

ÁVILA MARIA BASTOS SANTOS FEITOSA

TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA E CRESCIMENTO
DE ALFAFA EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO, AO pH E À RELAÇÃO
CÁLCIO:MAGNÉSIO

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

ÁVILA MARIA BASTOS SANTOS FEITOSA

TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA E CRESCIMENTO
DE ALFAFA EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO, AO pH E À RELAÇÃO
CÁLCIO:MAGNÉSIO

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

APROVADA EM: 19 de abril de 2002.

Prof^a Maria Catarina Megumi Kasuya
(Conselheira)

Prof. Paulo Roberto Mosquim

Dr. Ivo Ribeiro da Silva

Prof. Júlio César Lima Neves

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Orientador)

Ao meu filho Vinícius.

Aos meus pais Evilásio e Maria de Lourdes.

Aos meus irmãos Evilmária, Amauri, Lívio, Andyna e Orley.

Ao meu esposo Elitônio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, mostrando o seu amor ao colocar no mundo pessoas com quem tive o privilégio de conviver, as quais estavam sempre presentes, com muita dedicação e entusiasmo.

À minha inspiração de vida, o meu filho Vinícius, por dar-me o ar que respiro; o meu muito obrigado e o meu pedido de perdão pela minha ausência durante esses dois anos.

Ao meu pai Evilásio, à minha mãe Maria de Lourdes e aos meus irmãos, pelos incentivos constantes durante a minha vida.

Ao meu esposo Elitônio, pelo carinho, pela compreensão e, principalmente, pela paciência.

Aos meus amigos Antônio Feitosa, Maria Eliane e Talita, pelo carinho e pela dedicação.

Ao Professor Chaer, pelo crédito, pela liberdade e pelo direcionamento prático e teórico desta pesquisa.

Aos Professores Catarina e Tótola, pelos ensinamentos em sala de aula e no laboratório.

Ao Dr. Ivo, pelo auxílio durante todo o experimento.

Ao Professor Carlos Martinez, pelos ensinamentos.

Ao Rodrigo, pela ajuda constante, pelas alegrias durante esses dois anos e, principalmente, pela grande amizade.

Ao Professor Júlio César, pela ajuda e pelas sugestões.

Ao Professor Paulo Mosquim, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

Às minhas amigas Selma e Marciana, pelos incentivos constantes e pelo agradável convívio.

Ao meu amigo Maurício, pelo grande auxílio e pela dedicação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos conhecimentos e pelo agradável convívio.

Às Secretárias do Departamento de Microbiologia Aparecida, Laura e Nilcéia, pela cooperação.

Aos meus colegas dos Laboratórios de Associações Micorrizas, Fisiologia, Genética e Ambiental Adão, Adalberto, Adriano, Ann, Chelen, Carlos, Daniele, Francilina, Galvão, Juliana, Kledma, Kely, Marlon, Olinto, Tânia, Vanessa e Zeca, pela colaboração.

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal Allan, Carlos, João e Rogério, pelas alegrias.

Às minhas amigas de república Geovania, Beth, Alice, Roberta e Patrícia, pelo agradável convívio.

Às minhas amigas maranhenses Maria da Cruz, pelo apoio; Denise, pela receptividade; e Arsênia, mesmo ausente, pela demonstração de carinho com palavras de estímulo.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Programa.

A todas as pessoas que, de alguma forma, colaboram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ÁVILA MARIA BASTOS SANTOS FEITOSA, filha de Evilásio de Moura Santos e Maria de Lourdes Bastos Santos, nasceu no dia 2 de outubro de 1972, em Alto Parnaíba, Maranhão.

Em fevereiro de 1992, concluiu o segundo grau no Colégio Seleção, em São Luís, MA.

Em março de 1992, ingressou no Curso de Agronomia da Universidade Estadual do Maranhão, em São Luís, MA, graduando-se em setembro de 1997.

Em fevereiro de 2000, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, na linha de pesquisa de Fixação Biológica de N₂, submetendo-se à defesa de tese em abril de 2002.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO I	5
TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA E CRESCIMENTO DE ALFAFA EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO E À RELAÇÃO CÁLCIO:MAGNÉSIO	5
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	8
2.2. Preparo do inóculo	9
2.3. Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos	10
2.4. Determinação da massa seca	10
2.5. Teor de nitrogênio no trifólio	11
2.6. Trocas gasosas	11
2.7. Fluorescência da clorofila	11
2.8. Medição indireta da clorofila	12
2.9. Análises estatísticas	12

	Página
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. Crescimento	14
3.2. Teores de nitrogênio no trifólio	16
3.3. Trocas gasosas	16
3.3.1. Taxa fotossintética líquida (A) e concentração interna de CO ₂ .	16
3.3.2. Condutância estomática (gs)	20
3.3.3. Relação Ci/Ca	20
3.4. Fluorescência da clorofila	21
3.5. Medição indireta da clorofila	23
4. RESUMO E CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
CAPÍTULO II	33
CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM ALFAFA NODULADA, EM RESPOSTA AO pH E À RELAÇÃO CÁLCIO:MAGNÉSIO	33
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	36
2.2. Preparo do inóculo	37
2.3. Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos	38
2.4. Determinação da massa seca da planta e dos nódulos	38
2.5. Teor de nitrogênio no trifólio	39
2.6. Trocas gasosas	39
2.7. Variáveis de fluorescência rápida	39
2.8. Medição indireta da clorofila	40
2.9. Análises estatísticas	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1. Crescimento	41
3.2. Teores de nitrogênio no trifólio	43
3.3. Trocas gasosas	44
3.3.1. Taxa fotossintética líquida (A) e concentração interna de CO ₂ .	44
3.3.2. Condutância estomática (gs)	47

	Página
3.3.3. Relação Ci/Ca	48
3.4. Fluorescência da clorofila	49
3.5. Medição indireta da clorofila	49
4. RESUMO E CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
APÊNDICE	57
APÊNDICE A	58

RESUMO

FEITOSA, Ávila Maria Bastos Santos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila e crescimento de alfafa em resposta ao alumínio, ao pH e à relação cálcio:magnésio.** Orientador: Arnaldo Chaer Borges. Conselheiros: Maria Catarina Megumi Kasuya e Marcos Rogério Tótola.

Este trabalho teve como objetivo o estudo dos efeitos do alumínio, do pH e da relação Ca:Mg sobre o crescimento, as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila em alfafa no estágio de desenvolvimento R6 (um nó com uma flor aberta). No primeiro experimento, utilizou-se o fatorial completo 4 x 2 x 2, sendo quatro relações Ca:Mg (100:0, 75:25, 50:50 e 25:75), duas concentrações de Al (0 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e duas fontes de nitrogênio (simbiótico ou mineral) na solução nutritiva a pH 4,5. No segundo, utilizou-se um fatorial completo 4 x 2, sendo quatro relações Ca:Mg e dois valores de pH (5,0 e 6,0). Nos dois experimentos, as raízes das plantas foram inoculadas com a mistura das estirpes de *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 e BR 7409, sendo o Ca e o Mg adicionados na forma de sulfato. As plantas cultivadas com N simbiótico, na presença ou ausência do alumínio, apresentaram baixo desenvolvimento e ausência de nodulação, seguida de morte. Tal fato foi atribuído à atividade do íon hidrogênio. Os efeitos específicos das relações em mitigar a toxicidade da acidez e do alumínio foram comprovados pelo aumento na massa seca, na

nodulação, na taxa fotossintética, na condutância estomática e na intensidade de coloração verde das plantas correspondentes ao tratamento com relação 75:25. A deficiência de magnésio nas plantas, na relação 100:0, induziu a limitações no crescimento, na taxa fotossintética por unidade de área foliar, na condutância estomática e na captura e transferência de energia pelo complexo antena. Os resultados evidenciaram que, quando prevalece a condição de acidez, há maior demanda de cálcio em relação à de magnésio para mitigar os efeitos tóxicos da acidez e do alumínio.

ABSTRACT

FEITOSA, Ávila Maria Bastos Santos, M. S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2002. **Gas exchange, and chlorophyll fluorescence and growth of alfalfa in response to aluminum, pH, and Ca:Mg ratios.** Adviser: Arnaldo Chaer Borges. Committee members: Maria Catarina Megumi Kasuya and Marcos Rogério Tótola.

The objective of this work was to study the effects of aluminum, pH and Ca:Mg ratios on the growth, mineral composition, gas exchange, and chlorophyll fluorescence of alfalfa at the R6 developmental stage (plants presenting a knot with an open flower). In the first experiment, a complete 4 x 2 x 2 factorial design with four Ca:Mg ratios (100:0; 75:25; 50:50; 25:75), two aluminum concentrations (0 and 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), and two nitrogen sources (symbiotic and mineral), in a nutrient solution with the pH adjusted to 4.5, was used. In a second experiment, a complete 4 x 2 factorial design was adopted with the four Ca:Mg ratios above and two pH values (5.0 and 6.0). In the two experiments, the plant roots were inoculated with a mixture of strains of *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 and BR 7409, while Ca and Mg were supplied as sulfate. The plants cultivated with symbiotic N, either in the presence or absence of aluminum, presented reduced development, did not formed nodules, and eventually died. This was attributed to the activity of hydrogen ions. The specific effects of Ca:Mg ratios in alleviating pH and aluminum toxicities were

confirmed by the significant increase in dry matter production, nodulation, photosynthetic rates per unit of leaf area, stomatal conductance and intensity of the green coloration of leaves of plants grown at the 75:25 Ca:Mg ratio. Magnesium deficiency in the plants grown in the nutrient solution with a Ca:Mg ratio of 100:0 reduced plant growth, photosynthetic rates per unit of leaf area, stomatal conductance, and the capture and transfer of energy. These results demonstrate that, under acidity conditions, there is a greater demand for Ca to mitigate the toxic effects of acidity and aluminum.

INTRODUÇÃO

A alfafa (*Medicago sativa* L.) é a leguminosa perene considerada a “rainha das forrageiras”, por ser rica em proteínas, cálcio, fósforo e vitaminas (A, B₁, B₂, C, E e K) e por suas características de palatabilidade e digestibilidade para alimentação animal (NUERNBERG et al., 1992). No Brasil, o seu cultivo está concentrado na Região Sul, porém já foi relatada a sua adaptação a condições tropicais. Ela se desenvolve melhor em solos profundos, permeáveis, bem drenados e férteis, com altos teores de cálcio e fósforo e pH próximo à neutralidade (NUERNBERG et al., 1992).

O nitrogênio para a alfafa pode ser suprido por *Sinorhizobium meliloti*, bactéria que, em associação mutualista, pode fixar o N₂ atmosférico em quantidades que correspondem a 50 a 463 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹, em média de 200 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹ (HANSON et al., 1988). A planta nessa associação provê os carboidratos necessários aos processos metabólicos da bactéria, além da formação e manutenção da estrutura nodular. A assimilação do CO₂ fotossintético pela folha é afetada por fatores nutricionais, ambientais e fisiológicos da planta (CAEMMERER e FARQUHAR, 1981). Os balanços de carbono e nitrogênio na planta são mutuamente coordenados (OSAKI et al., 1992). A deficiência de nitrogênio induz a modificações de características morfológicas e fisiológicas, a exemplo de limitações no crescimento, no número de folhas, na área foliar, no conteúdo de clorofila por unidade de área foliar, na taxa de transporte de elétrons, na assimilação de CO₂ e na condutância

estomática (EVANS e TERASHIMA, 1988; CIOMPI et al., 1996; YEN et al., 2000).

A acidez do solo é um dos principais fatores limitantes do crescimento de *M. sativa* (RECHCIGL et al., 1986). Em razão da sensibilidade da alfafa e da referida bactéria à acidez do solo, o seu cultivo em solos que apresentam problemas de acidez, acompanhados de baixa saturação de bases e altos teores de alumínio (REICHARDT, 1981), só é possível após a aplicação de calcário, o que elimina os efeitos adversos da acidez e supre as exigências de cálcio e magnésio da planta e bactéria.

Os calcários calcíticos ou dolomíticos, quando aplicados a um mesmo solo com frequência, podem afetar a relação Ca:Mg deste (FASSBENDER e BORNEMISZA, 1994). Dessa forma, os teores de cálcio e magnésio trocáveis existentes no solo devem ser considerados no cálculo da quantidade de calcário a ser adicionado ao solo para atender, também, às exigências da planta e da bactéria com relação a esses elementos. A quantidade de calcário e as relações Ca:Mg do corretivo influem no desenvolvimento e nas trocas gasosas da alfafa e podem contribuir para mitigar os efeitos da presença do alumínio tóxico e da acidez em solos.

Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos da concentração de alumínio e do pH da solução nutritiva sobre crescimento, trocas gasosas e fluorescência da clorofila da alfafa crescida em diferentes relações Ca:Mg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAEMMERER, S. V.; FARQUHAR, G. D. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. **Planta**, v.153, p. 376-387, 1981.

CIOMPI, S.; GENTILI, E.; GUIDI, L.; SOLDATINI, G. F. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. **Plant. Sci.**, v. 118, p. 177-184, 1996.

EVANS, J. R.; TERASHIMA, I. Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. **Aust. J. Plant Physiol.**, v 14, p. 281-292, 1987.

FASSBENDER, H. W.; BORNEMISZA, E. **Química del suelos com ênfases em suelos de América Latina**. San José: IICA, 1994. 420 p.

HANSON, A. A.; BARNES, D. K.; HILL Jr., R. R. **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: ASA/CSSA/SSSA Inc. Publishers, 1988. 1084 p. (Agronomy, n. 29).

NUERNBERG, N. J.; MILAN, P. A.; SILVEIRA, C. A. **Manual de produção de alfafa**. Florianópolis: EPAGRI, 1992. 102 p.

OSAKI, M.; SHIMANO, T.; TADANA, T. Carbon-nitrogen interaction in field crop production. **Soil Sci. Plant. Nutr.**, v. 38, p. 553-564, 1992.

REHCIGAL, J. E.; RENEAU JÚNIOR, R. B.; WOLF, D. D.; KROONTJE, W.; van SCOYOC, S.W. Alfalfa seedling growth in nutrient solutions as influenced by aluminum, calcium and pH. **Commun. Soil Plant Anal.**, v. 17, p 27-44, 1986.

REICHARDT, K. Soil physico-chemical conditions and the development of roots. In: RUSSEL, R. S.; IGUE, K.; MEHTHA, Y.R. **The soil-root system in relation to brazilian agriculture**. Londrina: IAPAR, 1981. p. 103-114.

YEN, D. M.; LIN, L.; WRIGHT, C. J. Effects of mineral nutrition deficiencies on leaf development, visual symptoms and shoot-root ratio of *Spathiphyllum*. **Scientia Hort.**, v. 86, p. 223-233, 2000.

CAPÍTULO I

TROCAS GASOSAS, FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA E CRESCIMENTO DE ALFAFA EM RESPOSTA AO ALUMÍNIO E À RELAÇÃO CÁLCIO:MAGNÉSIO

1. INTRODUÇÃO

O alumínio trocável, importante componente da acidez potencial do solo, pode induzir reduções na absorção e na translocação de fósforo, cálcio e magnésio em plantas e, conseqüentemente, diminuir a produtividade das culturas (SILVA, 1984; KELTJENS e TAN, 1993; ANDREW et al., 1973). Ele exerce efeitos tóxicos sobre o crescimento dos vegetais, notadamente sobre o sistema radicular, o qual fica constituído raízes grossas e quebradiças e com crescimento reduzido, coloração marrom e menor ramificação (FOY, 1992). Esses efeitos são causados por alterações na permeabilidade da membrana, ou seja, por mudanças na fluidez dos lipídios e na densidade de empacotamento, resultantes da ligação eletrostática de espécies catiônicas de alumínio a regiões polares dos fosfolipídios ou da interação com proteínas da membrana (RENGEL, 1996). A presença desse elemento pode também bloquear os canais de Ca na membrana plasmática e impedir a ligação do Mg às proteínas transportadoras (RENGEL, 1992; RENGEL e ROBISON, 1989; HUANG et al., 1992). A inibição do influxo de Ca^{+2} para o interior da célula,

provocado pelo alumínio, precede os sintomas visíveis de toxicidade desse elemento. Os canais de Ca^{+2} são muito sensíveis à presença do alumínio, que deve bloquear os canais presentes na membrana plasmática de células da raiz, assumindo um papel marcante nesse processo de toxicidade (JONES et al., 1998). Esse cátion também é conhecido por causar mudanças severas e irreversíveis na parede celular. A lignificação induzida por alumínio também está intimamente relacionada à inibição do alongamento celular (SASAKI et al., 1996).

O fluxo de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais pode ser afetado pela presença do alumínio, em razão da possível interferência nos processos de oxidação de substratos que doam elétrons no processo respiratório (LIMA e COPELAND, 1994). Esse elemento pode induzir também uma redução pronunciada nas taxas de atividades do fotossistema II e no conteúdo de citocromo b por unidade de clorofila, além da redução nos conteúdos de caroteno (LINDON et al., 1997). Em cultivares de trigo, o estresse causado pelo alumínio promove alteração no fotofuncionamento do tilacóide, pois inibe parcialmente o transporte de elétrons no fotossistema II e nas proximidades do seu centro de reação, principalmente na variedade sensível (MOUSTAKAS et al., 1995).

O efeito danoso do alumínio, para oito espécies de dicotiledôneas, pode ser aliviado pelo aumento da concentração de cálcio em solução nutritiva (KELTJENS e TAN, 1993). Em solos, esse efeito já havia sido atribuído ao fornecimento de bases, as quais diminuem a atividade e a saturação de Al no complexo de troca do solo (SOLERA, 1988). O aumento da concentração desse cátion no ambiente radicular pode aliviar a toxicidade do alumínio por diminuir, por competição, a adsorção do Al à plasmalema e por elevar o potencial elétrico (MARSCHNER, 1996; KINRAIDE, 1998).

O magnésio exerce funções importantes na célula vegetal, como síntese de proteínas e de clorofilas, ativação enzimática, fosforilação oxidativa, fotossíntese e, inclusive, partição de carbono no tecido vegetal (MARCHNER, 1996). Esse elemento pode também aliviar os danos do alumínio por restaurar a atividade das proteínas G-dependentes de Mg, devido à ligação do alumínio (LANDINO e MACDONALD, 1997).

Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos do alumínio no crescimento, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila e de pigmentos fotossintéticos em plantas de alfafa crescidas em diferentes relações Ca:Mg da solução nutritiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Planta do Departamento de Biologia Vegetal e no Laboratório de Associações Biológicas/BIOAGRO do Departamento de Microbiologia, pertencentes à Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

As sementes de alfafa (*Medicago sativo* (L.) cv. Crioula) foram colocadas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada esterilizada, adicionada de água destilada. Após sete dias da germinação, foi iniciada a irrigação com a solução nutritiva Clark, ½força, modificada (Tabela 1), até as plantas atingirem o estágio de desenvolvimento denominado V2 (Tabela 2).

Nesse estágio, as plântulas foram retiradas da areia e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, sendo as raízes lavadas em água destilada. Posteriormente, elas foram transferidas para caixas de isopor com capacidade de 5,3 L, revestidas internamente com sacos de polietileno contendo solução nutritiva de Clark, ½ força, modificada (Tabela 1), com arejamento constante, para aplicação dos tratamentos. A solução nutritiva foi trocada uma vez por semana, e seu pH foi mantido a $4,5 \pm 0,1$, mediante monitoramento diário, sendo as correções do pH efetuadas com a utilização de solução-estoque de 100 mmol L^{-1} KOH.

Tabela 1 – Composição da solução nutritiva de Clark, ½ força, modificada por CLARK (1975)

Elemento	Concentração (mmol L ⁻¹)	Elemento	Concentração (μmol L ⁻¹)
K	2,55	P	25,00
*Ca	2,00	Mn	3,50
*Mg	2,00	B	9,50
S	4,52	Zn	1,00
Cl	1,00	Mb	0,30
**NO ₃ ⁻	0,45	Fe	20,00
**NO ₄ ⁺	0,45	Cu	0,25

* CaSO₄ 2H₂O e MgSO₄ 7H₂O, cuja concentração foi variável conforme o tratamento.

** Na forma de NH₄NO₃.

Tabela 2 – Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de alfafa, adaptada da descrição de KALU e FICK (1981)

Estádios	Descrição dos Estádios
Vo	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

2.2. Preparo do inóculo

Nos tratamentos em que o nitrogênio foi suprido apenas pelo processo de fixação biológica, a inoculação foi feita com uma mistura de estirpes de

Sinorhizobium meliloti, BR 7408 e BR 7409. Essas bactérias foram crescidas separadamente em frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio extrato de levedura e manitol (VICENTE, 1970) a pH 6,5, a 28 °C, até atingirem a densidade ótica de 10^8 células mL⁻¹ de meio de cultura. No momento da inoculação, as estirpes foram misturadas em um Erlenmeyer e as raízes das plântulas, mergulhadas na suspensão, sendo imediatamente recolocadas na solução nutritiva.

2.3. Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos

O efeito do alumínio no crescimento, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila da alfafa crescida em solução nutritiva de Clark, ½ força, modificada (Tabela 1), com diferentes relações Ca:Mg, foi estudado em fatorial completo 4 x 2 x 2, sendo quatro relações Ca:Mg (100:0, 75:25, 50:50 e 25:75), com 4 mmol L⁻¹ de Ca+Mg na solução nutritiva; duas formas de suprimento do nitrogênio, simbiótico ou mineral, e dois níveis de alumínio (0 e 50 µmol L⁻¹), totalizando 16 tratamentos dispostos em blocos casualizados, com três repetições. As unidades experimentais foram constituídas de um vaso com duas plantas. Após uma semana de cultivo das plantas nos vasos contendo solução nutritiva a pH 4,5, diferentes relações Ca:Mg e o N mineral, procedeu-se à adição do alumínio e à supressão do N mineral e, também, à inoculação das plantas nos tratamentos correspondentes ao N simbiótico. O alumínio foi adicionado na forma de AlCl₃.6H₂O, utilizando-se uma solução-estoque de 100 mmol L⁻¹, preparada no dia do uso.

2.4. Determinação da massa seca

A massa seca da raiz e da parte aérea foi avaliada quando as plantas de alfafa atingiram o estágio R6, aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Nessa ocasião, a parte aérea das plantas de cada parcela foi seccionada na altura do coleto, e as raízes e as partes aéreas foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada, a 75 °C, durante 72 horas e posterior pesagem.

2.5. Teor de nitrogênio no trifólio

A massa de 100 mg da parte aérea, de cada repetição, foi submetida à digestão por H_2SO_4 e H_2O_2 para, em seguida, determinar os teores de N nos trifólios adjacentes aos utilizados nas mensurações de fluorescência e trocas gasosas pelo método de Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995).

2.6. Trocas gasosas

As trocas gasosas, referentes à taxa de fotossíntese líquida e à condutância estomática por unidade de área foliar, foram avaliadas com o uso de um analisador de gases a infravermelho portátil (IRGA), sistema aberto, modelo LCA-2 (Analytical Development Co. Ltd., Hoddesdon, UK). Utilizou-se o folíolo central do terceiro trifólio superior completamente expandido, a partir do ápice, quando às plantas atingiram o estágio de desenvolvimento R6. O fluxo de fótons fotossintético correspondeu a $1.000 \mu\text{mol fótons m}^2 \text{ s}^{-1}$, a umidade relativa do ar de aproximadamente 80% e a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados de concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i) e a concentração ambiental de CO_2 (C_a) foram utilizados para calcular a razão C_i/C_a .

2.7. Fluorescência da clorofila

A determinação da cinética de fluorescência rápida da clorofila foi realizada no mesmo folíolo e no mesmo estágio de crescimento utilizado nas determinações das trocas gasosas, com o uso de um fluorômetro portátil modelo PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). Os resultados referentes a **fluorescência inicial** (F_o), definida como a intensidade de fluorescência quando todos os centros de reação do FS II estão abertos e as membranas fotossintéticas desenergizadas, e apresenta, também, um coeficiente de extinção fotoquímico igual a 1 e o não-fotoquímico, igual a zero; **fluorescência máxima** (F_m), definida como a intensidade de fluorescência em que todos os centros de reação do FS II estão fechados, isto é, a extinção fotoquímica é igual a zero, e todos os processos de extinção não-

fotoquímica estão no mínimo; e **fluorescência variável** ($F_v = F_m - F_o$), foram utilizados para se estimarem F_v/F_m e F_v/F_o . Essas medições foram feitas após o condicionamento do folíolo no escuro, por 30 minutos, para garantir o estado oxidado dos centros de reações fotossintéticas.

2.8. Medição indireta da clorofila

Os níveis de clorofila nas folhas da alfafa foram determinados por método indireto, utilizando-se o equipamento SPAD-502 [Soil- Plant Analysis Development (SPAD), Section, Minolta Câmera Co. Ltd. Japan]. As medições foram realizadas no trifólio, no qual foram feitas as medições de fluorescência e trocas gasosas, quando as plantas de alfafa se encontravam no estágio de desenvolvimento R6, aos 60 dias após os tratamentos.

2.9. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, procedendo-se, posteriormente, ao desdobramento da interação (Ca:Mg) x Al, de modo a comparar as relações dentro de cada concentração de alumínio pelo teste de Tukey a 5% e as médias dos tratamentos com alumínio, dentro de cada relação Ca:Mg, pelo teste F a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas de alfafa inoculadas, crescidas com 0 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de alumínio a pH 4,5, nas diferentes relações Ca:Mg, apresentaram pequeno desenvolvimento, ausência de nódulos e sintomas de deficiência de nitrogênio e morte das plantas (dados não mostrados). Esse fato foi atribuído à atividade do íon hidrogênio sobre a sobrevivência e o crescimento do rizóbio. Em ensaios com uso de solução nutritiva sem a presença do alumínio, não houve formação de nódulos nas raízes da alfafa quando o pH da solução foi inferior a 4,8, ressaltando-se que a nodulação máxima ocorreu em pH superior a 5,5 e 50% de nodulação máxima quando em pH 5,0 (MUNNS, 1970; ENDREW, 1976). Em alfafa crescida em solo, o baixo pH reduziu a população de *S. meliloti* e a quantidade de nódulos (MAHLER, 1983; RANDO e SILVEIRA, 1995; POHMAN, 1946). A atividade do íon hidrogênio tem sido considerada o principal fator que restringe a sobrevivência e o crescimento de rizóbios em solo ácido (BORDELEAU e PROVOST, 1994).

O efeito deletério do Al em plantas de feijão crescidas em solução nutritiva, 0 a 83 $\mu\text{mol L}^{-1}$, mostrou-se relacionado ao pH e à redução dos processos de formação e alongamento das raízes laterais, o que prejudica o processo de infecção pela bactéria, sendo observado alterações em número, massa seca e atividade nodular (FRANCO e MUNNS, 1982).

Os resultados apresentados referem-se apenas aos de alfafa cultivada com N mineral, na presença e ausência do alumínio com diferentes relações Ca:Mg.

3.1. Crescimento

A massa seca da parte aérea (MSPA) e a das raízes da alfafa 'Crioula', média de duas plantas por vaso, foram influenciadas pelas relações Ca:Mg da solução nutritiva, pela presença do alumínio e pela interação desses dois fatores (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa seca da alfafa (g planta^{-1}), na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescida em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg

Relações Ca:Mg	Massa Seca Parte Aérea			Massa Seca Raiz		
	- Al	+Al	Média	- Al	+ Al	Média
100:0	0,18bA	0,18cA	0,18	0,17bA	0,16bA	0,17
75:25	0,56aB	1,14aA	0,85	0,46aB	0,83aA	0,65
50:50	0,73aA	0,37bB	0,55	0,44aA	0,33bA	0,38
25:75	0,62aA	0,30bB	0,46	0,42aA	0,21bB	0,32
Média	0,52	0,50	0,51	0,37	0,38	0,38
CV (%)	20,14			18,16		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguida da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Na ausência do alumínio, não houve diferenças na produção de massa seca da parte aérea entre os tratamentos correspondentes às relações Ca:Mg (75:25, 50: 50 e 25:75) (Tabela 3). Resultados similares foram obtidos em alfafa 'Crioula' cultivada em substrato com relações Ca:Mg do corretivo do solo variando de 1:0 até 4:1 (MOREIRA, 1999). Embora a alfafa seja considerada planta exigente no que se refere ao pH do solo, ela apresenta crescimento

normal em solução nutritiva com pH 4,0, desde que não haja deficiência ou toxicidade de elementos minerais (VANCE et al., 1980). Na alfafa, podem ocorrer diferenças intra-específicas na produção de massa seca em resposta às relações Ca:Mg do corretivo do solo, a exemplo do cultivar “Flórida 77”, que se mostrou sensível a essas variações e aos níveis de corretivo adicionados, enquanto ‘Crioula’ somente apresentou respostas significativas a este último (GOMES, 1995). Os dados da Tabela 3 confirmaram a adaptação de ‘Crioula’ a uma ampla faixa de relações Ca:Mg, conforme demonstrado também em solo (GOMES, 1995; MOREIRA, 1999).

As menores produções de MSPA e das raízes ocorreram na relação 100:0, tanto na presença como na ausência do alumínio (Tabela 3), em que as plantas apresentaram sintomas visuais de deficiência de magnésio.

Na presença do alumínio, o maior acúmulo de MSPA da alfafa ocorreu nas plantas dos tratamentos com a relação 75:25, o mesmo acontecendo no que se refere à produção da massa seca da raiz (Tabela 3). Esse fato, possivelmente, ocorreu em razão da existência de um efeito mitigador dessa relação sobre a toxicidade do alumínio, um comportamento provavelmente associado a efeito específico do Ca e do Mg em aliviar a toxicidade do alumínio. Em *Phaseolus vulgaris* (FRANCO e MUNNS, 1982) e em oito espécies de dicotiledôneas (KELTJENS e TAN, 1993), o aumento da concentração de cálcio em solução nutritiva aliviou a toxicidade do alumínio. É possível admitir-se que o mecanismo básico envolvido seja o de restauração do cálcio deslocado da parede celular e membrana plasmática (RENGEL, 1992; KINRAIDE, 1998). No entanto, o efeito protetor do magnésio em aliviar a toxicidade do alumínio pode estar relacionado à restauração da atividade das proteínas G-dependentes de Mg, devido à ligação do alumínio (LANDINO e MACDONALD, 1997).

Na presença do alumínio nos tratamentos com as relações 50:50 e 25:75, verificou-se redução de aproximadamente 50% na massa seca da parte aérea (Tabela 3), o que evidenciou a existência de interação entre as relações Ca:Mg e a toxicidade do alumínio. Neste trabalho, tal fato parece estar associado ao maior efeito protetor do cálcio em comparação com o magnésio, ou seja, a restauração do cálcio deslocado da parede celular e membrana plasmática, quando se consideraram os dois mecanismos sugeridos por

KINRAIDE (1998). No experimento, a força iônica entre as relações Ca:Mg da solução nutritiva foi mantida constante, por isso é impossível que o segundo mecanismo, incremento do potencial elétrico, com decréscimo da atividade do Al^{+3} na superfície da membrana, tenha tido predominância.

3.2. Teores de nitrogênio no trifólio

A determinação dos teores de N nos trifólios foi utilizada para verificar a existência de relação entre os teores de N, a fluorescência da clorofila, as leituras SPAD e as trocas gasosas.

Os teores de N no trifólio não diferiram significativamente nas relações Ca:Mg 75:25, 50:50 e 25:75, embora os valores tenham sido consistentemente menores na presença do alumínio na solução nutritiva (Tabela 4). Em limoeiro-cravo, o alumínio causou decréscimo de 29% no teor de N da parte aérea (SANTOS et al., 1999 b), possivelmente devido à inibição da absorção de nitrato (GOMES et al., 1985; LAZOF et al., 1994). Tal fato pode ser atribuído aos efeitos do alumínio sobre a estrutura e a permeabilidade da membrana (ZHAO et al., 1987). Nesses tratamentos, eles variaram de 2,90 a 3,60 dag kg⁻¹, valores considerados adequados para a nutrição da alfafa, uma vez que esses valores para a porção superior da alfafa se situam entre 2,6 e 3,7 dag kg⁻¹, no início do florescimento (Kelling e Motocha, 1990, citados por GOMES, 1995).

Os teores de nitrogênio no trifólio foram significativamente menores nas plantas cultivadas na relação 100:0 (Tabela 4) em razão, provavelmente, do menor crescimento e absorção de nutrientes causados pela deficiência de magnésio.

3.3. Trocas gasosas

3.3.1. Taxa fotossintética líquida (A) e concentração interna de CO₂

As taxas fotossintéticas líquidas por unidade de área foliar foram influenciadas pelas relações Ca:Mg, pela presença do alumínio na solução nutritiva e pela interação desses fatores (Tabela 5).

Tabela 4 – Teor de nitrogênio (dag kg^{-1}) no trifólio em plantas de alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescidas em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg

Relações Ca:Mg	Teor de Nitrogênio		
	- Al	+Al	Média
100:0	2,33bA	2,27bA	2,30
75:25	3,60aA	2,91aB	3,25
50:50	3,60aA	2,90aB	3,25
25:75	3,57aA	2,90aB	3,23
Média	3,27	2,74	3,00
CV (%)	10,33		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Tabela 5 – Taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) da alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescida em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg

Relações Ca:Mg	Taxa Fotossintética Líquida		
	- Al	+Al	Média
100:0	1,33cA	2,23dA	1,78
75:25	12,50abB	14,77aA	13,63
50:50	13,05aA	8,48cB	10,76
25:75	11,25bA	11,37bA	11,31
Média	9,53	9,21	9,37
CV (%)	7,55		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Na ausência do alumínio, houve diferença significativa na taxa fotossintética entre os tratamentos correspondentes às relações 50:50 e 25:75 (Tabela 5), enquanto a da relação 50:50 não diferiu da relação 75:25 (Tabela 5). Nesses tratamentos, essa taxa variou de 11,25 a 13,05 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Tais valores indicam que, nessas relações, a assimilação líquida do CO_2 pelas plantas pode ser considerada adequada. Em plantas de alfafa não-estressadas e cultivadas em solução nutritiva, no início do florescimento a taxa fotossintética foi de 11 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (GOMES, 2000).

A presença do alumínio na solução nutritiva resultou em maior taxa fotossintética nas plantas cultivadas na relação 75:25 (Tabela 5) e maior acúmulo de massa seca da parte aérea (Tabela 3). A possível explicação para o efeito benéfico do alumínio sobre a taxa de fotossíntese líquida pode ser a de que, em soluções ácidas (pH 4,0 a 4,5), a presença do alumínio em baixas concentrações compete com H^+ por sítios de absorção na superfície celular, conforme observado por KINRAIDE e PARKER (1987) ou, ainda, por diminuir a extrusão de nutrientes e estimular o efluxo do H^+ , o que é considerado essencial para o crescimento radicular em pH ácido (YAN et al., 1992). Como resultado, ocorrem maior crescimento do sistema radicular (Tabela 3) e maior absorção de nutrientes, estimulando, conseqüentemente, o processo fotossintético. No tratamento com a relação 50:50 houve redução de aproximadamente 35% na taxa fotossintética (Tabela 5) e de 50% na massa seca da parte aérea (Tabela 3), e nas plantas cultivadas na relação 25:75 não foram observadas reduções na taxa fotossintética (Tabela 5), mas houve redução de 50% da massa seca da parte aérea na presença do alumínio na solução nutritiva. Isso demonstra o efeito da interação entre as relações Ca:Mg e a toxicidade do alumínio, que nesse caso parece estar associado ao efeito protetor do cálcio, em comparação com o magnésio. O incremento da concentração de cálcio no ambiente radicular de espécies como feijão (SOUSA JÚNIOR et al., 1998) e tomate (KELTAJENS e TAN, 1993) tem reduzido a toxicidade do alumínio, por elevar o "status" nutricional do cálcio e reduzir sua atividade na superfície da membrana das células das raízes (KELTEJANS e TAN, 1993).

A menor taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar foi encontrada na relação 100:0, tanto na presença quanto na ausência do alumínio (Tabela 5), em que ocorreram redução no teor de nitrogênio no trifólio

(Tabela 4) e deficiência de magnésio, verificada por sintomas visuais dessa deficiência. O magnésio exerce funções importantes no processo fotossintético que vão desde a síntese de clorofila até a partição de carbono no tecido vegetal, uma vez que, em plantas deficientes desse elemento, a queda na capacidade fotossintética altera o suprimento de fotoassimilado e, conseqüentemente, a relação fonte:dreno (MARCHNER, 1995).

Os valores da taxa fotossintética por unidade de área foliar (Tabela 5), comparados com as C_i (Tabela 6), indicaram tendência de as menores A resultarem em maior C_i , tanto na presença quanto na ausência do alumínio, sendo indicativos de restrição não-estomática ao intercâmbio gasoso da planta.

Tabela 6 – Concentração interna de CO_2 ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) da alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescida em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg

Relações Ca:Mg	Concentração Interna de CO_2		
	- Al	+Al	Média
100:0	307,50aA	304,50aA	306,00
75:25	275,17bA	249,83cB	262,50
50:50	274,33bcA	268,83bB	271,58
25:75	267,50cB	275,00bA	271,25
Média	281,12	274,54	277,83
CV (%)			

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Em plantas submetidas a estresse, por salinidade e pelas elevadas concentrações de alumínio em solução nutritiva, a diminuição na taxa fotossintética, sem a correspondente diminuição na concentração de CO_2 nos espaços intracelulares, é considerada indicativo de restrições não-estomáticas sobre a taxa fotossintética (BRUGNOLI et al., 1991; PEREIRA, 2001).

3.3.2. Condutância estomática (gs)

Os menores valores de condutância estomática ocorreram nos tratamentos 100:0 (Tabela 7), em consequência da deficiência de magnésio.

Na ausência do alumínio, a condutância estomática não diferiu significativamente entre os tratamentos correspondentes às relações Ca:Mg de 75:25, 50:50 e 25:75 (Tabela 7), mas variou entre 0,62 e 0,73 mol H₂O m⁻² s⁻¹. Esses valores não representaram limitação para fotossíntese, tendo em vista que, em plantas de alfafa (ZANELLA, 2000) e feijão (LIMA et al., 1999), somente os valores abaixo de 0,29 mol (H₂O) m⁻² s⁻¹ representam limitação das taxas fotossintéticas.

Na presença do alumínio, o maior valor de condutância estomática ocorreu no tratamento 75:25 (Tabela 7), associado ao maior acúmulo de massa seca (Tabela 3) e à maior taxa fotossintética (Tabela 5). Já nos tratamentos com as relações Ca:Mg 50:50 e 25:75 houve redução de aproximadamente 45 e 20% na gs, respectivamente, na presença do alumínio no ambiente radicular. Em plantas de trigo, houve diminuição de 38% na gs, como resultado do aumento da concentração de alumínio na solução nutritiva (MOUSTAKAS et al., 1996).

Modificações da gs, pela presença do alumínio, podem estar relacionadas com alterações da relação K⁺/Ca²⁺ nas células-guarda ou com alteração da concentração do ácido abscísico (LINDERG e WINGSTRAND, 1985; POSCHENRIEDER et al., 1989).

3.3.3. Relação Ci/Ca

Na ausência do alumínio, a relação entre os teores de CO₂ nos espaços intercelulares (Ci) e na atmosfera (Ca) e a denominada razão (Ci/Ca) não foram influenciadas pelas relações 75:25, 50:50 e 25:75 (Tabela 8). Esses tratamentos foram acompanhados de elevadas taxas fotossintéticas por unidade de área foliar. Assim, foi possível admitir-se que não houve restrição não-estomática à fotossíntese nesses tratamentos, em razão da maior assimilação do CO₂ dentro da célula, a exemplo do observado por ZANELLA (2001).

Tabela 7 – Condutância estomática ao vapor de água por unidade de área foliar ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em plantas de alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescidas em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg

Relações Ca:Mg	Condutância Estomática		
	- Al	+Al	Média
100:0	0,27bA	0,26bA	0,26
75:25	0,62aA	0,65aA	0,63
50:50	0,73aA	0,33bB	0,53
25:75	0,66aA	0,53aB	0,59
Média	0,57	0,44	0,50
CV (%)	11,03		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Na presença do alumínio, as plantas cultivadas na relação 50:50 e 25:75 apresentaram incremento na razão C_i/C_a , em comparação com a relação 75:25 (Tabela 8). Esses tratamentos foram acompanhados de redução na taxa fotossintética, o que significa uma restrição não-estomática à fotossíntese, devido à menor assimilação de CO_2 , conforme observado também por ZANELLA (2001).

O aumento na relação C_i/C_a no tratamento 100:0 também indica eventual limitação não-estomática à fotossíntese, devido a uma menor assimilação do CO_2 dentro da folha.

3.4. Fluorescência da clorofila

O estudo dos parâmetros de fluorescência da clorofila, de modo geral, parece indicar que a eficiência fotoquímica do PSS II não foi alterada pelas relações Ca:Mg nem pela presença do alumínio na solução nutritiva (Tabela 9).

Tabela 8 – Relação Ci/Ca em plantas de alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescidas em diferentes relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Relação Ci/Ca		
	- Al	+Al	Média
100:0	0,916aA	0,904aA	0,910
75:25	0,818bA	0,751cB	0,784
50:50	0,822bB	0,806bA	0,814
25:75	0,804bB	0,833bA	0,818
Média	0,840	0,823	0,831
CV (%)	1,937		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Tabela 9 – Fluorescência da clorofila a, expressa pelas razões Fv/Fo e Fv/Fm, em plantas de alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescidas em diferentes relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações	Fv/Fo			Fv/fm		
	- Al	+Al	Média	- Al	+ Al	Média
100:0	2,24bA	3,98aA	3,11	0,61bB	0,79aA	0,70
75:25	4,79aA	3,72aA	4,25	0,83aA	0,80aA	0,81
50:50	4,70aA	4,47aA	4,58	0,82aA	0,81aA	0,81
25:75	4,42aA	4,39aA	4,40	0,78aA	0,81aA	0,79
Média	4,04	4,14	4,08	0,76	0,80	0,78
CV (%)	20,08			8,98		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

A razão F_v/F_o foi influenciada somente pelas relações Ca:Mg (Tabela 9), e as diferenças significativas foram observadas apenas na relação 100:0, na ausência do alumínio. A redução da razão F_v/F_o na relação 100:0 pode ser um indicador de danos estruturais, que ocorrem no tilacóide e afetam o transporte fotossintético de elétrons. O decréscimo na razão F_v/F_o pode ser em decorrência de aumento em F_o ou redução de F_v (HAVAUX e LANNOYE, 1985). Neste experimento, esse decréscimo foi em razão de aumento em F_o (dado não mostrado). O aumento em F_o , no folíolo central do terceiro trifólio superior completamente expandido, pode ser atribuído à redução na captura e transferência de energia pelo complexo coletor de luz. Como consequência da fotoinibição, o centro de reação e o complexo coletor de luz se desacoplam (GUENTER e MELIS, 1990), e com isso o complexo coletor de luz é incapaz de transferir a energia de excitação ao centro de reação, e dessa forma a energia é emitida como fluorescência, incrementando o valor de F_o (OUZOUNIDOU, 1993).

A razão F_v/F_m expressa o rendimento quântico dos processos fotoquímicos do PS II (LAZAR, 1999), ou seja, a eficiência relativa da captura de energia pelo PSS II. De modo geral, verificou-se ausência de resposta significativa para esta variável em todas as relações Ca:Mg estudadas, com exceção da relação 100:0 na ausência do alumínio (Tabela 9). Na literatura, os valores de F_v/F_m são da ordem de $0,8332 \pm 0,004$, em condições não-estressantes, na maioria das espécies (BJORKMAN e DEMMING, 1997). No entanto, quando fatores adversos afetam o processo fotossintético, principalmente sobre o PS II, a razão F_v/F_m sofre decréscimo.

3.5. Medição indireta da clorofila

A metodologia-padrão de extração e de determinação de clorofila, ainda que fácil, apresenta como desvantagem a coleta destrutiva do material vegetal, pois a extração é via maceração com acetona e, a leitura, em espectrofotômetro, executadas em laboratório. Com o advento dos medidores de clorofilas portáteis, as determinações dos teores de clorofila das folhas tomaram-se mais fáceis, principalmente pela rapidez e forma não-destrutiva, o

que viabiliza a realização diretamente no campo (Yadava, 1986, citado por GUIMARÃES, 1998).

As leituras de unidades SPAD não diferiram significativamente nas relações 75:25, 50:50 e 25:75 (Tabela 10), embora os valores tenham sido consistentemente menores na presença do alumínio. Em plantas de trigo e de sorgo submetidas ao estresse por alumínio, o teor de clorofila diminuiu em até 70% em relação ao controle (OHKI, 1986).

Tabela 10 – Unidades de SPAD em alfafa, na ausência (-Al) ou na presença (+Al) de alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$), crescida em diferentes relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Unidades SPAD		
	- Al	+Al	Média
100:0	9,06bA	9,0bA	9,03
75:25	58,00aA	50,77aB	54,39
50:50	59,73aA	49,81aB	54,77
25:75	58,80aA	50,60aB	54,70
Média	46,40	40,04	43,22
CV (%)	3,02		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

A faixa de referência da leitura SPAD para alfafa 'Crioula' no início do florescimento não foi encontrada na literatura disponível. Na batatinha, o valor adequado está entre 49 e 56, no arroz é maior do que 40 e no milho é igual a 52 (MALAVOLTA, 1997). Em todas as relações Ca:Mg estudadas, tanto na presença quanto na ausência, os teores de nitrogênio nos trifólios avaliados encontravam-se em nível adequado (Tabela 4). Em razão disso, os valores de unidades SPAD foram considerados adequados para alfafa 'Crioula'. A concentração de clorofila, ou intensidade da coloração verde, correlacionou-se positivamente com a concentração de N das folhas, pois grande parte deste

nesses órgãos da planta participa da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila (GIRARDIN et al., 1985; TAIZ e ZEIGER, 1991). As leituras obtidas com o medidor SPAD-502 (leituras SPAD) apresentaram correlação positiva com a suficiência de N em milho (GIRARDIN et al., 1985; BLACKMER e SCHERPERS, 1995).

As menores unidades SPAD obtidas na relação Ca:Mg 100:0, tanto na presença quanto na ausência do alumínio, traduzem os efeitos da deficiência de magnésio e os baixos teores de nitrogênio no trifólio (Tabela 4). Na literatura, tem sido obtida uma correlação positiva entre a suplementação de nitrogênio e os teores de clorofilas nas folhas (PANUELAS et al., 1993; MAKINO et al., 1994). Em folhas de cítrus em solução nutritiva, o nível de clorofila foi significativamente reduzido sob a deficiência de magnésio (LAVON et al., 1999).

Os resultados deste experimento evidenciaram que a relação que permitiu mitigar os efeitos da toxicidade do alumínio foi a relação Ca:Mg 75:25, que nesse caso pareceu estar associada ao maior efeito protetor do cálcio em relação ao magnésio, em razão do aumento observado nessa relação, na massa seca da parte aérea e das raízes, na taxa fotossintética e na condutância estomática e de redução na razão Ci/Ca.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho objetivou investigar o efeito do alumínio sobre o crescimento, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila e os pigmentos fotossintéticos, em plantas de alfafa cultivadas em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, em solução nutritiva de Clark, ½ força, modificada. O experimento foi constituído de um fatorial completo 4 x 2 x 2, sendo quatro relações Ca:Mg (100:0, 75:25, 50:50 e 25:75), com 4 mmol L⁻¹ de Ca+Mg; duas formas de suprimento do N (simbiótico ou mineral); e dois níveis de alumínio (0 e 50 µmol L⁻¹), sendo os tratamentos dispostos em blocos casualizados, com três repetições. As plantas de alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 e BR 7409 apresentaram baixo desenvolvimento e ausência de nodulação, seguida de morte das plantas. Tal fato foi atribuído à atividade do íon hidrogênio. A alfafa 'Crioula' pode crescer em solução nutritiva com pH 4,5 e em ampla faixa de relação Ca:Mg, desde que não haja toxicidade de alumínio. Os efeitos tóxicos do Al foram mitigados quando as plantas foram cultivadas na solução nutritiva com a relação Ca:Mg correspondente a 75:25, como verificado pelos dados de incremento de produção da massa seca da parte aérea e das raízes, na taxa fotossintética e na condutância estomática. Os valores de unidades SPAD foram consistentemente menores na presença do alumínio; foram considerados adequados para o cultivar 'Crioula'. A deficiência de magnésio, verificada nas plantas da relação 100:0, induziu a limitações no crescimento, na taxa fotossintética líquida por unidade de área foliar, na condutância estomática e na captura e transferência de energia pelo complexo coletor de luz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, C. S.; JOHNSON, A. D.; SANDLAND, R. L. Effect of aluminum on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 24, p. 325-339, 1973.

ANDREW, C. S. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 27, p. 611-623, 1976.

BJORKMAN, O.; DEMMING, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 178, p. 485-505, 1987.

BLACKMER, T. M.; SCHEPERS, J. S. Use of a chlorophyll meter to monitor nitrogen status and schedule fertigation for corn. **J. Prod. Agri.**, v. 8, p. 56-60, 1995.

BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant Soil**, v. 161, p. 115-125, 1994.

BRUGNOLI, E.; LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. **Plant. Physiol.**, v. 95, p. 628-635, 1991.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact morize roots. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, p. 458-460, 1975.

FRANCO, A. A.; MUNNS, D. N. Acidity and aluminum restraints on nodulation, nitrogen fixation, and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v. 46, p. 296-301, 1982.

FOY, C. D. Plant adaptation to acid, aluminium-toxic soil. **Comm. Soil Plant. Analysis**, v. 19, p. 959-987, 1988

FOY, C. D. Soil chemical factors limiting plant root growth In: HATFIELD, J. L.; STEWART, B. A. **Limitations to plant root growth**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 97-149.

GIRARDIN, P.; TOLLENAAR, M.; MULDON, J. F. The effect of temporary N starvation on leaf photosynthetic rate and chlorophyll content of maize. **Can. J. Plant Sci.**, v. 99, p. 45-49, 1985.

GOMES, M. M. S.; CAMBRAIA, J.; SAN' ANNA, R.; ESTEVÃO, M. M. Aluminum effects on uptake and translocation of nitrogen in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **J. Plant Nutr.**, v. 8, p. 457-465, 1985.

GOMES, F. T. **Comportamento da alfafa inoculada com rizóbio, em resposta a níveis de corretivo, com diferentes relações cálcio:magnésio**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1995. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GOMES, F. T. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em alfafa nodulada sob supressão e ressuprimento de fosfato**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2000. 100 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GUENTER, J. E.; MELIS, A. The physiological significance of photosystem II heterogeneity in chloroplasts. **Photosynth. Rev.**, v. 23, p. 105-109, 1990.

GUIMARÃES, T. G. **Nitrogênio no solo e na planta, teor de clorofila e produção do tomateiro, no campo e na estufa, influenciados por doses de nitrogênio**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1998. 184 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HAVAUX, M.; LANNOYE, R. *In vivo* chlorophyll fluorescence and delayed light emissions as rapid screening techniques for stress tolerance in crop plants. **Z. Pflanzenzucht**, v. 95, p. 1-13, 1985.

HUANG, J. W.; SHAFF, J. E.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Aluminum effects on fluxes at root apex of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 230-237, 1992.

JONES, D. L.; KOCHIAN, L. V.; GILROY, S. Aluminum induces a decrease in cytosolic calcium concentration in BY-2 tobacco cell cultures. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 81-89, 1998.

KALU, B. A.; FICK, G. W. Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. **Crop Sci.**, v. 21, p. 267-271, 1981.

KELTJENS, W. G.; TAN, K. Interactions between aluminum, magnesium and calcium with different monocotyledonous and dicotyledonous plant species. **Plant Soil**, v. 155, p. 485-488, 1993.

KINRAIDE, T. B. Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities. **Plant Physiol.**, v. 118, p. 513-520, 1998.

KINRAIDE, T. B.; PARKE, D. R. Cation amelioration of aluminium toxicity in wheat. **Plant Physiol.**, v. 83, p. 546-551, 1987.

LANDINO, L. M.; MACDONALD, T. L. Inhibition of the GDP/GTP exchange reaction of *ras* p21 by aluminum ion. **J. Inorg. Bioch.**, v. 66, p. 99-102, 1997.

LASÁK, D. Chlorophyll *a* fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1412, p.1-28, 1999.

LAVON, R.; SALOMON, R.; GOLDSCHMIDT, E. E. Effect of potassium, magnesium, and calcium deficiencies on nitrogen constituents and chloroplast components in *Citrus* leaves. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 124, p. 158-163, 1999.

LAZOF, D. B.; RINCÒN, M.; RUFTY, T. W.; RUFTY, T.W.; MACKWYN, C. T.; CARTER, T. E. Aluminum and associated effects on ¹⁵NO₃ –influx in roots of two soybean genotypes differing in tolerance. **Plant Soil**, v. 164, p. 291-297, 1994.

LEE, C. H. Effects of Al and Mn on growth, nutrient status and gas exchange rates of *Pinus densiflora* seedlings hydroponically grown in nutrient culture solution. **FRI J. Forest Sci.**, v. 59, p. 91-104, 1998.

LIDON, F. C.; RAMALHO, J. C.; BARREIRO, M. G.; LAURIANO, J. Modulation of photosystem 2 reactions mediated by aluminium toxicity in *Zea mays*. **Photosynthetica**, v. 34, p. 151-156, 1997.

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, M. L.; COPELAND, L. The effect of aluminium on respiration of wheat roots. **Physiol. Plant.**, v. 90, p. 51-58, 1994.

LINDBERG, S.; WINGSTRAND, G. Mechanisms of Cd²⁺ inhibition of (K⁺ + Mg⁺²) uptake in young root of sugar beet (*Beta vulgaris*). **Physiol. Plant.**, v. 63, p. 181-186, 1985.

MAHLER, R. L. Influence of pH and N and P nutrition of alfalfa grown on an Andic mission silt loam. **Agron. J.**, v. 75, p. 731-735, 1983.

MAKINO, A.; NAKANO, H.; MAE, T. Responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, cytochrome f, and sucrose synthesis enzymes in rice leaves to leaf nitrogen and their relationships to photosynthesis. **Plant Physiol.**, v. 105, p. 173-179, 1994.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** London: Academic Press, 1995. 674 p.

MARSCHNER, H.; KIRKBY, E. A.; ÇAKMAK, I. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. **J. Exp. Bot.**, v. 47, p. 1255-1263, 1996.

MOREIRA, A.; CARVALHO, J. G.; EVANGELISTA, A. R. Influência da relação cálcio:magnésio do corretivo na nodulação, produção e composição mineral da alfafa. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 34, p. 249-255, 1999.

MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; ELEFThERIOU, E. P.; LANNOYE, R. Indirect effects of aluminium stress on the photosynthetic apparatus. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 34, p. 553- 560, 1996.

MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; LANNOYE, R. Aluminium effects on photosynthesis and elemental uptake in an aluminium-tolerant and non-tolerant wheat cultivar. **J. Plant Nutr.**, v. 18, p. 669-683, 1995.

MUNNS, D. N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection. **Plant Soil**, v. 32, p. 90-102, 1970.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado Nutricional das plantas: princípios e aplicações.** Piracicaba, SP: POTAFOS, 1997. 319 p.

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.

OHKI, K. Photosynthesis chlorophyll, and transpiration responses in aluminium stressed wheat and sorghum. **Crop Sci.**, v. 26, p. 572-576, 1986.

PANUELAS, J.; BIEL, C.; ESTIARTE, M. Changes in biomass, chlorophyll content, and gas exchange of beans and peppers under nitrogen and water stress. **Photosynthetica**, v. 29, p. 535-542, 1993.

PEREIRA, W. E. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citrus submetidos a estresse por alumínio, em cultivo hidropônico.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2001. 123 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

POHLMAN, G. G. Effect of liming different soil layers on yield of alfafa and root development and nodulation. **Soil Sci.**, v. 62, p. 255-266, 1946.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; BARCELÓ, J. Influence of cadmium on water relation, stomatal resistance and abscisic acid content expanding bean leaves. **Plant Physiol.**, v. 90, p. 1365-1371, 1989.

RANDO, E. M.; SILVEIRA, R. I. Desenvolvimento da alfafa em diferentes níveis de acidez, potássio e enxofre no solo. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 19, p. 235-242, 1995.

RENGEL, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. **New Phytol.**, v. 121, p. 499-513, 1992.

RENGEL, Z. Uptake of aluminium by plant cells. **New Phytol.**, v. 134, p. 389-406, 1996.

RENGEL, Z.; ROBINSON, D.L. Competitive Al^{+3} inhibition of net Mg^{+2} uptake by intact *Lolium multiflorum* root. I. Kinetics. **Plant Physiol.**, v. 91, p. 1407-1413, 1989.

SANTOS, C. H.; GRASSI FILHO, H.; RODRIGUES, J. D.; PINHO, S. Z. Níveis de alumínio e acúmulo de macronutrientes em portas- enxertos cítricos em cultivo hidropônico. **Sci. Agr.**, v. 56, p. 1165-1175, 1999b.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiol. Plant.**, v. 96, p. 193-198, 1996.

SILVA, J. B. C.; NOVAIS, R. F.; SEDIYMA, C.S. Comportamento de genótipos de soja em solo com alta saturação de alumínio. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 19, p. 287-298, 1984.

SOLERA, M. A. C. **Efeito de relação Ca:Mg, utilizando carbonato e sulfato, sobre o crescimento e a nutrição mineral da cana-de-açúcar.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1988. 186 f. Dissertação (Mestrado em Solo e Nutrição de Plantas) – Departamento de solos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SOUSA JÚNIOR, O. J.; NASCIMENTO, C. W. A.; MARTINEZ, H. E. P. Resposta do feijoeiro cultivado em solução nutritiva a níveis de cálcio e magnésio na presença do alumínio. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 33, p. 1143-1148, 1998.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1991. 559 p.

TEDESCO, M.J.; GIANELO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, nº 5).

VANCE, C.P.; HEICHEL, G. H.; HARDARSON, G. Historical comparisons of plant and *Rhizobium* induce ineffective nodules in alfalfa. **Physiol. Plant. Pathol.**, v. 17, p. 167-173, 1980.

VICENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 1970.164 p.

YAN, F.; SCHUBERT, S.; MENGEL, K. Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and broad bean (*Vicia faba* L.). **Plant Physiol.**, v. 99, p. 415- 421, 1992.

ZANELLA, F. **Crescimento, trocas gasosas e atividade do sistema GS/GOGAT em alfafa nodulada sob tratamento com fósforo.** Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ZHAO, X. J.; SUCOFF, E. I.; STADELMANN, E. J. Al^{+3} and Ca^{+2} alteration of membrane permeabilidade of *Quercus rubra* root cortex cells. **Plant Physiol.**, v. 83, p. 159-162, 1987.

ZINDER, G. H.; KRETSCHMER, A. E.; SARTAIN, J.B. Field response of four tropical legumes to lime and superphosphate. **Agron. J.**, v. 70, p. 269-273, 1978.

CAPÍTULO II

CRESCIMENTO, TROCAS GASOSAS E FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA EM ALFAFA NODULADA, EM RESPOSTA AO pH E À RELAÇÃO CÁLCIO:MAGNÉSIO

1. INTRODUÇÃO

A acidez do solo é um dos principais fatores limitantes do crescimento da alfafa (RECHCIGI et al., 1986; BALIGAR, 1989). A atividade do íon hidrogênio restringe a sobrevivência e o crescimento do rizóbio na rizosfera, o processo de infecção, o estabelecimento do rizóbio e o funcionamento do nódulo (BORDELEAU e PRÉVOST, 1994). A tolerância das leguminosas à acidez varia em função do modo de nutrição nitrogenada dessas plantas. As dependentes do nitrogênio proveniente da fixação biológica do N_2 são, geralmente, mais ácido-sensíveis do que as que recebem esse elemento na forma mineral, uma vez que o desenvolvimento da simbiose requer pH próximo da neutralidade e níveis de cálcio (ANDREW, 1976).

A deficiência de nitrogênio em alfafa pode ser ocasionada pela acidez do solo, que reduz a população de *Sinorhizobium meliloti* no solo e a quantidade de nódulos nas raízes (RANDO e SILVEIRA, 1995). Em estudo com *Phaseolus vulgaris* em solução nutritiva, demonstrou-se que a redução no pH de 5,5 para 5,0 diminuiu significativamente o número de nódulos formados

por planta, e o pH foi o principal fator limitante da nodulação, do crescimento da planta e da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FRANCO e MUNNS, 1982). Tal fato pode estar associado a relações entre o metabolismo do carbono e o do nitrogênio, visto que há forte dependência da planta pelo nitrogênio fixado biologicamente pela bactéria e desta para com os carboidratos da planta hospedeira (SCHUBERT, 1986). Como consequência da deficiência de nitrogênio, ocorrem alterações na taxa fotossintética, nos teores de clorofila, na eficiência fotoquímica e no crescimento da planta.

A acidez do solo e a deficiência de cálcio tendem a ocorrer conjuntamente. As leguminosas temperadas geralmente requerem altas concentrações desse elemento quando dependentes da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (Munns, 1977, citado por PIJNENBORG et al., 1990). Além disso, a adesão das células do rizóbio às raízes da leguminosa é mediada pela Rhicadesina, uma proteína de ligação cálcio-dependente (SMIT et al., 1987). Esse íon desempenha papel de fundamental importância na infecção dos pêlos radiculares da alfafa pelo *S. meliloti* (MUNNS, 1970), em razão da habilidade de muitos rizóbios em sobreviver e persistir em solo ácido (BELLEN et al., 1998; HOWIESON et al., 1992), na taxa de crescimento de *S. meliloti* (HOWIESON et al., 1992) e na nodulação. Esta pode ser reduzida em até 70% no cultivar 'Resis' cultivado em solução nutritiva, na ausência de cálcio (PIJNENBORG, 1990), e, ainda, causar até a ausência de nodulação, a exemplo da alfafa 'Flórida 77' quando cultivada em solo com baixos teores de cálcio (GOMES, 1995).

O cálcio é um elemento importante para a manutenção da integridade da membrana celular (MORARD et al., 1996; RENGEL, 1992), a síntese das paredes celulares e a translocação de carboidratos das folhas para outras partes da planta (MALAVOLTA, 1997). Em vista da sua mobilidade restrita na planta, ele deve ser fornecido de forma constante, ressaltando-se que os sintomas de sua deficiência surgem nas folhas mais novas (DECHEN et al., 1999). Em alfafa 'Florida 77', as maiores produções de matéria seca da parte aérea ocorreram nos tratamentos em que a relação Ca:Mg correspondeu a 100:0, mais uma afirmação da alta exigência desse cultivar pelo cálcio (GOMES, 1995).

O magnésio é necessário para a formação da clorofila, a atividade máxima das enzimas fosforilativas (MALAVOLTA, 1997; TERRY e ULRICH, 1974), os processos de transferência de energia, a ligação do ATP à nitrogenase e o crescimento do rizóbio (MARSCHNER, 1995). Assim, espera-se que a deficiência de Mg tenha efeito prejudicial na fotossíntese e na respiração. As deficiências desse elemento resultam em diminuição no teor de clorofila e em sintomas de clorose típicos nas folhas de *Citrus* (LAVON et al., 1999). Nos sistemas simbióticos, a sua deficiência prejudica o suprimento de carboidratos para os nódulos e interfere negativamente na taxa de fixação do N₂ atmosférico (MARSCHNER, 1995).

As funções específicas do cálcio nos processos de formação dos nódulos e as do magnésio no de funcionamento dos mesmos e, ainda, de ambos para o desenvolvimento da planta, resultam na necessidade de equilíbrio desses dois cátions no ambiente radicular, para maximizar a nodulação, a fotossíntese e a produção de matéria seca da alfafa 'Florida 77' (GOMES, 1995).

A fluorescência da clorofila é freqüentemente usada para se avaliar a funcionalidade do aparelho fotossintético ou os efeitos dos estresses ambientais (KRAUSE e WEIS, 1991). Os efeitos estressantes de fatores como a temperatura, a salinidade, a radiação, a seca e a deficiência de nutrientes, entre outros, têm sido pesquisados por meio de medições de fluorescência da clorofila (HAVAUXE e LANNOYE, 1985).

A cinética de fluorescência da clorofila, avaliada pela fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima (Fm) e fluorescência variável (Fv), e a razão entre elas permitem avaliar alguns parâmetros relacionados à capacidade de absorção e transferência de energia, principalmente os dependentes do estado de oxidação das moléculas de quinona A (Q_A) e das mudanças conformacionais das membranas dos tilacóides (KRAUSE e WEIS, 1991). Essa cinética pode também ser afetada pela deficiência de nutrientes e pela acidez do solo.

Este estudo objetivou avaliar os efeitos de dois pH (5,0 e 6,0) no crescimento, nas trocas gasosas e na fluorescência da clorofila e de pigmentos fotossintéticos da alfafa nodulada, crescida em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Unidade de Crescimento de Planta do Departamento de Biologia Vegetal e no Laboratório de Associações Biológicas/BIOAGRO do Departamento de Microbiologia, pertencentes à Universidade Federal de Viçosa.

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

As sementes de alfafa (*Medicago sativo* (L.) cv. Crioula) foram colocadas para germinar em bandejas plásticas contendo areia lavada esterilizada, adicionada de água destilada. Após sete dias da germinação, foi iniciada a irrigação, com a solução nutritiva Clark, ½força, modificada (Tabela 1), até as plantas atingirem o estágio de desenvolvimento denominado V2 (Tabela 2). Nesse estágio, as plântulas foram retiradas da areia e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, sendo as raízes lavadas em água destilada. Posteriormente, elas foram transferidas para caixas de isopor com capacidade para 5,3 L, revestidas internamente com os sacos de polietileno contendo solução nutritiva de Clark, ½ força, modificada (Tabela 1), com arejamento constante, para a aplicação dos tratamentos. A solução nutritiva foi trocada uma vez por semana e seu pH, mantido em $5,0 \pm 0,1$ ou $6,0 \pm 0,1$, mediante o monitoramento diário, sendo as correções do pH efetuadas com a utilização de solução-estoque de 100 mmol L^{-1} KOH.

Tabela 1 – Composição da solução nutritiva de Clark, ½ força, modificada por CLARK (1975)

Elemento	Concentração (mmol L ⁻¹)	Elemento	Concentração (µmol L ⁻¹)
K	2,55	P	25,00
*Ca	2,00	Mn	3,50
*Mg	2,00	B	9,50
S	4,52	Zn	1,00
Cl	1,00	Mo	0,30
**NO ₃ ⁻	0,45	Fe	20,00
**NO ₄ ⁻	0,45	Cu	0,25

* CaSO₄ 2H₂O e MgSO₄ 7H₂O, cuja concentração foi variável conforme o tratamento.

** Na forma de NH₄NO₃, durante a primeira semana de crescimento.

Tabela 2 – Descrição dos estádios do desenvolvimento de plantas de alfafa, adaptada da descrição de KALU e FICK (1981)

Estádios	Descrição dos Estádios
Vo	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

2.2. Preparo do inóculo

Nos tratamentos em que o nitrogênio foi suprido pelo processo de fixação biológica, a inoculação foi feita com uma mistura de estirpes de

Sinorhizobium meliloti, BR 7408 e BR 7409. Essas bactérias foram crescidas separadamente em frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio extrato de levedura e manitol (VICENTE, 1970), pH 6,5, a 28 °C, até atingirem aproximadamente 10^{10} UFC mL⁻¹. No momento da inoculação, as estirpes foram misturadas em um Erlenmeyer e as raízes das plântulas, mergulhadas na suspensão, sendo imediatamente recolocadas na solução nutritiva.

2.3. Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos

O efeito do estresse ácido no crescimento, nas trocas gasosas da alfafa e na fluorescência da clorofila crescida em solução nutritiva de Clark, ½força, modificada (Tabela 1), com diferentes relações Ca:Mg, foi estudado em fatorial completo 4 x 2, sendo quatro relações Ca:Mg (100:0, 75:25, 50:50 e 25:75), com 4 mmol L⁻¹ de Ca+Mg na solução nutritiva e dois valores de pH (5,0 e 6,0); totalizando oito tratamentos, dispostos em blocos casualizados, com três repetições. As unidades experimentais foram constituídas de um vaso com uma planta.

As plantas foram cultivadas por uma semana nos vasos de polietileno, em solução nutritiva com diferentes relações Ca:Mg, N mineral e pH, de acordo com os tratamentos. Após esse período, o N mineral foi suprimido e efetuada a inoculação das plantas.

2.4. Determinação da massa seca da planta e dos nódulos

As massas secas das raízes, dos nódulos e das partes aéreas foram avaliadas quando as plantas de alfafa atingiram o estágio R6, aos 68 dias após a aplicação dos tratamentos. Nessa ocasião, a parte aérea das plantas de cada parcela foi seccionada na altura do coleto, as raízes foram lavadas com água destiladas e os nódulos, destacados. As partes aéreas e raízes foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel e os nódulos, em placas de Petri, para secagem em estufa de circulação forçada a 75 °C, por 72 horas, para posterior pesagem.

2.5. Teor de nitrogênio no trifólio

A massa de 100 mg da parte aérea, de cada repetição, foi submetida à digestão por H_2SO_4 e H_2O_2 para, em seguida, determinar os teores de N nos trifólios adjacentes aos utilizados nas mensurações de fluorescência e trocas gasosas pelo método de Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995).

2.6. Trocas gasosas

As trocas gasosas, referentes à taxa de fotossíntese líquida por unidade de área foliar e concentração de CO_2 nos espaços intracelulares, foram avaliadas com o uso de um analisador de gases a infravermelho portátil (IRGA), sistema aberto, modelo LCA-2 (Analytical Development Co. Ltd. Hoddesdon, UK). Utilizou-se o folíolo central do terceiro trifólio superior completamente expandido, a partir do ápice, quando as plantas atingiram o estágio de desenvolvimento R6. O fluxo de fótons fotossintético correspondeu a $1.000 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a umidade relativa do ar de aproximadamente 80% e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Os dados de concentração de CO_2 nos espaços intercelulares (C_i) e a concentração ambiental de CO_2 (C_a) foram utilizados para se calcular a razão C_i/C_a .

2.7. Variáveis de fluorescência rápida

A determinação da cinética de fluorescência rápida da clorofila foi realizada no mesmo folíolo e no mesmo estágio de crescimento utilizado nas determinações das trocas gasosas, com o uso de um fluorômetro portátil modelo PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK). Os resultados obtidos referentes a fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m) e fluorescência variável ($F_v = F_m - F_o$) foram utilizados para se estimar F_v/F_o . Essas medições foram feitas após o condicionamento do folíolo no escuro, por 30 minutos, para garantir o estado oxidado dos centros de reações fotossintéticas.

2.8. Medição indireta da clorofila

Os níveis de clorofila nas folhas da alfafa foram determinados por método indireto, utilizando-se o equipamento SPAD-502 [Soil- Plant Analysis Development (SPAD), Section, Minolta Câmera Co. Ltd. Japan]. As medições foram realizadas no trifólio, no qual foram feitas as medições de fluorescência e trocas gasosas, quando as plantas de alfafa se encontravam no estágio de desenvolvimento R6, aos 68 dias após a aplicação dos tratamentos.

2.9. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância, procedendo-se, posteriormente, ao desdobramento da interação (Ca:Mg) x pH, de modo a comparar as relações dentro de cada pH, pelo teste de Tukey a 5%, e as médias dos tratamentos com pH, dentro de cada relação, pelo teste F a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento

As produções de massa seca da parte aérea (MSPA) e de raízes (MSR) foram significativamente alteradas pelas relações Ca:Mg e pelo pH da solução nutritiva (Tabela 3).

Tabela 3 – Massa seca da alfafa (g planta^{-1}) em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg (%)	Parte Aérea			Raiz		
	pH 5,0	pH 6,0	Média	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	0,20bA	0,21cA	0,21	0,21bA	0,21dA	0,23
75:25	0,53aB	1,01bA	0,77	0,41aB	0,91bA	0,66
50:50	0,24bB	1,28aA	0,76	0,24bB	1,16aA	0,70
25:75	0,21bB	0,77bA	0,49	0,22bB	0,63cA	0,43
Média	0,30	0,82	0,56	0,28	0,72	0,51

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

A maior produção de MSPA das plantas de alfafa 'Crioula' ocorreu na relação 75:25 a pH 5,0, enquanto em solução com o pH 6,0 ela aconteceu no tratamento correspondente à relação 50:50. Em cultivo em solo, não se observou diferença no acúmulo de MSPA desse cultivar, como resultado da adição de corretivo contendo diferentes relações Ca:Mg (MOREIRA et al., 1999). Provavelmente, essa diferença de comportamento esteja associada ao fato de ter havido melhor controle das condições de crescimento da planta em solução nutritiva.

Em plantas de alfafa cultivadas em solução nutritiva com a relação Ca:Mg correspondente a 75:25 a pH 5,0, houve aumento significativo na massa seca dos nódulos (Tabela 4). Esse comportamento pode estar relacionado à interação do Ca com a acidez sobre a nodulação, visto que as relações Ca:Mg 75:25, 50:50 e 25:75 da solução nutritiva apresentam diferença de 1 mmol L^{-1} na concentração de cálcio. Já foi demonstrado que a adição desse cátion no ambiente de crescimento aumenta o comprimento da raiz (RECHCIGAL et al., 1987), a taxa de crescimento do rizóbio (BELLEN et al., 1998; HOWIESON et al., 1992), a adesão do rizóbio às raízes (CAETANO-ANOLES, 1989), o número de nódulos por planta (PIJNENBORG, 1990) e a produção da massa seca da parte aérea (GOMES, 1995). A elevação do pH da solução nutritiva para 6,0 resultou em incremento significativo na produção MSPA na relação 50:50 e no acúmulo de massa seca dos nódulos (Tabela 4), uma demonstração de que, em condições de maior pH, o requerimento de cálcio é menor para maximização da nodulação. Resultados similares foram obtidos em várias espécies de leguminosas de clima temperado e também nas de clima tropical, em que menor concentração de cálcio é requerida para nodulação satisfatória quando essas plantas são cultivadas a pH 6,0 (ANDREW, 1976).

Nos tratamentos correspondentes à relação 100:0, a deficiência de magnésio reduziu o crescimento das plantas e a nodulação (Tabelas 3 e 4). A coloração esbranquiçada dos nódulos das plantas desses tratamentos representou, visualmente, a ineficiência no processo de fixação do N_2 atmosférico. A deficiência de magnésio afeta o funcionamento dos nódulos, o transporte de assimilados e a atividade da nitrogenase e das enzimas fosforilativas (MILLER e SIROIS, 1983; MARSCHENER, 1995). Além disso, a

Tabela 4 – Massa seca dos nódulos da alfafa (mg planta^{-1}), em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg (%)	Massa Seca dos Nódulos		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	3,79cA	9,03cA	6,41
75:25	24,26aB	56,71bA	40,49
50:50	8,46bB	98,99aA	53,73
25:75	3,37bB	59,43bA	31,40
Média	9,97	56,04	33,01
CV(%)	21,40		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

atividade da nitrogenase pode ser regulada pelo magnésio, uma vez que o fornecimento de energia para o processo de redução do N_2 à amônia é feito pela formação do complexo Mg-ATP (MILLER e SIROIS, 1983).

Quando as plantas foram cultivadas em solução nutritiva a pH 5,0 ocorreu redução média de 82% na massa seca dos nódulos (Tabela 4), provavelmente em razão da ineficiência do processo de fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico, o que foi acompanhado por uma redução de 62% na massa seca da parte aérea (Tabela 3). O efeito da atividade do H^+ na nodulação também foi observado em *Phaseolus vulgaris*, ocasionando redução no número de nódulos formados por planta de 60 para 10, quando o pH foi reduzido de 5,5 para 5,0, sendo esse efeito considerado o principal fator responsável pela limitação do crescimento dessas plantas (FRANCO e MUNNS, 1982).

3.2. Teores de nitrogênio no trifólio

A determinação dos teores de N nos trifólios foi utilizada para se verificar a existência de relação entre teores de N, fluorescência da clorofila, trocas gasosas da alfafa e leituras SPAD.

Os teores de nitrogênio no trifólio não foram influenciados pelas relações Ca:Mg (Tabela 5) e variaram entre 2,23 e 2,70 a pH 5,0 e entre 2,20 e 3,80 dag kg⁻¹ a pH 6,0. Esses valores são considerados adequados para a nutrição da alfafa, apenas nas plantas cultivadas nas relações Ca:Mg correspondentes a 75:25 a pH 5,0 e 75:25 e 50:50 a pH 6,0, uma vez que esse valor se situava entre 2,6 e 3,7, na porção superior da alfafa (Kelling e Motocka, 1990, citados por GOMES, 1995).

Tabela 5 – Teor de nitrogênio no trifólio (dag kg⁻¹) em plantas de alfafa em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg (%)	Teor de Nitrogênio no Trifólio		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	2,30aA	2,20aA	2,25
75:25	2,70aA	3,10aA	2,90
50:50	2,28aB	3,80aA	3,04
25:75	2,23aA	2,40aA	2,31
Média	2,38	2,87	2,62
CV (%)	25,79		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

3.3. Trocas gasosas

3.3.1. Taxa fotossintética líquida (A) e concentração interna de CO₂

A taxa de assimilação líquida do CO₂ por unidade de área (A) foliar foi influenciada pelas relações Ca:Mg e pelo pH da solução nutritiva (Tabela 6).

Tabela 6 – Taxa de assimilação líquida do CO₂ por unidade de área foliar (A) ($\mu\text{molCO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) da alfafa, em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Taxa de Assimilação Líquida		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	0,15cA	0,83dA	0,49
75:25	12,57aA	13,20aA	12,57
50:50	4,60bB	13,07aA	8,84
25:75	3,23bB	6,33cA	4,78
Média	5,59	8,35	7,23
CV (%)		9,28	

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

A taxa de assimilação líquida do CO₂ por unidade de área foliar foi maior no tratamento com a relação 75:25 com pH 5,0, enquanto nas plantas cultivadas em pH 6,0 essa troca ocorreu nas relações 75:25 e 50:50. Nesses tratamentos, os teores de nitrogênio no trifólio foram considerados adequados para nutrição da alfafa (Tabela 5), e também houve maior acúmulo de massa seca da parte aérea, excetuando-se a relação 75:25 a pH 6,0 (Tabela 3). Esse comportamento provavelmente esteja associado à interação do nitrogênio com fotossíntese, uma vez que a capacidade fotossintética depende do suprimento de nitrogênio, pois grande parte deste nas folhas está alocada em proteínas envolvidas no processo fotossintético, principalmente na enzima Rubisco (EVANS e TERASHIMA, 1997). Em plantas cultivadas na relação Ca:Mg 75:25 a pH 6,0, a elevada taxa fotossintética não correspondeu ao maior acúmulo de massa seca da parte aérea. Em plantas de milho, feijão e girassol, a diminuição na produção foi atribuída ao inadequado crescimento da área foliar do que a uma limitação na fotossíntese líquida (Boyer, 1970, citado por TAIZ e ZEIGER, 1991).

Nas relações Ca:Mg correspondentes a 100:0, 50:50 e 25:75 a pH 5,0 e nas relações 100:0 e 25:75 a pH 6,0, os teores de nitrogênio no trifólio (Tabela

5) estão abaixo do nível crítico de 2,6 dag kg⁻¹ na porção superior da parte aérea (Kelling e Motocha, 1990, citados por GOMES, 1995), e esses tratamentos foram acompanhados por baixas taxas de assimilação líquida de CO₂ por unidade de área foliar (Tabela 6), possivelmente em razão de nitrogênio ser componente da Rubisco (EVANS, 1983) e da interdependência entre a capacidade fotossintética e o nitrogênio foliar (EVANS, 1989). Em plantas de girassol em solução nutritiva, a deficiência de nitrogênio reduziu cerca de 30% a atividade fotossintética em relação à planta-controle (CIOMPI, 1996).

Os valores de taxa de assimilação de CO₂ por unidade de área foliar (Tabela 6), comparados com as Ci (Tabela 7), indicam tendência de as menores A resultarem em maior Ci, tanto a pH 5,0 quanto a pH 6,0, e representam indicativo de restrições não-estomáticas ao intercâmbio gasoso da planta.

Tabela 7 – Concentração de CO₂ nos espaços intercelulares (μmol mol⁻¹) em plantas de alfafa em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Concentração CO ₂ nos Espaços Intercelulares		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	306,00aA	297,00aA	301,50
75:25	213,00dA	154,33dB	183,67
50:50	263,00cA	194,33cB	228,50
25:75	284,67bA	239,33bB	262,00
Média	266,67	221,17	243,92
CV (%)	3,49		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Em plantas submetidas a estresse, a diminuição da taxa fotossintética sem a correspondente diminuição na concentração de CO₂ nos espaços

intracelulares é considerada um indicativo da existência de restrições não-estomáticas sobre a taxa de fotossíntese líquida. Em feijoeiro, a salinidade diminuiu a taxa da fotossíntese líquida e aumentou a C_i (BRUGNOLI et al., 1991); resultado similar ao verificado em quatro porta-enxertos de cítrus sob estresse com alumínio (PEREIRA, 2001).

3.3.2. Condutância estomática (gs)

Os valores de condutância estomática ao vapor de água por unidade de área foliar nas plantas crescidas em pH 5,0 foram maiores na relação 75:25 e em pH 6,0, nas relações 75:25 e 50:50. O incremento na gs, nesses tratamentos, não representa limitação da fotossíntese, tendo em vista que em plantas de alfafa (ZANELLA, 2000) e feijão (LIMA et al., 1999) somente os abaixo de $0,29 \text{ mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ representam limitação das taxas fotossintéticas.

Tabela 8 – Condutância estomática ao vapor de água por unidade de área foliar ($\text{mol (H}_2\text{O) m}^{-2} \text{ S}^{-1}$) da alfafa em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Condutância Estomática		
	PH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	0,12bA	0,20bA	0,16
75:25	0,32aA	0,40aA	0,36
50:50	0,21abA	0,35aB	0,28
25:75	0,18abA	0,26abA	0,22
Média	0,21	0,30	0,25
CV (%)	11,71		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

3.3.3. Relação Ci/Ca

A relação entre os teores de CO₂ nos espaços intracelulares (Ci) e na atmosfera (Ca) foi influenciada pelas relações Ca:Mg e pelo pH da solução nutritiva (Tabela 9).

Tabela 9 – Relação Ci/Ca em plantas de alfafa em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Relação Ci/Ca		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	0,94aA	0,92aA	0,93
75:25	0,65cA	0,47cB	0,56
50:50	0,81bA	0,51cB	0,66
25:75	0,88aA	0,74bA	0,81
Média	0,82	0,66	0,74
CV (%)	4,42		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

No pH 5,0, a menor relação Ci/Ca ocorreu em plantas do tratamento com a relação 75:25, enquanto a elevação do pH da solução nutritiva resultou em menores valores nas plantas das relações 75:25 e 50:50 (Tabela, 9). Esses tratamentos foram acompanhados de aumento nas taxas fotossintéticas e elevados teores de nitrogênio no trifólio (Tabelas 5 e 6). Assim, é possível inferir-se que não houve restrição não-estomática à fotossíntese nesses tratamentos, em razão da maior assimilação do CO₂ dentro da célula, a exemplo do observado por ZANELA (2001). Os outros tratamentos, tanto a pH 5,0 quanto a pH 6,0, apresentaram aumentos na relação Ci/Ca, associados a baixos teores de nitrogênio no trifólio e baixa taxa fotossintética, o que significa restrição não-estomática à fotossíntese, devido a uma menor assimilação de CO₂ dentro da célula, conforme também observado por ZANELA (2001). A

redução na atividade de assimilação do CO₂ sob estresse de nitrogênio, associado ao aumento na concentração intracelular de CO₂ em plantas de girassol, foi atribuída mais a uma redução na atividade mesofílica do que a limitações estomáticas (CIOMPI et al., 1996).

3.4. Fluorescência da clorofila

Os valores dos parâmetros de fluorescência (Fo, Fm e Fv e as relações entre Fv/Fm) da clorofila parecem indicar que a eficiência fotoquímica do fotossistema II não foi afetada pela relação Ca:Mg ou pelo pH da solução nutritiva (dados não mostrados), mesmo naqueles tratamentos que apresentaram baixos teores de nitrogênio no trifólio. Resultados similares foram obtidos em plantas de girassol em solução nutritiva, em que os parâmetros de fluorescência da clorofila não foram afetados pelo estresse de nitrogênio com relação às plantas-controle (CIOMPI et al., 1996).

Dentre os parâmetros de fluorescência, a relação Fv/Fo foi influenciada pelo pH da solução nutritiva somente quando se considera a soma da média dos tratamentos (Tabela 10).

Os valores da relação entre fluorescência variável e fluorescência inicial (Fv/Fo) foram menores nas plantas cultivadas em solução nutritiva com pH 5,0. Essa diminuição da relação Fv/Fo é, quando significativa, indicativo dos danos estruturais que ocorrem nos tilacóides, que afetam o transporte fotossintético de elétrons (HAVAUX e LANNOYE, 1985). A resposta única para esse parâmetro de fluorescência, considerando o conjunto dos tratamentos, reflete, de forma mais sensível, a mudanças na fotossíntese (BABANI e LICHTENTHALER, 1992).

3.5. Medição indireta da clorofila

A intensidade de coloração verde foi influenciada pelas relações Ca:Mg e pelo pH da solução nutritiva (Tabela 11).

Tabela 10 – Relação Fv/Fo da alfafa em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Relação Fv/Fo		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	2,63aA	3,06 aA	2,85
75:25	3,04 aA	4,95 aA	3,99
50:50	3,63 aA	3,72 aA	3,68
25:75	2,85 aA	3,04 aA	2,95
Média	3,04	3,69	3,37
CV (%)	22,09		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

Tabela 11 – Unidades de SPAD em alfafa em resposta ao pH e às relações Ca:Mg da solução nutritiva

Relações Ca:Mg	Unidades SPAD		
	pH 5,0	pH 6,0	Média
100:0	2,43dB	11,43cA	6,93
75:25	20,30aB	43,20aA	31,75
50:50	14,43bB	43,00aA	28,72
25:75	10,33cB	18,67bA	14,50
Média	11,87	29,08	20,48
CV (%)	2,30		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%, e médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si, pelo teste F a 5%.

O maior valor de unidade SPAD das plantas crescidas em solução nutritiva com pH 5,0 ocorreu no tratamento com relação 75:25 e com pH 6,0, nos com relações 75:25 e 50:50, tratamentos em que os teores de nitrogênio

no trifólio foram maiores (Tabela 5). Tal efeito pode estar associado à relação positiva entre a concentração de clorofila e os teores de N, pois grande parte do N contido nas folhas participa da síntese e da estrutura das moléculas de clorofila (HÁK et al., 1993; EVANS e TERASHIMA, 1987), sendo, em média, 50 mol de nitrogênio nos tilacóides para cada mol de clorofila (EVANS, 1989).

Os resultados deste experimento indicam que os requerimentos de cálcio são maiores do que os de magnésio para mitigar os efeitos tóxicos do baixo pH, provavelmente em razão do benefício do cálcio no ambiente de crescimento, o que permitiu maior nodulação e, conseqüentemente, maior fornecimento de nitrogênio para alfafa 'Crioula', verificado por intermédio dos teores adequados de nitrogênio no trifólio e da maior intensidade de coloração verde da planta. Em razão desse suprimento de nitrogênio para essa planta, ocorreu aumento na taxa fotossintética e na condutância estomática.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Estudaram-se os efeitos do pH (5,0 e 6,0) e da relação Ca:Mg (100:0, 75:25, 50:50 e 25:75) sobre crescimento, trocas gasosas, fluorescência da clorofila e pigmentos fotossintéticos, em plantas de alfafa 'Crioula' inoculadas com uma mistura de estirpes de *Sinorhizobium meliloti*, BR 7408 e BR 7409, no estádio R6 (um nó com uma flor aberta). O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, sendo as plantas cultivadas em solução nutritiva.

A existência de interação entre as relações Ca:Mg e o pH foi comprovada pelo aumento na produção da massa seca da parte aérea, na nodulação, na taxa fotossintética por unidade de área foliar, na condutância estomática e na intensidade de coloração verde das plantas cultivadas na relação 75:25 a pH 5,0 e na relação 50:50 a pH 6,0. O aumento na taxa fotossintética e na intensidade de coloração verde das plantas cultivadas na relação 75:25 a pH 6,0, sem o correspondente aumento no acúmulo de massa seca da parte aérea, indicou a inexistência de uma concordância entre os dados de comportamento de trocas gasosas e a produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREW, C. S. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes. I. Nodulation and growth. **Aust. J. Agric. Res.**, v. 27, p. 611-623, 1976.

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.

BALLEN, K. G.; GRAHAM, P. H.; JONES, R. K.; BOWERS, J. H. Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in *Rhizobium*. **Can. J. Microbiol.**, v. 44, p. 582-587, 1998.

BALIGAR, V. C.; ELGIN, J. H.; FOY, C. D. Variability in alfalfa for growth and mineral uptake and efficiency ratios under aluminium stress. **Agron. J.**, v.81, p. 223-229, 1989.

BORDELEAU, L. M.; PRÉVOST, D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. **Plant. Soil**, v. 161, p. 115-125, 1994.

BRUGNOLI, E.; LAUTERI, M. Effects of salinity on stomatal conductance, photosynthetic capacity and carbon isotope discrimination of salt-tolerant (*Gossypium hirsutum* L.) and salt-sensitive (*Phaseolus vulgaris* L.) C₃ non-halophytes. **Plant. Physiol.**, v. 95, p. 628-635, 1991.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact morize roots. **J. Agric. Food Chem.**, v. 23, p. 458- 460, 1975.

CIOMPI, S.; GENTILI, E.; GUIDI, L.; SOLDATINI, G. F. The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. **Plant. Sci.**, v. 118, p. 177-184, 1996.

DECHEN, A. R.; FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. Tolerância e adaptação de plantas aos estresses nutricionais. In: SIQUEIRA, J. O et al. (Eds.). **Inter-relação fertilidade , biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras, MG: SBCS, 1999. p 337-361.

EVANS, J. R.; TERASHIMA, I. Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. **Aust. J. Plant Physiol.**, v. 14, p. 281-292, 1987.

EVANS, J. R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Physiol.**, v. 72, p. 297-302, 1983.

EVANS, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C₃ plants. **Oecologia**, v. 78, p. 9-19, 1989.

FRANCO, A. A.; MUNNS, D. N. Acidity and aluminum restraints on nodulation, nitrogen fixation, and growth of *Phaseolus vulgaris* in solution culture. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.46, p. 296-301, 1982.

GOMES, F. T. **Comportamento da alfafa inoculada com rizóbio, em resposta a níveis de corretivo, com diferentes relações cálcio:magnésio**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 1995. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

HÁK, R.; RINDELE-ZIMMER, V.; LICHTENTHALER, H. K.; NÁTR, L. Chlorophyll a fluorescence signatures of nitrogen deficient barley leaves. **Photosynthetica**, v. 28, p. 151-159, 1993.

HAVAUX, M.; LANNOYE, R. *In vivo* chlorophyll fluorescence and delayed light emissions as rapid screening techniques for stress tolerance in crop plants. **Z. Pflanzenzucht**, v. 95, p. 1-13, 1985.

HOWIESON, J.G.; ROBSON, A.D.; EWING, M.A. External phosphate and calcium concentrations, and pH, but not the products of rhizobial nodulation genes, affect the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual medics. **Soil Biol. Biochem.**, v. 25, p. 567-573, 1993.

KALU, B. A.; FICK, G. W. Quantifying morphological development of alfalfa for studies of herbage quality. **Crop Sci.**, v. 21, p. 267-271, 1981.

KRAUSE, G.H.; WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 313-349, 1991.

LAVON, R.; SALOMON, R.; GOLDSCHMIDT, E. E. Effect of potassium, magnesium, and calcium deficiencies on nitrogen constituents and chloroplast components in *Citrus* leaves. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 124, p. 158-163, 1999.

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.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 1995. 674 p.

MILLER, R. W.; SIROIS, J. C. Calcium and magnesium effects on symbiotic nitrogen fixation in the alfalfa (*M. sativa*) – *Rhizobium meliloti* system. **Physiol. Plant.**, v. 58, p. 464-470, 1983.

MOREIRA, A.; CARVALHO, J. G.; EVANGELISTA, A. R. Influência da relação cálcio:magnésio do corretivo na nodulação, produção e composição mineral da alfafa. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 34, p. 249-255, 1999.

MUNNS, D. N. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium an pH requirements during infection. **Plant Soil**, v. 32, p. 90-102, 1970.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípio e aplicações**. Piracicaba, SP: PATAFOS, 1997. 319 p.

MORARD, P.; PUJOS, A.; BERNADAC, A.; BERTONI, G. Effect of temporary calcium deficiency on tomato growth and mineral nutrition. **J. Plant Nutr.**, v. 19, p. 115-127, 1996.

PEREIRA, W. E. **Trocas gasosas, fluorescência da clorofila, crescimento e composição mineral de quatro porta-enxertos de citrus submetidos a estresse por alumínio, em cultivo hidropônico**. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ., 2001. 123 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PIJNENBORG, J. W. M.; LIE, T.A.; ZEHNDER, A. J. B. Inhibition of nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) by calcium depletion in an acid soil. **Plant Soil**, v. 127, p. 31-39, 1990.

RANDO, E. M.; SILVEIRA, R. I. Desenvolvimento da alfafa em diferentes níveis de acidez, potássio e enxofre no solo. **R. Bras. Ci. Solo.**, v. 19, p. 235-242, 1995.

RECHCIGL, J. E.; RENEAU JÚNIOR, R. B.; WOLF, D. D.; KROONTJE, W.; van SCOYOC, S.W. Alfalfa seedling growth in nutrient solutions as influenced by aluminum, calcium and pH. **Commun. Soil Plant Anal.**, v. 17, p. 27-44, 1986.

RENGEL, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. **New Phytol.**, v.121, p. 499-513, 1992.

SCHUBERT, K. R. Products of biological fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 37, p. 539-574, 1986.

SMIT, G.; KIJNE, J. W.; LUGTENBERG, B. J. J. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **J. Bacteriol.**, v.169, p. 4269-4301.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology.** Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 1991. 559 p.

TEDESCO, M. J.; GIANELO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais.** 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, nº 5).

TERRY, N.; ULRICH, A. Effects of magnesium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet. **Plant Physiol.**, v. 54, p. 379-381, 1974.

VICENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 1970.164 p.

ZANELLA, F. **Crescimento, trocas gasosas e atividade do sistema GS/GOGAT em alfafa nodulada sob tratamento com fósforo.** Viçosa, MG: Impr. Univ., 2001. 63 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

APÉNDICE

APÊNDICE A

Quadro 1A– Quadrados médios das variáveis referentes ao alumínio e às relações Ca:Mg

Variáveis	Quadrados Médios			
	Relações	Alumínio	Rel. x Al	Resíduo
MS da parte aérea	0,46*	0,01	0,28*	0,005
MS da raiz	0,24*	0,01	0,10*	0,004
Teor de N no trifólio	1,34*	1,68*	0,15*	0,970
A	245,39*	1,80	22,75*	0,530
Ci	3400,92*	463,17*	490,35*	17,599
Gs	0,26*	0,15*	0,11*	0,003
Ci/Ca	0,02*	0,002*	0,005*	0,0002
SPAD	3117,54*	242,06*	8,26*	1,708
Fv/Fm	0,02*	0,02*	0,01*	0,005
Fv/Fo	3,85*	0,22	3,56	0,696

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Quadro 2A– Quadrados médios das variáveis referentes ao pH e às relações Ca:Mg

Variáveis	Quadrados Médios			
	Relações	pH	Rel. x pH	Resíduo
MS da parte aérea	0,30*	1,55*	0,30*	0,107
MS da raiz	0,28*	1,84*	0,23*	0,005
MS dos nódulos	2.398,04*	13.012,50*	1.986,29*	56,880
Teor de N no trifólio	1,07	1,48	0,76	0,458
A	152,40*	58,82*	19,41*	0,570
Ci	13.452,20*	12.703,74	916,51*	70,950
gs	0,04*	0,05*	0,001	0,0009
Ci/Ca	0,14*	0,15*	0,02*	0,001
SPAD	828,25*	1.785,37*	154,92*	0,220
Fv/Fo	1,78	2,86*	1,01	0,560

* Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.