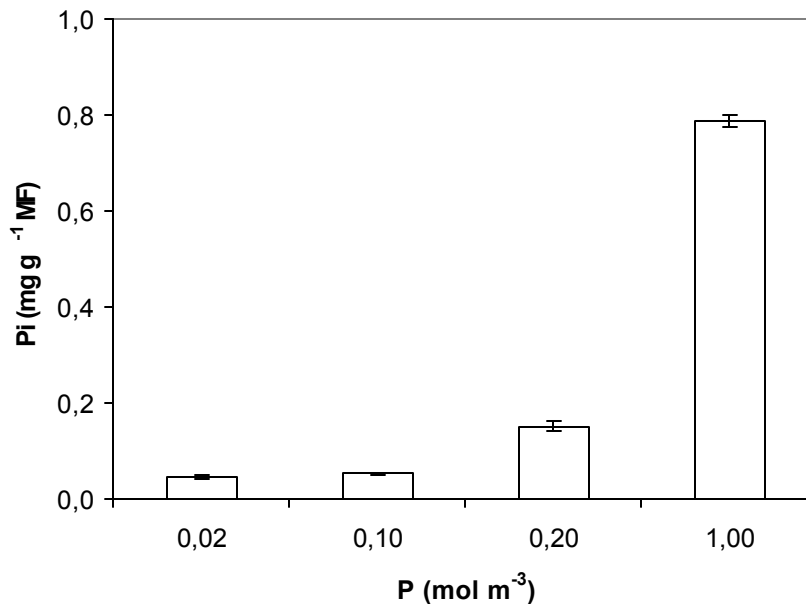


Figura 2 – Teores de fósforo inorgânico (Pi) na massa fresca (MF) de raízes de plantas de alfafa no estágio R8, em função da concentração de fósforo (P) na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

3.2. Teores de clorofilas e carotenóides

Os teores de clorofila *a* (Chl *a*) e *b* (Chl *b*) não foram significativamente alterados pelo fósforo em diversas concentrações na solução nutritiva (Tabela 3). As folhas das plantas de alfafa crescidas em solução nutritiva com 0,02 mol P m⁻³ apresentaram os maiores teores de carotenóides (Tabela 3).

O aumento no teor de carotenóides sob baixa concentração de fósforo, pode ser atribuído a existência de um mecanismo adaptativo. Existem evidências de que alguns tipos de estresses, combinados com alta luminosidade, aumentam a formação de oxigênio singlete e de superóxidos, no

cloroplasto. Nessas condições, os sistemas antioxidantes do cloroplasto, nos quais participam os carotenóides, têm suas atividades incrementadas (SMIRNOFF, 1995). É possível que a razão clorofila *a/b* não tenha sofrido redução nas folhas das plantas cultivadas sob 0,02 mol m⁻³ de P (Tabela 3), em razão do efeito fotoprotetor dos carotenóides.

Tabela 3 – Efeito do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução nutritiva, sobre os teores de clorofila a (Chl *a*), clorofila b (Chl *b*) e carotenóides na massa fresca (MF) de folhas de alface, no estágio R8

P	Chl <i>a</i> ¹	Chl <i>b</i> ¹	Carotenóides ¹	Relação ¹
(mol m ⁻³)	-----mg g ⁻¹ MF-----			Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>
0,02	1,90 ± 0,10	0,85 ± 0,21	0,85 ± 0,09	2,28 ± 0,22
0,10	1,73 ± 0,49	1,06 ± 0,24	0,64 ± 0,10	1,20 ± 0,12
0,20	1,22 ± 0,37	0,50 ± 0,28	0,43 ± 0,07	2,44 ± 0,10
1,00	1,60 ± 0,53	0,80 ± 0,22	0,51 ± 0,08	2,04 ± 0,11

¹ Média de quatro repetições ± desvio padrão.

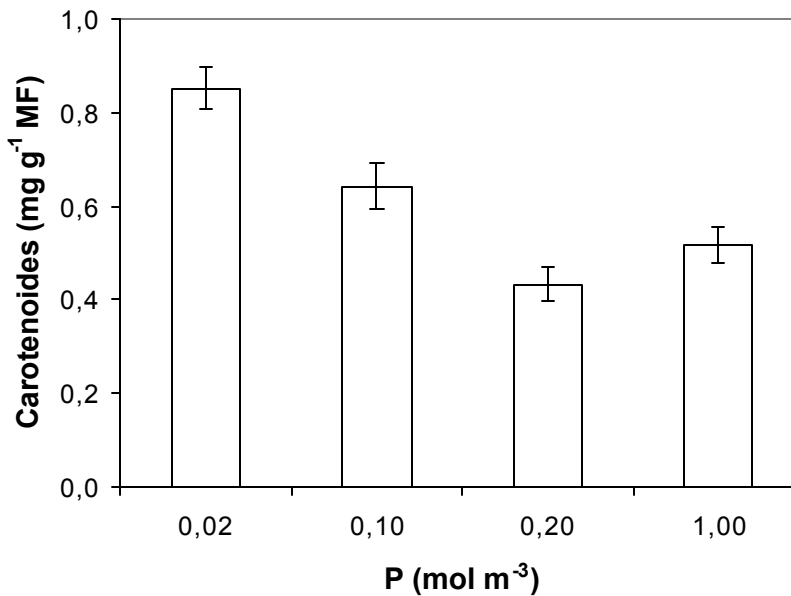


Figura 3 – Teores de carotenóides na massa fresca (MF) de folhas de alfafa no estágio R8 em função do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução nutritiva. Cada coluna representa a média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

O declínio na razão clorofila *a/b* pode refletir danos no complexo central do FSII, uma vez que a clorofila *b* está localizada no complexo coletor de luz do FSII e que a sua concentração é maior no FSII do que no FSI (KEUTGEN et al., 1997).

Os estudos dos efeitos do fósforo sobre os teores de pigmentos fotossintéticos têm mostrado que uma deficiência de Pi nem sempre afeta as concentrações de clorofilas e de carotenóides. Em alfafa, a supressão de Pi da solução nutritiva reduz significativamente os teores desse elemento nas folhas e provavelmente não influenciou na biossíntese ou na degradação das clorofilas *a* e *b* e de carotenóides (GOMES, 1999). O déficit de fósforo não provoca redução no teor de clorofilas em plantas de feijão (USUDA e SHIMOGAWARA, 1991; LIMA et al., 1999) e, nessa cultura também não ocorre uma queda significativa nos teores de clorofilas totais e carotenóides em resposta ao déficit de fósforo (LIMA et al., 2000). Em alfafa, a relativa constância nos teores dos pigmentos fotossintéticos pode ter sido consequência de uma manutenção da captação de luz pelo sistema antena do

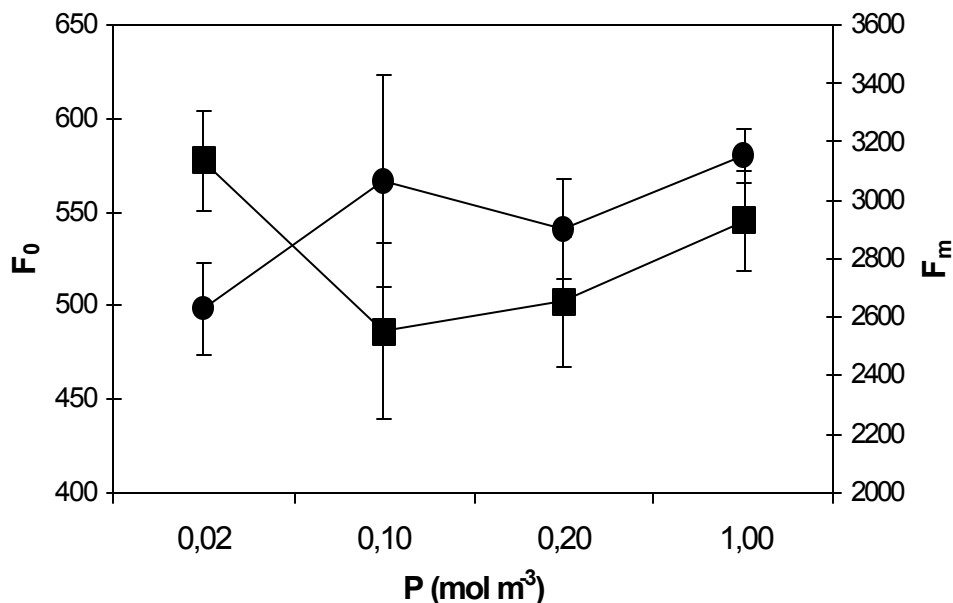
FS II (LHC II) e na capacidade de transferência de elétrons na cadeia fotossintética (GOMES, 1999).

A deficiência de Pi reduziu a concentração de clorofila total em folhas de beterraba, em cerca de 23% (RAO e TERRY, 1989), e em folhas de girassol (PLESNICAR, 1994). Em plantas de soja sob supressão de fosfato, nas quais os pigmentos fotossintéticos tiveram sua síntese reduzida, não ocorreu o restabelecimento dos teores considerados normais após o ressuprimento com Pi (SILVA 1998).

3.3. Variáveis de fluorescência rápida

Os valores de F_0 e F_m em folíolos de alfafa no estágio R8, demonstraram a existência de efeito do fósforo, em diferentes concentrações na solução nutritiva, sobre F_0 ($P \leq 0,01$) e F_m ($P \leq 0,05$).

O aumento de F_0 nos folíolos das plantas crescidas na solução com fósforo sob a menor concentração de P (Figura 4), pode ser atribuído à diminuição redução na captura e transferência de energia pelo complexo

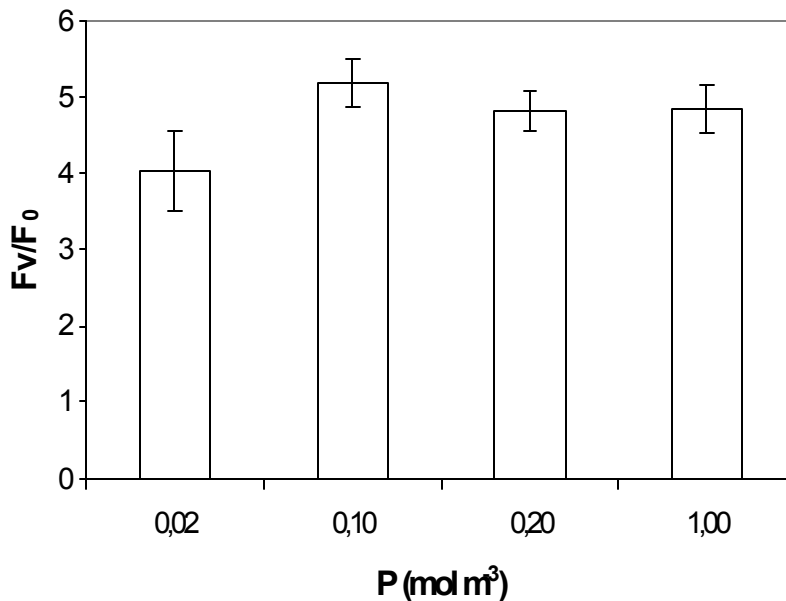


coletor de luz. GUENTER e MELIS (1990) sugeriram que, como consequência

Figura 4 – Fluorescência inicial (F_0) e fluorescência máxima (F_m), obtidas em plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diversas concentrações na solução nutritiva. Cada ponto representa a média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

da fotoinibição, o centro de reação e o complexo coletor de luz se desacoplam. Esse desacoplamento indica que o complexo coletor de luz é incapaz de transferir a energia de excitação ao centro de reação e, assim esta energia é emitida como fluorescência, incrementando-se o valor de F_0 (OUZOUNIDOU, 1993). Um aumento em F_0 foi verificado em folíolos de plantas de alfafa submetidas a tratamento de supressão de fósforo, em relação aos de plantas crescidas em suficiência desse elemento (GOMES, 1999).

O fósforo em diferentes concentrações na solução nutritiva influenciou, de maneira altamente significativa ($P \leq 0,01$), a razão F_v/F_0 (Figura 5). A menor razão F_v/F_0 , 4,02, derivada das medições em folíolos de plantas crescidas em solução nutritiva contendo $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$, pode ser assumida como um indicador de danos estruturais, os quais ocorrem no tilacóide e afetam o transporte fotossintético de elétrons. O decréscimo na razão F_v/F_0 pode decorrer de um aumento em F_0 ou redução de F_v (HAVAUX e LANNOYE,



1985).

Figura 5 – Razão fluorescência variável/inicial (F_v/F_0), obtida de plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

O valor da razão F_v/F_0 sob a menor concentração de fósforo representou, aproximadamente, 77% dos obtidos nos tratamentos com 0,10, 0,20 e 1,00 mol P m⁻³. Esses resultados foram similares aos obtidos por LIMA et al. (1999), em que o decréscimo na razão F_v/F_0 em plantas de feijão sob défices de nitrogênio e de fósforo foi de 25%, enquanto a redução de F_v/F_m foi de apenas 7%. A razão F_v/F_0 reflete, de forma mais sensível do que a razão F_v/F_m , as mudanças na fotossíntese (BABANI e LICHTENTHALER, 1992).

O fósforo na solução nutritiva teve efeito sobre a razão F_v/F_m ($P \leq 0,01$). Na menor dosagem de fósforo na solução, a razão F_v/F_m foi reduzida em 4 a 6% das determinadas nas outras concentrações (Figura 6).

Quando uma situação de estresse afeta a fotossíntese, F_v que é representada por $(F_m - F_0)$, usualmente decresce, o que pode decorrer das elevações de F_0 , indicando baixa eficiência de transferência de energia do complexo antena (LHCII) ao centro de reação do FSII (ABADIA et al., 1987), ou devido a diminuição de F_m , em virtude de um decréscimo na concentração dos aceptores de elétrons do FSII.

$$A = 13.64[1 - e^{-(0.0797 \cdot I / (13.64))}] - 1.70$$

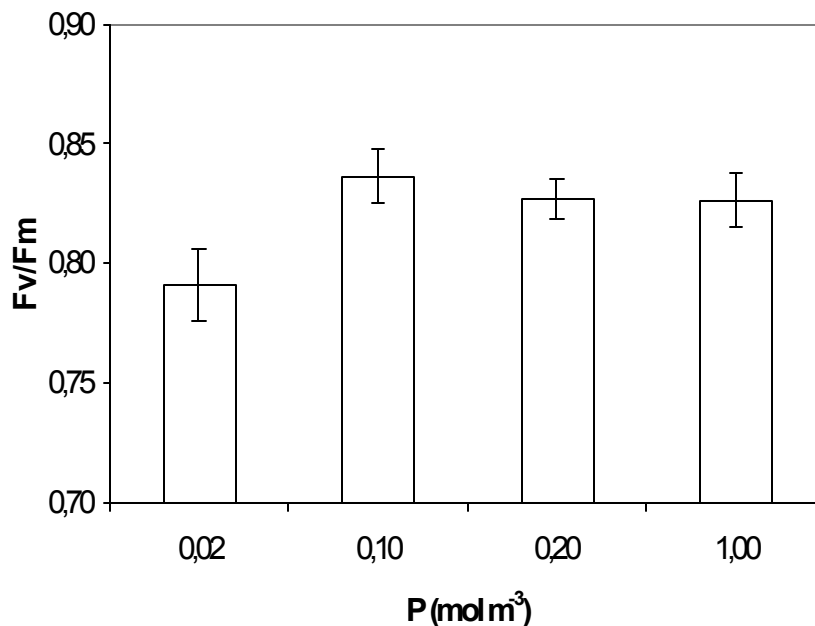


Figura 6 – Razão fluorescência variável/máxima (F_v/F_m), obtida de plantas de alfafa no estágio R8, em função da concentração de fósforo (P) na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A baixa concentração exerceu um efeito sobre F_0 e F_m . Em virtude disso, a redução da razão F_v/F_m nas plantas tratadas com fósforo sob a menor concentração resultou de um aumento em F_0 e um decréscimo em F_m (Figura 4).

A diferença das razões F_v/F_m entre os tratamentos pode apenas expressar uma tendência verificada em função do fósforo em diferentes concentrações de fósforo, pois os valores obtidos mantiveram-se dentro da faixa normal de amplitude de 0,75 a 0,85 (BOLHÄR-NORDENKAMP e ÖQUIST, 1993). Contudo, o decréscimo da fotossíntese nas plantas sob $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ (Figura 12) seguiu uma tendência similar ao decréscimo observado nas variáveis de fluorescência rápida.

3.4. Variáveis de trocas gasosas

As equações de resposta de A em função de Q (Figura 7) demonstram que a irradiância de saturação nas plantas expostas ao fósforo sob a concentração de $0,02 \text{ mol m}^{-3}$ foi de $500 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e de $800 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ nas plantas sob a dosagem de $1,00 \text{ mol m}^{-3}$. Em razão disso, para todas as medições de trocas gasosas adotou-se a irradiância de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

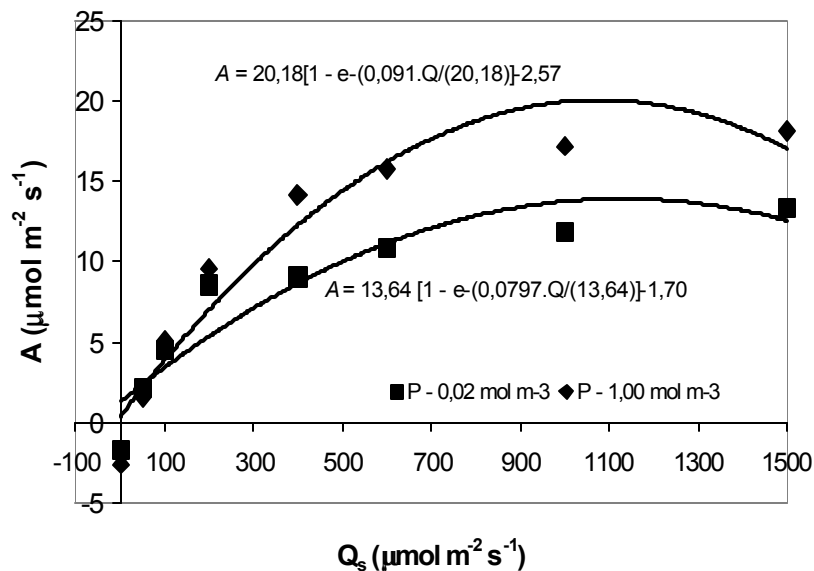


Figura 7 – Curvas de resposta da fotossíntese em função do fluxo de fótons fotossintéticos, obtidas de plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em duas concentrações na solução nutritiva.

As curvas de resposta da taxa fotossintética líquida (A) ao fluxo de fótons fotossintéticos (Q) foram estabelecidas previamente às medições das variáveis de trocas gasosas, avaliando-se as taxas de fotossíntese líquida por unidade de área foliar (A) em função dos níveis de Q : 0, 50, 100, 200, 400, 600, 1000 e $1500 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de Q .

As curvas de resposta da fotossíntese à radiação fotossinteticamente ativa, em plantas de alfafa no estágio R8, em função da concentração do

fósforo na solução de crescimento (Figura 7), sugerem que o fósforo em baixas concentrações pode estar interferindo sobre a atividade de fixação do CO₂, impossibilitando as plantas de incrementarem a fotossíntese com irradiância mais alta. A deficiência de fósforo pode restringir a taxa fotossintética máxima, mesmo sob condições de luz e CO₂ saturantes (GUIDI et al., 1994).

A irradiância de saturação da maioria das espécies situa-se entre 500 e 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em folhas intactas. Uma vez atingida a irradiância de saturação, os aumentos adicionais no fluxo de fótons não afetam as taxas de fotossíntese, indicando que as reações que envolvem o transporte de elétrons, a atividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) ou o metabolismo das trioses fosfatadas se tornam limitantes (TAIZ, 1998).

A condutância estomática ao vapor de água por unidade de área foliar (g_s) mostrou-se influenciada ($P \leq 0,05$) pelo fósforo em diferentes concentrações na solução nutritiva, quando um aumento na concentração até 0,20 mol m⁻³ foi acompanhado de crescentes valores de g_s (Figura 8). Contudo, um aumento acima de 0,20 mol m⁻³ ocasionou uma diminuição na g_s .

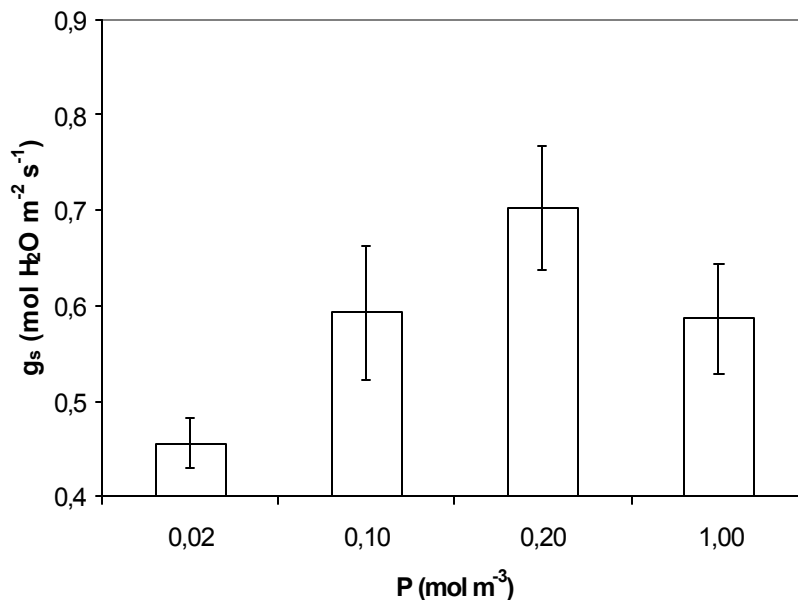


Figura 8 – Condutância estomática ao vapor de água por unidade de área foliar (g_s), em plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diversas concentrações na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A condutância estomática de $0,45 \text{ mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pode não constituir em uma limitação para a fotossíntese nas plantas sob $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$, tendo em vista que em plantas de feijão, somente valores de g_s abaixo de $0,29 \text{ mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ representam limitação para altas taxas fotossintéticas (LIMA et al., 1999).

O fósforo, em diferentes concentrações, não exerceu influência ($P \leq 0,05$) sobre a taxa transpiratória por unidade de área foliar (E) (Figura 9). Nesse caso, pode ser que desde que a transpiração não fora afetada, dificilmente a entrada de CO_2 o seria, pois as resistências à entrada do CO_2 são maiores do que a saída de vapor de água (KRAMER, 1995). Assim sendo, eventuais impedimentos estomáticos para a entrada de CO_2 poderiam interferir ainda mais na saída de vapor de água, o que não foi constatado. Esses suportam a tese de que a concentração de fósforo não estaria, direta ou indiretamente, representando uma limitação estomática à assimilação fotossintética do CO_2 .

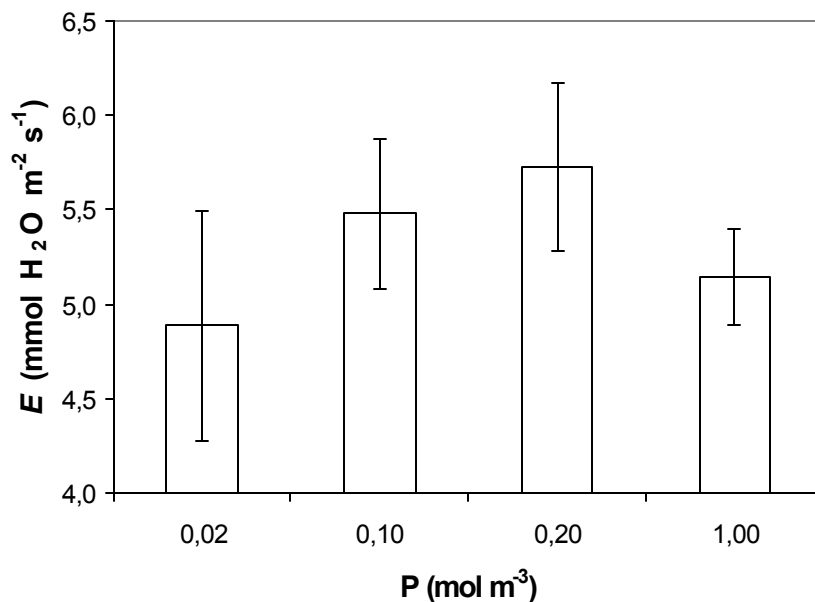


Figura 9 – Taxa transpiratória por unidade de área foliar (E), em plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução de cultivo. Cada coluna do gráfico corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

O fósforo na solução nutritiva alterou ($P \leq 0,01$) a relação entre os teores de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i) e na atmosfera (C_a), a denominada relação (C_i/C_a) (Figura 10). Os valores de C_i/C_a situaram-se entre 0,77 e 0,82. Essa relação de C_i/C_a normalmente se mantém por volta de 0,7 (BAUER et al., 1983).

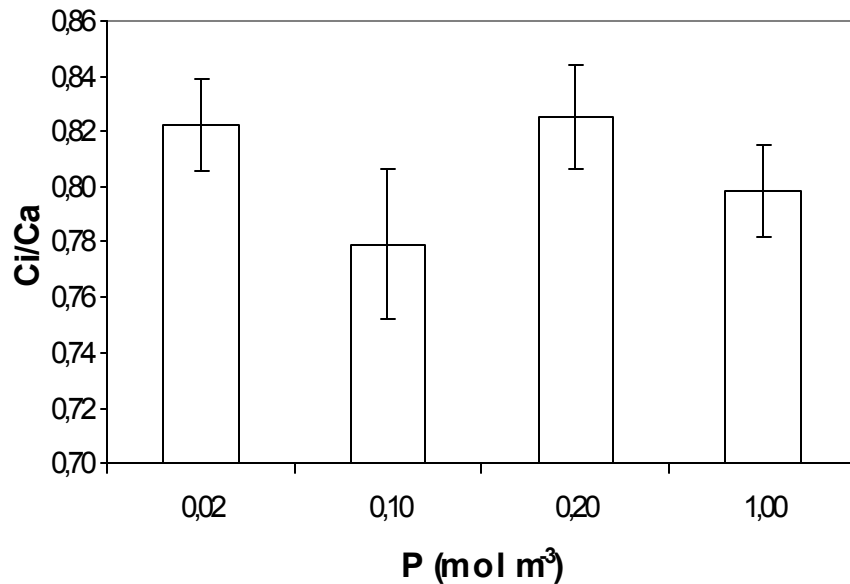


Figura 10 – Relação C_i/C_a em plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução de cultivo. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

Esperava-se que aumentos na relação C_i/C_a pudessem indicar uma eventual limitação não estomática à fotossíntese, devido a uma menor assimilação do CO_2 dentro da folha. Entretanto, não houve grandes diferenças entre as médias obtidas com os tratamentos com fósforo em quatro concentrações. Assim, mediante a variável C_i/C_a não se pode inferir se houve uma limitação não estomática à fotossíntese em função do fósforo, no presente estudo.

As taxas fotossintéticas por unidade de área foliar (A) (Figura 11) foram influenciadas ($P \leq 0,01$) pela concentração de fósforo.

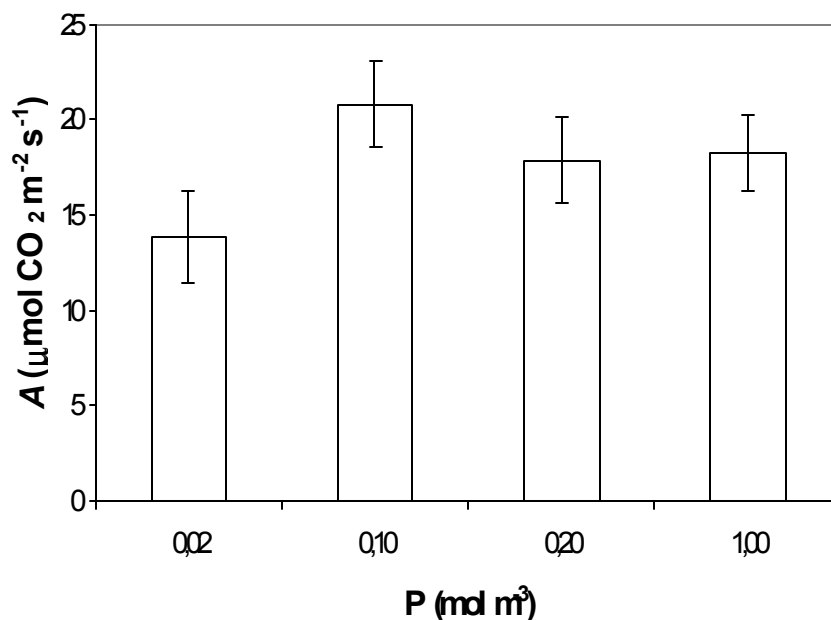


Figura 11 – Taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar (A) no folíolo central do terceiro trifólio completamente expandido de plantas de alfafa no estágio R8, em função da concentração de fósforo (P) na solução de cultivo. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A fotossíntese teve seu menor valor nas plantas sob $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$, com uma média de $13,84 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Apesar das diferenças entre as concentrações de fósforo, não se constatou a existência de diferença significativa entre as médias de A , mesmo considerando-se o decréscimo de 15% em A , quando do aumento da concentração de $0,10$ para $0,20 \text{ mol m}^{-3}$, ou o acréscimo de 2% existente entre $0,20$ e $1,00 \text{ mol m}^{-3}$ de P na solução de crescimento das plantas de alfafa.

A atividade fotossintética por unidade de área foliar, em condições de deficiência de fósforo, pode ser reduzida em 30%, em soja (QIU e ISRAEL, 1992) e em feijão (LIMA et al., 1999). A supressão de fósforo, durante o crescimento de soja (SILVA, 1998) e de alfafa (GOMES, 1999) resultou em uma menor taxa de assimilação líquida de CO_2 , nas plantas sob todos os estádios de desenvolvimento investigados.

Os resultados obtidos com a cultivar de alfafa Flórida 77 indicam que o comportamento de *A* foi semelhante ao das variáveis de fluorescência rápida (Figuras 5 e 6). Assim, a fotossíntese nas plantas sob déficit de fósforo parece ter sido limitada via a etapa fotoquímica. Contudo a maioria dos dados da literatura sinalizam para um efeito negativo do déficit de fósforo sobre a etapa bioquímica da fotossíntese. Em folhas de plantas de beterraba açucareira, o fósforo sob baixas concentrações exerceu um pequeno efeito sobre a cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese, além de um efeito ainda menor sobre o rendimento quântico do processo (ABADIA et al., 1987). Naquela espécie, as taxas fotossintéticas decresceram significativamente nas plantas sob déficit de fósforo, havendo sido o maior efeito da deficiência de fósforo sobre a fotossíntese atribuído à reações enzimáticas no estroma (RAO e TERRY, 1989). Outros autores indicam que o déficit de fósforo limita, principalmente, a etapa bioquímica da fotossíntese (FREDEEN et al., 1989; QIU e ISRAEL, 1994; RAO e TERRY, 1994; LIMA et al., 1999).

O decréscimo da fotossíntese é provocado principalmente pela falta de regeneração da RuBP (BROOKS et al., 1988). Esse decréscimo na regeneração da RuBP é atribuído ao decréscimo da atividade das enzimas PGA cinase, NADP-G3P dehidrogenase, e Ru5P cinase. A redução da atividade fotossintética, sob baixos níveis de fósforo, pode estar relacionada ao decréscimo nos níveis de RuBP, pois o Pi precisa ser gerado em grande quantidade (RAO e TERRY, 1995). O aumento do processo fotorrespiratório também pode contribuir para a redução da assimilação líquida de carbono nas plantas sob fósforo em baixa concentração (JACOB e LAWLOR, 1992; KONDRACKA e RYCHTER, 1997).

3.5. Teores de amido

Os teores de amido na folha e na raiz de alfafa no estágio R8 (Tabela 4) foram influenciados ($P \leq 0,01$) pela disponibilidade de fósforo na solução nutritiva. Os teores de amido em folhas e raízes não se ajustaram ao postulado de que a deficiência de Pi estaria associada a um maior acúmulo de amido em relação a condição de suficiência de fósforo.

Tabela 4 – Efeito das concentrações de fósforo (P) sobre o teor de amido na massa fresca (MF) de folhas e raízes de alfafa no estágio R8

P (mol m ⁻³)	Amido (mg g ⁻¹ MF)	
	Folha ¹	Raiz ¹
0,02	33,7 ± 2,8	3,6 ± 0,57
0,10	30,3 ± 3,7	2,8 ± 0,37
0,20	41,4 ± 4,0	2,6 ± 1,24
1,00	23,3 ± 2,8	3,3 ± 0,60

¹ Média de quatro repetições ± desvio padrão.

Em plantas de soja deficientes em fósforo a concentração de amido em folhas pode ser até 30 vezes maior e em raízes fibrosas, até 7 vezes, em relação a plantas não deficientes (FREDEEN et al., 1989). Esse aumento na concentração foi atribuído à redução na disponibilidade de Pi citoplasmático, que seria necessário para o transporte de triose fosfato e ácido fosfoglicérico do estroma para o citosol, via translocador de triose fosfato, localizado na membrana do cloroplasto (FLUGGE, 1995). Nesse contexto, um acúmulo de ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) nos cloroplastos estaria estimulando a atividade da pirofosforilase do ADPG, uma enzima regulatória chave envolvida na síntese de amido. O incremento da síntese de amido em folhas deficientes em fósforo foi atribuído a um acréscimo na atividade da pirofosforilase do ADPG, Frutose-1,6-bisfosfato aldolase (FBP aldolase) e frutose-1,6-bisfosfato fosfatase (FBPase) (RAO e TERRY, 1989).

Os aumentos na concentração de amido em folhas de beterraba açucareira deficiente em fósforo (RAO et al., 1990) e em soja (QIU e ISRAEL, 1992), foram acompanhados de aumento na atividade da pirofosforilase do ADPG.

Constatou-se um aumento no acúmulo de amido correspondente a 30% e 40% em raízes submetidas a 0,02 mol m⁻³, em comparação ao obtido sob 0,10 mol m⁻³, e 0,20 mol m⁻³ de P, respectivamente. As raízes de alfafa acumulam amido em altas concentrações quando crescem sob baixas concentrações de Pi. A retomada do crescimento e utilização das reservas radiculares porém, são prejudicadas pela deficiência desse elemento (LI et al.,

1998). Em estudo com alfafa, a supressão de fosfato causou um aumento no teor de amido nas raízes das plantas em todos os estádios de desenvolvimento estudados (GOMES, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIA J., RAO, I.M., TERRY, N. Changes in leaf phosphate status have only small effects on the photochemical apparatus of sugar beet leaves. **Plant Sci.**, v. 50, p. 49-55, 1987.
- ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.**, v. 24, p. 1-15, 1949.
- BABANI, F., LICHTENTHALER, H.K. Light-induced and age-dependent development of chloroplast in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. **J. Plant Physiol.**, v.148, p. 555-566, 1996.
- BAUER, H., MARTHA, P., KIRCHNER-HEISS, B., MAIRHOFER, I. The CO₂ compensation point of C₃ plants – a re-examination II. Intraspecific variability. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 109, p. 143-154, 1983.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O., SCURLOCK, J.M.O., BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R., LEEGOOD, R.C., LONG, S.P. (eds). **Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual**. London, Chapman & Hall, 1993. p. 193-206.
- BROOKS, A. Effects of phosphorus nutrition on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activation, photosynthetic quantum yield and amounts of some Calvin-cycle metabolites in spinach leaves. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 13, p. 221-237, 1986.

- BROOKS, A. WOO, K.C., WONG, S.C. Effects of phosphorus nutrition on the response of photosynthesis to CO₂ and O₂, activation of ribulose biphosphate carboxylase and amounts of ribulose biphosphate and 3-phosphoglycerate in spinach leaves. **Photosynth. Res.**, v. 15, p. 133-141, 1988.
- CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Sci.**, v. 5, p. 187-188, 2000.
- DUA, A., TALWAR, G., SINGAL, H.R., SINGH, R. CO₂ exchange, primary photochemical reactions and enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in *Brassica* pods during water stress and recovery. **Photosynthetica**, v. 30, p. 261-268, 1994.
- FLIEGE, R., FLUGGE, U.I., WERDAN, K. Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 502, p. 232-247, 1978.
- FLUGGE, U.I. Phosphate translocation in the regulation of photosynthesis. **J. Exp. Bot.**, v. 46, p. 1317-1323, 1995.
- FREDEEN, A.L., RAO, I.M., TERRY, N. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. **Plant Physiol.**, v. 89, p. 225-230, 1989.
- GOMES, F.T. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob supressão e ressuprimento de fosfato.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1999, 100 p.
- GUENTER, J.E., MELIS, A. The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. **Photosynth. Res.**, v. 23, p. 105-109, 1990.
- GUIDI, L., PALLINI, G.F., SOLDATINI, G.F. Influence of phosphorus deficiency on photosynthesis in sunflower and soybean plants. **Agrochimica**, v. 32, p. 211-223, 1994.
- HAVAUX, M., LANNOYE, R. *In vivo* chlorophyll fluorescence and delayed light emissions as rapid screening techniques for stress tolerance in crop plants. **Z. Pflanzenzücht**, v. 95, p. 1-13, 1985.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, California, **Agricultural Experimental Station.** (Circular 347), 39p. 1939.
- HOUGE, E., WILCOX, G.E., CANTLIFFE, D.J. Effect of soil phosphorus level on phosphate fractions in tomato leaves. **J. Am. Hort. Sci.**, v. 95, p. 174-176, 1970.

- JACOB, J., LAWLOR, D.W. Dependence of photosynthesis of sunflower and maize leaves on phosphate supply, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity, and ribulose-1,5-bisphosphate pool size. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 801-807, 1992.
- JACOB, J. Phosphate deficiency increases the rate constant of thermal dissipation of excitation energy by photosystem II in intact leaves of sunflower and maize. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.22, p. 417-424, 1995.
- KALU, B.A. FICK, G.W. Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. **Crop Sci.**, v. 21, p. 267-271, 1981.
- KEUTGEN, N., CHEN, K., LENZ, F. Responses of strawberry leaf photosynthesis, chlorophyll fluorescence and macronutrient contents to elevated CO₂. **J. Plant Physiol.**, v. 150, p. 395-400, 1997.
- KONDRACKA, A., RYTCHTER, A. The role of Pi recycling process during photosynthesis in phosphate-deficient bean plants. **J. Exp. Bot.**, v. 48, p. 1461-1468, 1997.
- KRAMER, P.J. **Water relations of plants and soils**. 2. ed. San Diego, USA: Academic Press, 1995. 495 p.
- KRAUSE, G.H., WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basic. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 313-349, 1991.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O. (eds.) **Methods in Enzymology**, v. 148. New York, USA, Academic Press. Inc., p. 350-382, 1987.
- LICHTENTHALER, H.K., BURKART, S., SCHINDLER, C., STOBER, F. Changes in photosynthetic pigments and *in vivo* chlorophyll fluorescence parameters under photoinhibitory growth conditions. **Photosynthetica**, v. 27, p. 343-353. 1992.
- LIMA, J.D., MOSQUIM, P.R., DA MATTA, F.M. Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in *Phaseolus vulgaris* as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **Photosynthetica**, v. 37, p. 113-121, 1999.
- LIMA, J.D., DA MATTA, F.M., MOSQUIM, P.R. Growth attributes, xylem sap composition, and photosynthesis in common bean as affected by nitrogen and phosphorus deficiency. **J. Plant Nutr.**, v. 23, p. 937-942, 2000.
- LINDEMAN, W. Observations on the behaviour of phosphate compounds in Chlorella at the transition from dark to light. **Proc. 2nd U. N. International Conference on the peaceful uses of atomic energy**, v. 24, p. 8-15, 1958.

- LI, R., VOLENEC, J.J., JOERN, B.C., CUNNINGHAM, S.M. Seasonal changes in nonstructural carbohydrates, protein, and macronutrients in roots of alfalfa, red clover, sweetclover, and birdsfoot trefoil. **Crop Sci.**, v. 36, p. 617-623, 1998.
- McCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVEIRA, V., OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Ann. of Chem.**, v. 22, p. 1156-1158, 1950.
- OUZOUNIDOU, G. Changes in variable chlorophyll fluorescence as a result of Cu-treatment: dose-response relations in *Silele* and *Thaspi*. **Photosynthetica**, v. 29, p. 455-462, 1993.
- PEREIRA, P.R.G. **Eficiência de utilização de frações de fósforo na soja e regulação da colonização micorrízica**. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 174p., 1992.
- PLESNICAR, M., KASTORI, R., PETROVIC, N., PANKOVIC, D. Photosynthesis and chlorophyll in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves as affected by phosphorus nutrition. **J. Exp. Bot.** v. 45, p. 919-924, 1994.
- QIU, J., ISRAEL, D.W. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus deficient soybean plants. **Physiol. Plant**, v. 98, p. 316-323, 1992.
- QIU, J., ISRAEL, D.W. Carbohydrate accumulation and utilization in soybean plants in response to altered phosphorus nutrition. **Physiol. Plant**, v. 90, p. 722-728, 1994.
- RAO, I.M., TERRY, N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet I. Changes in growth, gas exchange and Calvin cycle enzymes. **Plant Physiol.**, v. 90, p. 814-819, 1989.
- RAO, I.M., FREEDEN, A.L., TERRY, N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet III. Diurnal changes in carbon partitioning and carbon export. **Plant Physiol.**, v. 92, p. 29-36, 1990.
- RAO, I.M., TERRY, N. Leaf phosphate status and photosynthesis *in vivo*: changes in sugar phosphates, adenylates and nicotinamide nucleotides during photosynthetic induction in sugar beet. **Photosynthetica**, v. 30, p. 243-254, 1994.
- RAO, I.M., TERRY, N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet IV. Changes with time following increased supply of phosphate to low-phosphate plants. **Plant Physiol.**, v. 107, p. 1313-1321, 1995.
- RAO, I.M. The role of phosphorus in photosynthesis. In: PESSARAKLI, M. (Ed.) **Handbook of photosynthesis**. New York, Marcel Dekker, 1997, p. 173-194.

- RODRÍGUEZ, D., ZUBILLAGA, M.M., PLOCHUK, E.L., KELTJENS, W.G., GOUDRIAAN, J., LAVADO, R.S. Leaf area expansion and assimilate production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) growing under low phosphorus conditions. **Plant and Soil**, v. 202, p.133-147, 1998.
- SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J., AYLING, S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiol.**, v. 116, n. 2, p. 447-461, 1998
- SILVA, D.M. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1998, 117 p.
- SIVAK, M.N., WALKER, D.A. Photosynthesis in vivo can be limited by phosphate supply. **New Phytol.**, v. 102, p. 499-512, 1986.
- SMILLIE, R.M., KROTKOV, G. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. **Can. J. Bot.**, v, 38, p. 31-49, 1960.
- SMIRNOFF, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: SMIRNOFF, N. (Ed). **Environment and plant metabolism flexibility and acclimation.** Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1995. p. 217-243.
- SNAPP, S.S., LYNCH, J.P. Phosphorus distribution and remobilization in bean plants as influenced by phosphorus nutrition. **Crop Sci.**, v. 36, p. 929-935, p. 1996.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 1998 **Plant Physiology**, 2nd ed., Sinauer Associates, Inc., Publishers, Massachusetts, 792 p.
- USUDA, H., SHIMOGAWARA, K. Phosphate deficiency in maize I. Leaf phosphate satatus, growth, photosynthesis and carbon partitioning. **Plant Cell Physiol.**, v. 32, p. 497-504, 1991.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE DO SISTEMA GS/GOGAT EM ALFAFA NODULADA EM RESPOSTA AO FÓSFORO

RESUMO

Este trabalho objetivou investigar o efeito do fósforo sobre a atividade do sistema GS/GOGAT em plantas de alfafa (*Medicago sativa* L. cv. Flórida 77) inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* estirpes BR 7408 e BR 7409. As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de fósforo em quatro concentrações correspondentes a 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³, sendo realizadas as mensurações nas plantas no estágio R8 (um a três nós com vagem verde). A atividade da GS nas folhas das plantas sob 0,02 mol m⁻³ foi 15, 20 e 45% menor em relação as obtidas sob as concentrações de 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³, respectivamente. Nos nódulos, essas diferenças foram ainda mais pronunciadas, sendo a maior atividade da GS obtida nas plantas supridas com 0,20 mol m⁻³, 101% superior à atividade obtida com 0,02 mol m⁻³. A maior atividade da NADH-GOGAT em folhas foi alcançada sob de 0,20 mol m⁻³ e representou um valor 6,2 vezes maior do que o encontrado sob a menor concentração. Nos nódulos, o aumento na concentração de 0,02 para 0,20 mol m⁻³ ocasionou acréscimos correspondentes a 52% na atividade da NADH-GOGAT. O fósforo sob a concentração de 0,02 mol m⁻³ afetou

significativamente a atividade das enzimas e, a suficiência do elemento foi atingida sob $0,10 \text{ mol m}^{-3}$. A atividade do sistema GS/GOGAT foi mais pronunciada sob a concentração de $0,20 \text{ mol m}^{-3}$ e, um aumento do fósforo para $1,00 \text{ mol m}^{-3}$ representou uma tendência de queda na atividade do sistema GS/GOGAT, o que poderia ser interpretado como um efeito fitotóxico do fósforo disponível nessa concentração.

1. INTRODUÇÃO

O elevado potencial de fixação do N_2 atmosférico da bactéria *Sinorhizobium meliloti* em associação mutualista com a planta de alfafa (*Medicago sativa*), praticamente torna desnecessária aplicação do nitrogênio do solo na cultura de alfafa. As estimativas do N_2 fixado variam de 50 a 463 kg de $N\ ha^{-1}\ ano^{-1}$, com média em torno de 200 kg de $N\ ha^{-1}\ ano^{-1}$ (VANCE e HEICHEL, 1991).

Na maioria das plantas, a assimilação do amônio em nitrogênio orgânico é resultado da atividade conjunta das enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT) (LEA et al., 1990). A GOGAT catalisa a transferência redutiva do grupamento δ -amino da glutamina à posição α -ceto do 2-oxoglutarato, resultando na formação de duas moléculas de glutamato. A GS, enzima chave na assimilação do amônio em aminoácidos, catalisa a incorporação do NH_4^+ ao glutamato, formando a glutamina (SAGI et al., 1998).

As plantas contém duas classes de GS, uma no citossol e outra em plastídios de raízes ou nos cloroplastos das folhas. As formas citossólicas são expressas em sementes em germinação ou em tecidos vasculares e produzem glutamina para o transporte intracelular de nitrogênio. As formas que ocorrem nos plastídios radiculares incorporam o nitrogênio em forma de amidas para serem utilizadas na própria célula em que são produzidas, enquanto a GS, nos cloroplastos das hastes, tem a função de reassimilar o NH_4^+ fotorrespirado (LAM et al., 1996).

Em plantas superiores, tanto a sintase do glutamato-dependente de NADH (NADH-GOGAT) quanto a sintase do glutamato-dependente de ferredoxina (Fd-GOGAT) têm ampla distribuição nos tecidos. A NADH-GOGAT é considerada a forma mais importante nos nódulos de plantas de tremoço (BENNY e BOLAND, 1977), de feijão (CHEN e CULLIMORE, 1988) e de alfafa (ANDERSON et al., 1989). Nos nódulos, os bacteróides fazem a redução do N_2 a NH_4^+ , o qual é liberado no citosol da célula infectada, sendo, posteriormente, assimilado pela ação combinada da GS e GOGAT (TREPP et al., 1999).

Condições de deficiência de fosfato podem levar à redução da eficiência de utilização de carboidratos, causando um decréscimo na fosforilação oxidativa nas células nodulares e uma diminuição na concentração de ATP (SÁ e ISRAEL, 1991). O déficit de fósforo pode afetar a iniciação, o desenvolvimento e o funcionamento dos nódulos, bem como o crescimento da planta hospedeira (RIBET e DREVON, 1995). A supressão de fosfato leva a redução dos teores de ureídeos em soja, provavelmente em razão da redução na atividade da nitrogenase e do sistema GS/GOGAT (SILVA, 1998) e, também, dos teores de aminoácidos em alfafa (GOMES, 1999), como um possível resultado da baixa atividade da nitrogenase ou das enzimas de assimilação.

O presente estudo objetivou investigar os efeitos de concentrações de fósforo sobre a atividade do sistema GS/GOGAT durante o estágio R8 de plantas de alfafa cv. Flórida 77, inoculadas com *Sinorhizobium meliloti*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

Foram utilizadas sementes de alfafa, *Medicago sativa* (L.), cv. Flórida 77, cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite – EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG.

Procedeu-se a desinfestação prévia das sementes de alfafa, mediante a imersão em etanol 70%, durante 1 minuto, seguida de cinco lavagens em água destilada esterilizada. Após a desinfestação, as sementes foram germinadas em bandejas plásticas contendo areia lavada e autoclavada (1 hora, 20°C), a uma profundidade aproximada de 5 mm, sendo o meio mantido úmido com água destilada. Após a germinação, as plântulas não receberam qualquer solução nutritiva até atingirem o estágio de desenvolvimento V2 (Tabela 1). Nesse estágio, elas foram retiradas do substrato, suas raízes lavadas em água destilada e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho. Em seguida, foi efetuada a inoculação das plantas no meio de cultura contendo o inóculo de *Sinorhizobium meliloti*.

No preparo do meio de cultura, foram utilizadas duas estirpes de *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 e BR 7409, cultivadas separadamente em frascos Erlenmeyer com 50 mL de meio de extrato de levedura e manitol, pH 6,5 à 29 °C, até atingirem a densidade ótica correspondente a 10⁸ células mL⁻¹. Após o crescimento, as estirpes foram misturadas para a imediata inoculação.

Tabela 1 – Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de alfafa, *Medicago sativa* (L.)

Estádio	Definição ¹
V0	Abertura total dos cotilédones;
V2	Folha trifoliolada completamente desenvolvida no nó acima do nó das folhas unifolioladas;
V3	Folhas completamente desenvolvidas no 5º nó acima do nó das folhas unifolioladas;
V4	Folhas completamente desenvolvidas no 7º nó acima do nó das folhas unifolioladas;
R6	Um nó com uma flor aberta;
R8	Um a três nós com vagem verde;

¹ Adaptada da descrição de KALU e FICK (1981).

As plantas inoculadas foram transferidas para vasos de isopor revestidos internamente com sacos de polietileno, com capacidade para 5 L, contendo solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1939), meia força, modificada (Tabela 2). O pH foi mantido em $6,0 \pm 0,3$ com ajustes diários, e a solução nutritiva renovada com base no consumo do potássio (mínimo de 35% da concentração inicial).

O experimento constituiu-se de quatro tratamentos com a aplicação de fósforo na solução nutritiva correspondendo a: 0,02, 0,10, 0,20 e 1,00 mol m⁻³. Toda a fase experimental foi conduzida durante os meses de fevereiro a julho de 2000, em Viçosa, MG (altitude 650 m, latitude 20,45⁰S). As plantas estiveram expostas à condições de luz, temperatura e comprimento do dia natural, em casa de vegetação pertencente a Unidade de Crescimento de Plantas do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, MG.

Tabela 2 – Composição química da solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1939), meia força, modificada

Elemento	Concentração (mol m ⁻³)	Elemento	Concentração (mmol m ⁻³)
K	3,00	Mn	18,00
Ca	3,00	B	46,00
Mg	1,00	Zn	1,50
P ¹	0,02 –1,00	Cu	0,30
S	2,00	Mo	0,60
Cl	6,26-7,00	Fe	38,00
N ²	0,70	Co ³	0,75

¹Na forma de KH₂PO₄, cuja concentração foi variável conforme o tratamento imposto.

²Na forma de NH₄NO₃ (0,1 mol m³) e KNO₃ (0,6 mol m³), durante a primeira semana de crescimento.

³O CoCl₂ foi suprimido da solução nutritiva na terceira semana de crescimento.

2.2. Preparo do extrato enzimático

Os efeitos do fósforo sobre a atividade do sistema GS/GOGAT foi analisado em plantas de alfafa no estágio R8 (Tabela 1).

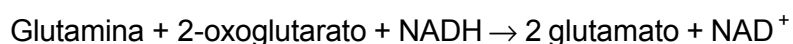
As enzimas foram extraídas macerando-se os tecidos em tampão de extração segundo (HAUSLER et al., 1994), com a seguinte composição: tampão TRIS-HCL 100 mol m⁻³ (pH 7,8), MgSO₄ 10 mol m⁻³, KCl 100 mol m⁻³, DTT 1 mol m⁻³, β-mercaptoetanol 1 % (v/v), EDTA 1 mol m⁻³, Triton X-100 0,5 %, glicerol 20 % (v/v). Foi utilizada uma relação de 4 mL de tampão de extração por grama de tecido, folhas ou nódulos, que foram macerados em graal com pistilo previamente resfriados. A temperatura de extração foi mantida próxima de 4°C, utilizando-se banho de gelo. O homogenato assim obtido foi centrifugado a 15.000 g, por 15 minutos, a 4°C. Alíquotas do sobrenadante foram imediatamente utilizadas para as avaliações de atividade enzimática.

2.3. Determinação da atividade da GS

A atividade da sintetase da glutamina foi determinada pela formação de γ -glutamilhdroxamato e quantificada com cloreto férrico acidificado. O ensaio foi realizado segundo RHODES et al. (1975), modificado por TONIN (1988) e JUNGHANS e MOSQUIM (1995). Uma alíquota de 0,05 mL do extrato foi acrescentada à solução constituída de ATP 6,25 mol m⁻³; MgSO₄ 45 mol m⁻³; hidroxilamina-HCl 6,25 mol m⁻³; glutamato 93,75 mol m⁻³; tampão TRIS 100 mol m⁻³ (pH 7,2), em volume final de 3,2 mL. O meio de reação foi incubado em banho-maria, a 30°C. Após 20 minutos, foram retiradas alíquotas de 0,8 mL, adicionando-se a cada uma 1,2 mL de reagente constituído por uma mistura de ácido tricloroacético 0,20 mol m⁻³ e FeCl₃ 0,37 mol m⁻³, diluídos em HCl 0,67 mol m⁻³. As proteínas foram removidas por centrifugação a 10000 g, por 5 minutos e a absorvância no sobrenadante foi medida espectrofotometricamente a 540 nm em leitora de placa de Elisa (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). O branco foi constituído da mistura acima, exceto o glutamato. Uma curva de calibração foi elaborada usando-se γ -glutamilhdroxamato como padrão, com concentrações até 1,0 μ mol m⁻³.

2.4. Determinação da atividade da NADH-GOGAT

A atividade da sintase do glutamato dependente de NADH foi quantificada pela medida de NADH consumido, segundo a reação:



O ensaio foi realizado seguindo-se o método proposto por RHODES et al. (1975), modificado por TONIN (1988) e JUNGHANS e MOSQUIM (1995), com alíquota de 0,15 mL de extrato enzimático, glutamina 5 mol m⁻³, 2-oxoglutarato 5 mol m⁻³, NADH 0,1 mol m⁻³ e tampão TRIS-HCL 50 mol m⁻³ (pH 7,5), em volume final de 3,0 mL. O meio de reação foi incubado em banho maria, a 30°C, com as leituras sendo efetuadas automaticamente a cada 60 segundos, por 5 minutos em leitora de placa de Elisa (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, USA), no comprimento de onda 340 nm. O branco foi constituído da mistura acima, menos a glutamina.

2.5. Delineamento experimental e análise estatística

Cada repetição foi constituída por um vaso com duas plantas, sendo quatro as repetições de cada tratamento, e dispostas em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos a análise de variância em nível de 5% de significância, pelo teste F.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade do sistema GS/GOGAT

O fósforo fornecido em solução nutritiva influenciou significativamente ($P \leq 0,01$) a atividade da GS (Figura 1) em folhas e nódulos.

A atividade da GS nos nódulos foi maior do que nas folhas (Figura 1). A grande diferença entre a atividade da GS nos nódulos em relação a GS das folhas, durante os estádios reprodutivos, é um indicativo de que, nesses estádios, em que o processo de fixação do N_2 é mais intenso, a maior parte do nitrogênio biologicamente fixado é incorporada rapidamente em compostos orgânicos ou esqueletos carbônicos nas células nodulares, sendo os produtos dessa assimilação translocados para as flores e os frutos (GOMES, 1999).

O aumento do nível de fósforo na solução nutritiva promoveu incrementos na atividade da GS, em que a atividade observada nas folhas das plantas cultivadas em solução nutritiva com $0,02 \text{ mol m}^{-3}$ esteve entre 68 a 87% das atividades observadas nas folhas das plantas cultivadas nas outras concentrações. Em plantas de feijão cultivadas em fósforo e baixas concentrações, houve um aumento do número de nódulos inativos em relação a nódulos vermelhos (PEREIRA e BLISS, 1987). Nesse contexto, uma redução na atividade da GS em plantas de alfafa no estágio R8 pode ter sido

influenciada pelo aumento no número de nódulos ineficientes na fixação do N₂ atmosférico (GOMES, 1999).

A atividade da GS observada nos nódulos sob 0,02 mol m⁻³ foi significativamente menor do que as observadas sob as demais concentrações, sendo a suficiência do elemento obtida sob concentração de 0,10 mol m⁻³ (Figura 1). Em relação as folhas, a atividade obtida sob 0,02 mol m⁻³ só foi significativamente menor em relação a obtida sob 1,00 mol m⁻³ (Figura 1).

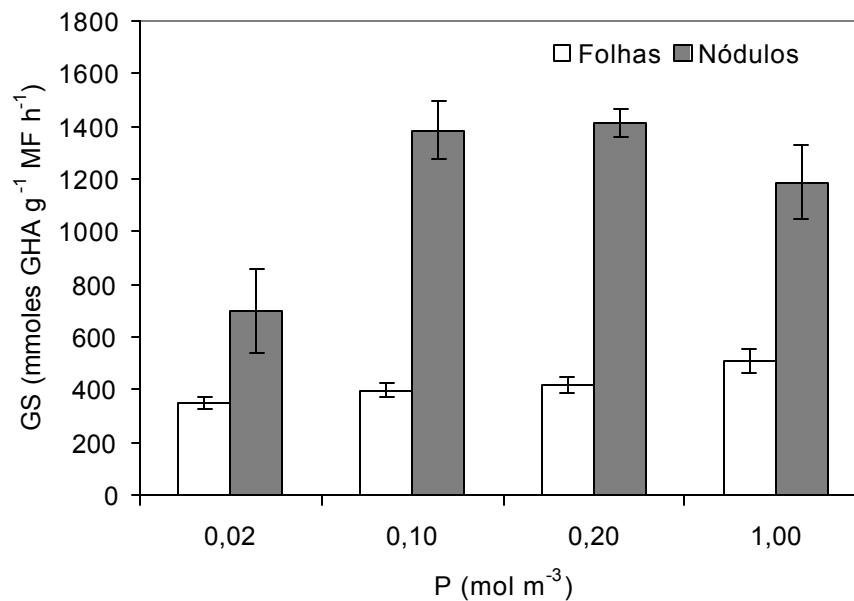


Figura 1 – Atividade da sintetase da glutamina (GS) em folhas e nódulos de plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A análise de variância revelou que a atividade da NADH-GOGAT (Figura 2) foi significativamente influenciada ($P \leq 0,01$) pelas concentrações de fósforo.

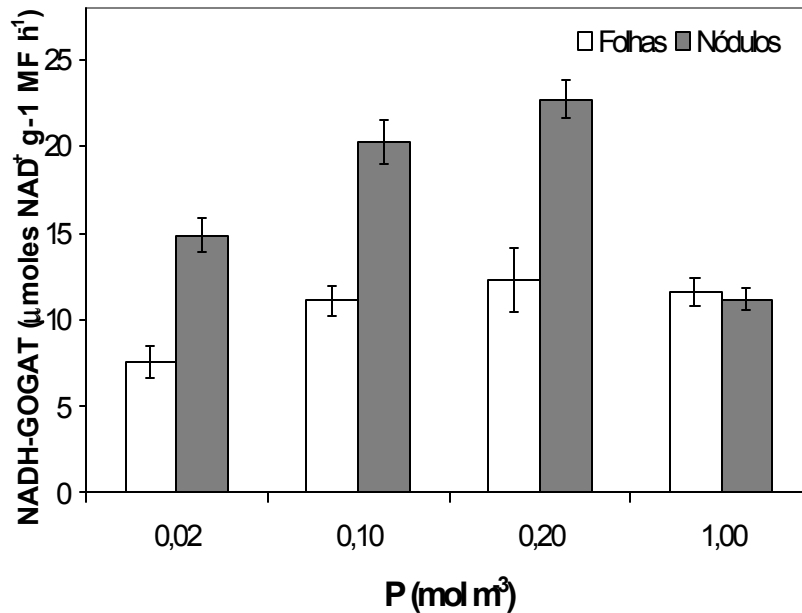


Figura 2 – Atividade da sintase do glutamato-dependente de NADH (NADH-GOGAT) na massa fresca (MF) de folhas e nódulos de plantas de alfafa no estágio R8, em função do fósforo (P) em diferentes concentrações na solução nutritiva. Cada coluna corresponde à média de quatro repetições e as barras indicam o desvio padrão da média.

A atividade da NADH-GOGAT nos nódulos foi superior à obtida nas folhas (Figura 2). ANDERSON et al. (1989) cita que a atividade da NADH-GOGAT em folhas de alfafa é baixa, sendo aquela praticamente restrita aos nódulos. Nesse contexto, VANCE et al. (1995) infere que a principal forma de GOGAT existente nos nódulos é a dependente de NADH.

A atividade da NADH-GOGAT observada nas folhas das plantas sob 0,02 mol m⁻³ representou de 61 a 67% das observadas sob as demais concentrações, e foi mais pronunciada nas plantas que cresceram sob 0,20 mol m⁻³. Nos nódulos, a atividade da NADH-GOGAT obtida sob 0,02 e 1,00 mol m⁻³ foram de 14,86 e 11,14 µmoles NAD⁺ g MF⁻¹, respectivamente, valores significativamente menores do que os obtidos sob as concentrações de fósforo de 0,10 e 0,20 mol m⁻³.

O efeito do déficit de fósforo sobre a atividade do sistema GS/GOGAT pode ocorrer em função de uma diminuição na atividade da nitrogenase (YUPANQUI, 1997; SILVA, 1998), limitando o substrato para GS/GOGAT. A diminuição na atividade da nitrogenase pode decorrer por um decréscimo nas taxas fotossintéticas, pois a nitrogenase necessita de compostos carbonados e de energia proveniente da fotossíntese (SILVA, 1998).

A baixa disponibilidade de fósforo poderia ter influenciado de maneira indireta a atividade do sistema GS/GOGAT, diminuindo as taxas fotossintéticas (Capítulo II, Figura 12), o que limitaria a atividade da nitrogenase e, conseqüentemente a disponibilidade de substrato para a GS/GOGAT.

A atividade da NADH-GOGAT, tanto nos nódulos como nas folhas, mostrou-se mais pronunciada sob $0,20 \text{ mol m}^{-3}$, e um aumento na concentração de fósforo refletiu-se em uma tendência de queda na atividade dessa enzima. Assim, poder-se-ia sugerir que o fósforo disponível sob a concentração de $1,00 \text{ mol m}^{-3}$ estaria causando fitotoxidez, a qual estaria sendo refletida no decréscimo da atividade da NADH-GOGAT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M.P., VANCE, C.P., HEICHEL, G.H., MILLER, S.S. Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. **Plant Physiol.**, v. 90, p. 351-358, 1989.
- BENNY, A.G., BOLAND, M.J. Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. **Eur. J. Biochem.**, v. 79, p. 355-362, 1977.
- CHEN, F.L., CULLIMORE, J.V. Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L.: Purification properties and changes during development. **Plant Physiol.**, v. 88, p. 1411-1417, 1988.
- GOMES, F.T. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob supressão e ressuprimento de fosfato.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1999, 100 p.
- HAUSLER, R.E., BLACKWELL, R.D., LEA, P.J., LEEGOOD, R.C. Control of photosynthesis in barley leaves with reduced activities of glutamine synthetase or glutamate synthase. I. Plant characteristics and changes in nitrate, ammonium and amino acids. **Planta**, v. 194, p. 406-417, 1994.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. Berkeley, California, **Agricultural Experimental Station.** (Circular 347), 39p. 1939.
- JUNGHANS, T.G., MOSQUIM, P.R. Atividade da sintetase da glutamina e sintase do glutamato em explantes de frutos de soja sob diferentes fontes de nitrogênio. **Rer. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 7, p. 67-74, 1995.

- KALU, B.A. FICK, G.W. Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. **Crop Sci.**, v. 21, p. 267-271, 1981.
- LAM, H-M., COSCHIGANO, K.T., OLIVEIRA, I.C., MELO-OLIVEIRA, R., CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 47, p. 569-593, 1996.
- LEA, P.J. BLACKWELL, R.D. CHEN, F. HECHT, U. Enzymes of ammonia assimilation. – In: LEA, P.J. (ed): **Methods in Plant Biochemistry.** v. 3, p. 257-276. Academic Press, London 1990.
- PEREIRA, P.A.A., BLISS, F.A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. **Plant Soil**, v. 104, p. 79-84, 1987.
- RHODES, D., RENDON, G.A., STEWART, G.R. The control of glutamine synthetase level in *Lemna minor* (L). **Planta**, v. 125, p. 201-211, 1975.
- RIBET, J., DREVON, J.J. Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline in nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **J. Exp. Bot.**, v. 46, p. 1479-1486, 1995.
- SAGI, M., DOVRAT, A., KIPNIS, T., LIPS, H. Nitrate reductase, phosphoenolpyruvate carboxylase, and glutamine synthase in annual ryegrass as affected by salinity and nitrogen. **J. Plant Nutr.**, v. 21, p. 707-723, 1998.
- SÁ, T.M., ISRAEL, D.W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. **Plant Physiol.**, v. 97, p. 928-935, 1991.
- SILVA, D.M. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1998, 117 p.
- TONIN, G.S. **Influência da fonte de nitrogênio na atividade de enzimas envolvidas no processo de assimilação de amidas e ureídeos em cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura.** Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, 1988, 149 p.
- TREPP, G.B., PLANK, D.W., GANTT, J.S., VANCE, C.P. NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Immunocytochemical localization. **Plant Physiol.**, v. 119, p. 828-838, 1999.
- VANCE, C.P., HEICHEL, G.H. Carbon in N₂ fixation: Limitation or exquisite adaptation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 373-392, 1991.

VANCE, C.P., MILLER, S.S., GREGERSON, R.G., SAMAC, D.A., ROBINSON, D.L., GANTT, J.S. Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. **Plant J.**, v. 8, p. 345-358, 1995.

YUPANQUI, F.F.R. **Nutrição fosfatada e fotossíntese no sistema simbiótico *Medicago sativa-Rhizobium meliloti* em solos com diferentes disponibilidades de fósforo.** Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 1997, 124p.

CONCLUSÕES GERAIS

O crescimento da alfafa 'Flórida 77' foi drasticamente limitado nas plantas sob a concentração de fósforo de $0,02 \text{ mol m}^{-3}$; nessa concentração, o fósforo interferiu na partição de fotoassimilados entre a parte aérea e as raízes, resultando em uma relação entre massa seca de raízes e parte aérea maior. Houve uma tendência de queda na massa seca e na área foliar quando se aumentou a concentração de fósforo acima de $0,20 \text{ mol m}^{-3}$, o que sugere que o fósforo fornecido à concentração de $1,00 \text{ mol m}^{-3}$ estaria sendo fitotóxico ou interferindo na disponibilidade de outros elementos minerais.

A deficiência de fósforo não provocou limitação da fotossíntese pela via estomática. Os decréscimos na eficiência fotoquímica do FSII e na distribuição de energia no complexo coletor de luz do FSII nas plantas expostas a $0,02 \text{ mol P m}^{-3}$ seriam um indicativo de que a deficiência de fósforo interferiu na etapa fotoquímica da fotossíntese, levando a um decréscimo na assimilação líquida de CO_2 nas plantas expostas à menor concentração de fósforo.

A atividade do sistema GS/GOGAT foi negativamente afetada pelo tratamento com fósforo na concentração de $0,02 \text{ mol m}^{-3}$ e mais pronunciada sob a concentração de $0,20 \text{ mol m}^{-3}$, sendo que um aumento do fósforo para $1,00 \text{ mol m}^{-3}$ representou uma tendência de queda na atividade dessas enzimas, o que poderia ser interpretado como um efeito fitotóxico do fósforo, previamente constatado mediante as análises de crescimento.

