

FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO EM ALFAFA NODULADA SOB SUPRESSÃO E RESSUPRIMENTO DE FÓSFORO¹

NITROGEN FIXATION IN ALFALFA NODULATED UNDER PHOSPHORUS SUPRESSION AND RESUPPLY

Fernando Teixeira Gomes² Gilmara Duarte Pereira³ Arnaldo Chaer Borges⁴
Paulo Roberto Mosquim⁵ Paulo César Rezende Fontes⁶

RESUMO

Estudaram-se os efeitos da supressão e do ressuprimento de fósforo (Pi) sobre a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N₂) em plantas de alfafa cv. Flórida 77 inoculadas com *Sinorhizobium meliloti*, em diferentes estádios do desenvolvimento vegetativo (V3 e V4) e reprodutivo (R6 e R8). O ensaio foi conduzido em casa de vegetação e as plantas cultivadas em solução nutritiva. O período de supressão de Pi por dez dias reduziu os teores de Pi nas folhas e nos nódulos em todos os estádios do desenvolvimento, enquanto nas raízes essa redução somente foi observada nos estádios vegetativos. Após o ressuprimento de Pi à solução nutritiva por igual período, dez dias, foi observada a recuperação nos teores de Pi nos estádios R6 e R8 para folhas, V3 e V4 para raízes e V3 para os nódulos. A supressão de Pi alterou o processo de fixação do N₂, estimado pela concentração de aminoácidos totais nas folhas e nas raízes. Os teores de aminoácidos nas folhas e nas raízes foram significativamente menores nas plantas sob supressão de Pi, em relação aos das plantas do tratamento controle. Após o ressuprimento os teores de aminoácidos totais nas raízes, em todos os estádios do desenvolvimento, alcançaram valores similares àqueles das plantas do tratamento controle, enquanto nas folhas isso só ocorreu nos estádios vegetativos. A supressão de Pi não influenciou a proporção de aminoácidos livres na seiva do xilema.

Palavras-chave: *Medicago sativa*, aminoácidos, solução nutritiva, metabolismo do fósforo.

SUMMARY

Phosphorus (Pi) suppression and resupply effects were studied on nitrogen biological fixation (N₂) in alfalfa cv.

Florida 77 inoculated with Sinorhizobium meliloti in different vegetative (V3 and V4) and reproductive (R6 and R8) stages. The experiment was carried in greenhouse and the plants cultivated in nutritive solution. The inorganic phosphorus (Pi) ten days suppression period decreased Pi levels in leaves and nodules in all growth stages, whereas in the roots this decrease was observed only in the vegetative stages. After Pi resupply to the nutritive solution during a similar period, ten days, it was observed Pi levels recovery in stages R6 and R8 for leaves, V3 and V4 for roots and V3 for nodules. Pi suppression altered the N₂ fixation process as estimated by total aminoacids concentration in leaves and roots. Aminoacids levels in leaves and roots were significantly lower in plants under Pi suppression when compared to control plants. After resupply total amino acids levels in roots, throughout all growth stages, reached similar values to control plants, while in leaves this only happened in vegetative stages. Pi suppression did not influence the proportion of free aminoacids in the xylem sap.

Key words: *Medicago sativa*, aminoacids, nutritive solution, phosphorus metabolism.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre a influência do Pi na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico (N₂) têm recebido considerável atenção em leguminosas em razão do alto requerimento desse elemento, durante as fases de iniciação, crescimento e funcionamento dos nódulos radiculares (AL-NIEMI *et al.*, 1997). Observa-se que o Pi potencializa a

¹Parte da tese apresentada pelo autor à Universidade Federal de Viçosa (UFV) para obtenção do título de Doutor em Fisiologia Vegetal.

²Biólogo, Doutor, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: ftgomes@bol.com.br. Autor para correspondência.

³Estudante de Agronomia. Bolsista de Iniciação Científica (CNPq), UFV, Viçosa, MG.

⁴Engenheiro Agrônomo, PhD., Professor Titular, Departamento de Microbiologia, UFV.

⁵Engenheiro Agrônomo, Doutor, Professor Titular, Departamento de Biologia Vegetal, UFV.

⁶Engenheiro Agrônomo, PhD., Professor Titular, Departamento de Fitotecnia, UFV.

fixação simbiótica do N₂ por estimular o crescimento da planta hospedeira, além de afetar diretamente o crescimento do rizóbio e do nódulo (CHAUDHARY & FUJITA, 1998). Em alfafa, a baixa disponibilidade de Pi nos solos reduz a produção de fotoassimilados, afetando negativamente a capacidade dos nódulos de manter a taxa de fixação de N₂ (VANCE *et al.*, 1979).

Os nódulos atuam como fortes drenos de fotoassimilados, que são metabolizados para gerar ATP e poder redutor, essenciais à redução do N₂ atmosférico (MARSCHNER, 1995). Essa redução do N₂ pela nitrogenase consome cerca de 60% a 80% do ATP sintetizado no nódulo (TWARY & HEICHEL, 1991).

A deficiência de Pi diminui a massa nodular (ISRAEL, 1987) e a taxa fotossintética por unidade de área foliar (QIU & ISRAEL, 1992). A sacarose translocada pelo floema, das folhas para os nódulos, fornece a energia e os esqueletos carbônicos para a fixação do N₂, assimilação do amônio e síntese “de novo” de purinas (SÁ & ISRAEL, 1995). Essas observações corroboram a hipótese de que a deficiência de Pi pode reduzir o suprimento de fotossintatos para os nódulos, resultando em um impacto negativo sobre a assimilação do nitrogênio em plantas de soja devido à redução no suprimento de esqueletos carbônicos e energia para efetuar o processo assimilatório do NH₄⁺ (SÁ & ISRAEL, 1995).

A estimativa da fixação simbiótica do nitrogênio pode ser feita com base na concentração de N-urédeos e N-aminoácidos na seiva do xilema de leguminosas noduladas. Resultados obtidos em soja mostram correlação positiva entre a abundância relativa de N-uréidico e a proporção de N₂ fixado, medidos em todos os estádios de crescimento (OHTAKE *et al.*, 1995). Em soja, submetida à supressão de Pi, por sete dias, a porcentagem relativa de N-uréideo no exsudato do xilema foi reduzida, enquanto a concentração de aminoácidos totais aumentou em todos os estádios de desenvolvimento. Após o ressurgimento, não foi observada nenhuma recuperação na porcentagem relativa de urédeos ou na concentração total de aminoácidos (SILVA, 1998).

Em soja, em que os nódulos apresentam crescimento determinado e transportam principalmente urédeos, a deficiência de Pi diminui a concentração de nitrogênio, tanto na parte aérea quanto nos nódulos; ao mesmo tempo, o ressurgimento resultou em aumento da nodulação, tanto em número quanto em massa nodular (RIBET & DREVON, 1995). Contudo, em alfafa, em que os nódulos apresentam crescimento indeterminado e o

nitrogênio fixado simbioticamente é transportado principalmente na forma de amidas e aminoácidos, os efeitos do ressurgimento nas fases vegetativas e reprodutivas podem ser distintos dos da soja.

Assim, este estudo objetivou avaliar os efeitos da supressão e do ressurgimento de Pi sobre a fixação biológica do nitrogênio, tanto no estádio vegetativo quanto no estádio reprodutivo da alfafa.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de alfafa (*Medicago sativa* (L.), cv. Flórida 77) fornecidas pela Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, foram previamente desinfestadas superficialmente por imersão em etanol 70% por 1min e em peróxido de hidrogênio 6% (v:v) por 5min, seguindo-se cinco lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970). A germinação das sementes foi realizada em areia lavada e esterilizada. Quando atingiram o estádio de desenvolvimento V2 (folha trifoliolada, completamente desenvolvida no nó acima do nó das folhas unifolioladas), as plântulas foram retiradas do substrato, selecionadas quanto à uniformidade de tamanho e as raízes lavadas em água destilada, em seguida inoculadas com *Sinorhizobium meliloti*.

No preparo do inóculo, foram utilizadas duas estirpes de *Sinorhizobium meliloti* (BR 7408 e BR 7409) fornecidas pela Embrapa Agrobiologia, Itaguaí, RJ, crescidas separadamente em meio líquido de extrato de levedura e manitol (YEM), pH 6,5 a 29°C, até atingirem uma densidade óptica correspondente a 10⁸ células mL⁻¹ de meio de cultura. Após o crescimento, as estirpes foram misturadas e o processo de inoculação consistiu em deixar as raízes em contato com o inóculo por cinco minutos.

Após a inoculação, as plantas foram cultivadas em vasos de isopor, com capacidade de 5,0ℓ, revestidos internamente com sacos de polietileno contendo solução nutritiva de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada, com a seguinte composição: K, 3,0; Ca, 3,0; Mg, 1,0; P, 0,14; S, 2,0mmol.ℓ⁻¹; B, 46,0; Zn, 1,5; Cu, 0,3; Mo, 0,6; Mn, 18,0; Fe-EDTA, 38,0μmol.ℓ⁻¹. O NH₄-N, 1,0; NO₃-N, 0,6mmol.ℓ⁻¹ somente foram adicionados à solução nutritiva na primeira semana de crescimento, e o Co, 0,75μmol.ℓ⁻¹, somente nas três primeiras semanas. Os vasos receberam arejamento contínuo e o pH da solução nutritiva foi ajustado diariamente em 6,0 ± 0,3, mediante a adição de HCl 1,0N ou NaOH 1,0N. As trocas da solução nutritiva foram efetuadas semanalmente

durante os estádios vegetativos e no intervalo de três dias durante os estádios reprodutivos.

Foram executados dois ensaios. O primeiro foi realizado para investigar os efeitos da supressão do Pi, durante os estádios vegetativos V3 (folhas completamente desenvolvidas no 5^o nó acima do nó das folhas unifolioladas) e V4 (folhas completamente desenvolvidas no 7^o nó acima do nó das folhas unifolioladas) e reprodutivos R6 (um nó com uma flor aberta) e R8 (um a três nós com vagem verde). Esse ensaio consistiu de dois tratamentos: a) controle, Pi durante todo o período experimental; e b) supressão do Pi por dez dias, quando as plantas atingiram os estádios V3, V4, R6 e R8. Após o período de supressão, as plantas foram coletadas e as análises efetuadas.

O segundo ensaio foi realizado para investigar os efeitos do ressuprimento de Pi durante os estádios V3, V4, R6 e R8. Esse ensaio também foi constituído de dois tratamentos: a) controle, Pi durante todo o período experimental e b) ressuprimento de Pi por dez dias após período de supressão também de dez dias, quando as plantas atingiram os estádios V3, V4, R6 e R8. Após o período de ressuprimento, as plantas foram coletadas e as análises efetuadas.

Em cada ensaio, os tratamentos foram analisados dentro de cada estádio. Foram utilizadas parcelas de duas plantas por vaso, com quatro repetições, dispostas num delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância, a 5% de significância de erro pelo teste de Fischer (F).

Para a coleta da seiva do xilema, os caules das plantas foram seccionados acima do nó cotiledonar e o material coletado foi imediatamente transferido para frascos de vidro mantidos em banho de gelo e posteriormente conservados a -15°C.

A separação dos aminoácidos livres foi efetuada por meio de cromatografia líquida de alto desempenho, em coluna de fase reversa C 18 Superpac ODS – 2, após a derivação com o-ftaldialdeído (OFA) (BENSON & HARE, 1975; JARRET *et al.*, 1986).

Uma alíquota de 20µl da amostra foi adicionada a um tubo "ependorf", contendo 60µl do reagente OFA. Após 2 min de derivação, 10µl da mistura foram injetados no cromatógrafo. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas pela área dos picos integrada, comparada aos picos de um padrão Sigma 18, com 15 aminoácidos protéicos, e de outro padrão com os aminoácidos asparagina (Asn), glutamina (Gln) e

ácido γ-amino butírico (GABA), todos em concentração de 2,5mmol.l⁻¹.

Os teores de aminoácidos totais foram determinados no segundo trifólio superior completamente expandido, a partir do ápice e em amostras de raízes finas localizadas nas extremidades do sistema radicular. Os aminoácidos totais foram determinados por meio de reação colorimétrica com ninhidrina, a partir de uma curva-padrão de glicina (Gly), glutamato (Glu), arginina (Arg) e fenilalanina (Phe), usando-se concentrações de até 100nmol.l⁻¹ (RENA & MASCOTTI, 1976).

Os teores de Pi foram determinados no terceiro trifólio superior, completamente expandido, a partir do ápice e em amostras de raízes finas e de nódulos, utilizando-se o método proposto por SMILLE & KROTKOV (1960) e adaptado por HOUGE *et al.* (1970). As amostras foram coletadas, pesadas e imersas em 2,0ml de HClO₄ 0,2N, seguindo-se o congelamento a -15°C. O extrato foi obtido da maceração do material vegetal em almofariz e pistilo, utilizando HClO₄ 0,2N. O macerado foi centrifugado a 3.000 g por dez minutos e o sobrenadante acondicionado em balão volumétrico de 25ml, sendo o precipitado ressuspensão e centrifugado por mais duas vezes. O volume final foi ajustado para 25ml. Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para a reação com molibdato de amônio e posterior determinação dos teores de Pi (LINDEMAN, 1958)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se redução significativa nos teores de Pi nas folhas das plantas sob supressão de fósforo, em relação às do tratamento controle em todos os estádios do desenvolvimento (Figura 1A). Resultados similares foram observados na matéria seca da parte aérea em soja (SILVA, 1998), o mesmo ocorrendo com o Pi total em alfafa (DREVON & HARTWING, 1997), *Vigna radiata* e *Vigna aconitifolia* (CHAUDHARY & FUJITA, 1998). Os teores de Pi obtidos no presente ensaio podem ser considerados satisfatórios para a nutrição da alfafa. Em plantas de soja submetidas a sete dias de supressão de Pi, os teores variaram de 0,2 a 0,5mg de Pi.g⁻¹ matéria fresca (SILVA, 1998).

Após o ressuprimento, os teores de Pi nas folhas nos estádios V3 e V4 (Figura 1B) alcançaram valores similares aos dos tratamentos controles, sugerindo que nestes estádios as plantas aumentaram a capacidade de absorver Pi, quando este foi adicionado à solução nutritiva. Entretanto, a ausência de resposta nos estádios R6 e R8, (Figura

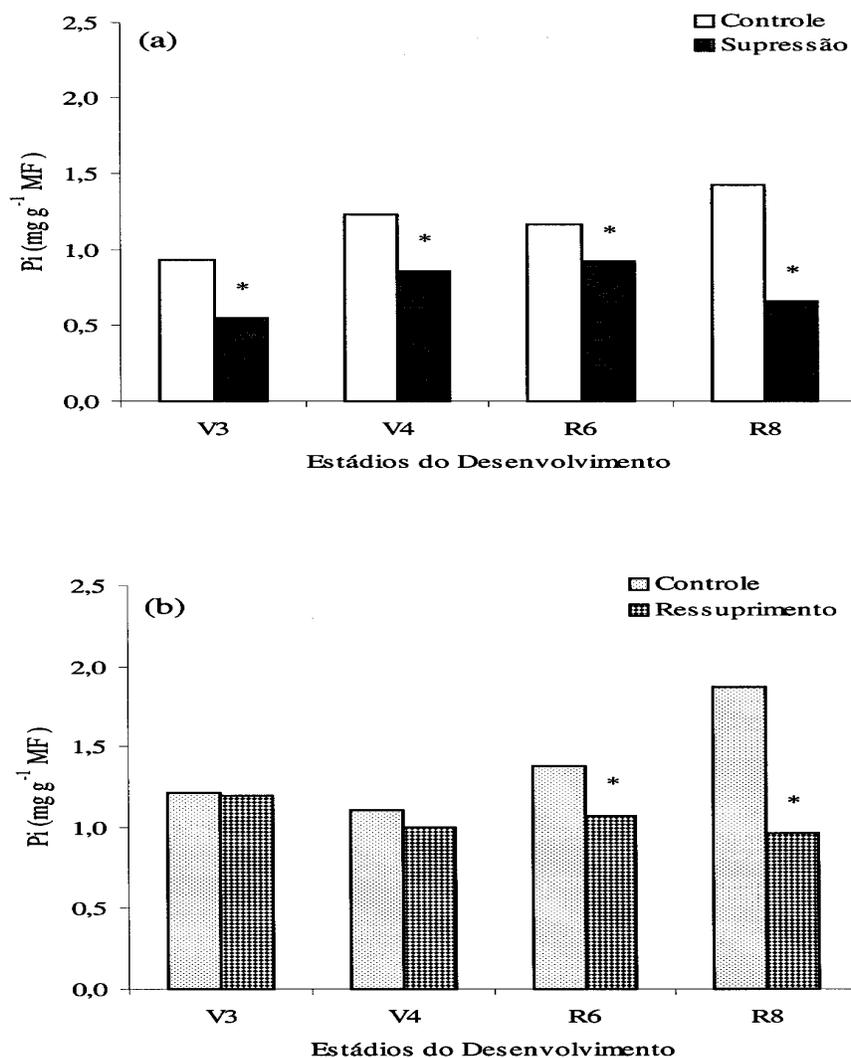


Figura 1 - Teores de fósforo (Pi) na matéria fresca (MF) de folhas (A, B), raízes (C, D) e nódulos (E, F) de plantas de alfafa sob supressão e ressuprimento de fósforo, nos estádios V3, V4, R6 e R8. (*) Diferença significativa a 5% de probabilidade de erro, pelo teste F, em cada estágio.

1B), provavelmente ocorreu em razão da queda na absorção e/ou maior translocação de Pi das folhas amostradas ou do Pi absorvido, diretamente para as flores e frutos.

Os teores de Pi nas raízes das plantas sob supressão (Figura 1C), somente mostraram diferenças significativas nos estádios vegetativos em relação às plantas do tratamento controle.

Com o ressuprimento, os teores de Pi das raízes nos estádios vegetativos não alcançaram valores similares ao tratamento controle (Figura 1D). De modo geral, nos estádios reprodutivos tanto nas

plantas sob supressão bem como nas plantas sob ressuprimento os teores de Pi nas raízes foram menores em relação aos estádios vegetativos. Esses teores, menores nas raízes, em relação aos das folhas nos estádios reprodutivos, podem ser decorrentes da maior remobilização do Pi para a parte aérea (Figura 1A) e, possivelmente, para as flores e os frutos. Em plantas de feijão, sob baixos níveis de Pi, observou-se redução nos teores de Pi nas raízes, durante os estádios reprodutivos e aumento desse elemento nas gemas e sementes (SNAPP & LYNCH, 1996).

Nos nódulos, os teores de Pi nas plantas de alfafa submetidas ao tratamento de supressão diferiram significativamente ao das plantas do tratamento controle em todos os estádios analisados (Figura 1E). Nos estádios vegetativos, esses teores foram mais elevados, tanto nas plantas do tratamento controle como nas plantas dos tratamentos sob supressão, quando comparados com os das plantas de soja, submetidas ao mesmo tratamento por um período de sete dias (SILVA, 1998).

Após o ressuprimento, os teores de Pi alcançaram valores similares aos das plantas do tratamento controle, exceto em V3 (Figura 1F).

O aumento na concentração de Pi nos nódulos de plantas sob deficiência tem sido atribuído a mecanismos de remobilização e transporte desse elemento de outros órgãos da planta, além da indução na síntese de fosfatases nos bacteróides em nódulos de feijoeiro, o que resultaria em aumento na disponibilidade e na taxa de transporte de Pi (AL-NIEMI *et al.*, 1997). A atividade dessas fosfatases nos bacteróides é maior durante os estádios vegetativos, reduzindo-se, aproximadamente, em 75%, durante os estádios reprodutivos (AL-NIEMI *et al.*, 1997). Essas observações podem também ser

admitidas para a alfafa e relacionadas com a redução nos teores de Pi nos nódulos em R6 e R8 (Figura 1E).

Os teores de Pi nos nódulos das plantas de alfafa (Figura 1E), foram superiores àqueles das raízes em todos os estádios avaliados (Figura 1C) e, quando comparados aos teores nas folhas (Figura 1A), somente nos estádios V3 e V4. Dessa forma, pode-se inferir que, em condições subótimas de suprimento de Pi, os nódulos mantêm uma concentração relativamente alta desse elemento. Em plantas de alfafa, submetidas a condições limitantes de Pi, os teores de Pi foram superiores nos nódulos em relação aos das raízes e da parte aérea (DREYON & HARTWING, 1997). Em diferentes cultivares de *Vigna acotifolia*, os teores de Pi, nos nódulos, foram relativamente mais elevados que na parte aérea (CHAUDHARY & FUJITA, 1998).

Os teores de aminoácidos totais nas folhas (Figura 2A), e nas raízes (Figura 2C), das plantas sob supressão foram menores, em relação aos das plantas do tratamento controle, em todos os estádios do desenvolvimento, demonstrando a importância do Pi, tanto no processo de fixação do N₂ quanto nos processos de assimilação do nitrogênio

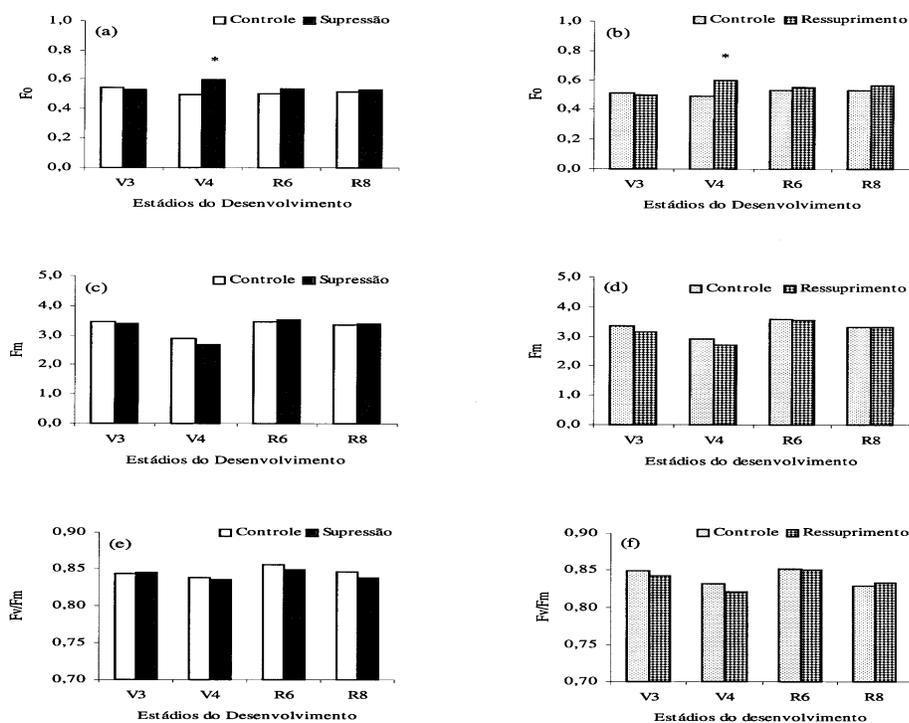


Figura 2 - Teores de aminoácidos totais na matéria fresca (MF) de folhas (A, B) e raízes (C, D) de plantas de alfafa sob supressão e ressuprimento de fósforo, nos estádios V3, V4, R6 e R8. (*) Diferença significativa a 5% de probabilidade de erro, pelo teste F, em cada estádio.

biologicamente fixado. As leguminosas, quando em simbiose com bactérias fixadoras de N₂, são particularmente mais afetadas em seu desenvolvimento em solos com baixa disponibilidade de Pi. Em plantas de soja (SÁ & ISRAEL, 1991) e de alfafa (DREVON & HARTWING, 1997), submetidas a baixos níveis de Pi, a atividade da nitrogenase foi significativamente menor que nas plantas do tratamento controle. As plantas de alfafa (COLLINS *et al.*, 1986), soja (ISRAEL, 1987) e feijão (PEREIRA & BLISS, 1987; ARAUJO *et al.*, 1997) respondem positivamente à fertilização de Pi. A aplicação de fertilizantes fosfatados aumentou a atividade específica da nitrogenase, a concentração do nitrogênio na parte aérea e a matéria seca de plantas de feijão (AL-NIEMI *et al.*, 1997).

Os teores de aminoácidos totais nas folhas foram maiores no estágio V4, tanto nas plantas sob supressão quanto nas plantas do tratamento controle, reduzindo-se de forma gradual nos estádios R6 e R8. A redução em R6 e, em maior proporção em R8, nas folhas, provavelmente, está relacionada com a translocação dos aminoácidos na seiva do xilema para os órgãos reprodutivos da planta. Após o ressurgimento, observa-se uma recuperação nos teores de aminoácidos totais nas folhas, nos estádios vegetativos, enquanto nos estádios reprodutivos esses teores mantiveram-se menores do que no tratamento controle (Figura 2B). A não-recuperação nos teores de aminoácidos totais nas folhas nos estádios reprodutivos pode estar relacionada com a menor síntese em razão da baixa concentração de Pi nas folhas e/ou, com o maior transporte e acúmulo de aminoácidos para as flores e frutos.

Nas raízes das plantas sob supressão, os teores de aminoácidos foram estatisticamente diferentes do controle e aumentaram dos estádios V3 até R6 diminuindo em R8 (Figura 2C). Esses aumentos nos teores de aminoácidos totais nas raízes são compatíveis com o estágio de completo florescimento, quando o processo de fixação do N₂ se intensifica.

Após o ressurgimento, a recuperação nos teores de aminoácidos totais nas raízes ocorreu em todos os estádios do desenvolvimento (Figura 2D). Provavelmente, essa recuperação pode estar relacionada com a maior

translocação de aminoácidos para esses órgãos, em razão do aumento no processo de fixação do N₂.

É sabido que a composição de aminoácidos e amidas na seiva do xilema é alterada em função da fertilização e do estágio do desenvolvimento da planta (OHTAKE *et al.*, 1995). Neste ensaio, o período de supressão de Pi não foi suficiente para influenciar a proporção de aminoácidos livres na seiva do xilema das plantas de alfafa (Tabela 1). A asparagina foi o aminoácido em maior concentração em relação aos demais, tanto nas plantas sob supressão quanto nas submetidas ao ressurgimento (Tabela 1). Resultados similares foram encontrados em plantas de alfafa e trevo noduladas, em que a asparagina foi o principal composto nitrogenado na seiva do xilema, seguindo-se o aspartato e a glutamina (MAXWELL *et al.*, 1984).

Os teores de aspartato diminuíram no tratamento sem Pi nos estádios V3 e V4 e, posteriormente, aumentaram nos estádios R6 e R8 em relação ao tratamento controle (Tabela 1). Essa diferença entre os estádios pode estar relacionada com a atividade das enzimas aspartase e sintetase da asparagina. Os teores de glutamato, serina, glicina, arginina e alanina, encontrados em maior proporção nos estádios reprodutivos, em relação aos

Tabela 1 – Composição de aminoácidos livres na seiva do xilema de plantas de alfafa sob supressão e ressurgimento de fósforo, nos estágios V3, V4, V6 e R8.

	V3C	V3S	V4C	V4S	R6C	R6S	R8C	R8S
	mol %							
Asp	22,1	17,2	22,2	21,2	16,4	21,1	12,4	13,1
Glu	0,4	0,6	0,9	1,0	2,8	3,0	9,0	10,5
Asn	55,3	54,5	51,5	49,8	57,0	52,9	55,2	45,8
Ser	1,1	2,4	1,9	2,3	3,4	3,2	2,1	4,5
Gln	16,9	17,7	17,4	18,9	6,7	8,6	6,4	8,6
Gly	0,7	1,2	1,0	1,1	1,2	1,6	1,5	1,6
Arg	0,4	0,5	0,4	0,5	3,0	2,2	3,5	4,0
Ala	0,7	2,3	1,1	1,3	1,7	1,8	1,1	2,6
Outros	2,4	3,6	3,6	3,8	7,7	5,6	8,7	9,3
	V3C	V3R	V4C	V4R	R6C	R6R	R8C	R8R
	mol %							
Asp	13,57	17,65	17,57	22,78	12,64	16,37	12,78	13,21
Glu	0,37	0,66	1,35	1,62	5,88	6,80	7,90	8,24
Asn	54,69	58,06	49,71	51,97	51,52	53,97	46,53	49,31
Ser	2,35	1,49	1,84	3,31	2,67	3,40	3,93	3,80
Gln	23,72	18,25	20,77	10,74	11,52	6,75	8,79	5,68
Gly	0,74	0,77	0,66	2,21	1,15	1,64	1,5	1,57
Arg	0,50	0,50	0,85	1,04	4,90	3,05	6,44	3,64
Ala	1,22	0,82	0,87	0,10	1,94	1,74	2,59	1,99
Outros	2,8	1,8	6,4	6,2	7,8	6,3	9,5	12,6

C = Controle; S = Supressão; R = Ressurgimento

vegetativos, tanto sob supressão quanto após o ressuprimento, demonstram a existência de variação na concentração de aminoácidos durante os diferentes estádios do desenvolvimento.

CONCLUSÕES

O período de supressão de fósforo interferiu no processo de fixação biológica do N₂, avaliado pelos teores de aminoácidos nas plantas de alfafa. No entanto, a recuperação nos teores de aminoácidos nas raízes após o ressuprimento sugere que o período de supressão não causou danos irreversíveis ao processo de fixação do N₂. A composição de aminoácidos livres na seiva do xilema não foi alterada pela supressão de fósforo, embora tenham sido observadas mudanças na porcentagem de alguns aminoácidos entre os estádios vegetativos e reprodutivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-NIEMI, T.S., KAHN, M., L., McDERMOTT, T.R.P. Metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, n.4 p.1233-1242, 1997.
- ARAUJO, A.P., TEIXEIRA, M.G., ALMEIDA, D.L. Phosphorus efficiency of wild and cultivated genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under biological nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.951-957, 1997.
- BENSON, J.R., HARE, P.E. O-phthalaldehyde fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorecamine and ninhydrin. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v.72, n.2, p.619-629, 1975.
- CHAUDHARY, M.I., FUJITA, K. Comparison of phosphorus deficiency effects on the growth parameters of mashbean, mungbean, and soybean. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tóquio, v.44, n.1, p. 19-30, 1998.
- COLLINS, M., LANG, D.J., KELLING, K.A. Effects of phosphorus, potassium, and sulfur on alfalfa nitrogen-fixation under field conditions. **Agronomy Journal**, Madison, v.78, n.6, p.959-963, 1986.
- DREVON, J.J., HARTWING, V.A. Phosphorus deficiency increases the argon-induced decline of nodule nitrogenase activity in soybean and alfalfa. **Planta**, Berlin, v.201, n.4, p.463-469, 1997.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. California: California Agricultural Experimental Station, 1950. 32p. (Circ., 347).
- HOUGE, E., WILCOX, G.E., CANTLIFFE, D.J. Effect of soil phosphorus level on phosphate fractions in tomato leaves. **American Society for Horticultural Science Journal**, Alexandria, v.95, n.1, p.174-176, 1970.
- ISRAEL, D.W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v.84, n.3, p.835-840, 1987.
- JARRET, H.W., COOKSY, K.D., ELLIS, B. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.153, n.1, p.189-198, 1986.
- LINDEMAN, W. Observations on the behavior of phosphate compounds in *Chorela* at the transition from dark to light. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PEACEFUL USES OF ATOMIC ENERGY, 1958. **Proceedings...** New York : Academic, 1958. V.24, n.1, p.8-15.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London : Academic, 1995. 889p.
- MAXWELL, C.A., VANCE, C.P., HEICHEL, G.H., *et al.* CO₂ fixation in alfalfa and birdsfoot trefoil root nodules and partitioning of ¹⁴C to the plant. **Crop Science**, Madison, v.24, p.257-264, 1984.
- OHTAKE, N., NISHIWAKI, T., MIZUKOSHI, K. Amino acid composition in xylem sap of soybean related to the evaluation of N₂ fixation by the relative ureide method. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tóquio, v.41, n.1, p.95-102, 1995.
- PEREIRA, P.A.A., BLISS, F.A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different level of phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.104, n.1, p.79-84, 1987.
- QIU, J., ISRAEL, D.W. Diurnal starch accumulation and utilization in phosphorus-deficient soybean plant. **Plant Physiology**, Rockville, v.98, p.316-323, 1992.
- RENA, A.B., MASCIOTTI, Z. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.23, n.128, p.288-301, 1976.
- RIBET, J., DREVON, J.J. Phosphorus deficiency increases the acetylene-induced decline in nitrogenase activity in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, n.291, p.1479-1486, 1995.
- SÁ, T.M., ISRAEL, D.W. Nitrogen assimilation in nitrogen-fixing soybean plants during phosphorus deficiency, **Crop Science**, Madison, v.35, n.3, p.814-820, 1995.
- SILVA, D.M. **Crescimento, fotossíntese e metabolismo do nitrogênio em plantas de soja noduladas sob omissão e ressuprimento de fósforo**. Viçosa, 1998. 117p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- SMILLIE, R.M., KROTKOV, G. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.38, p.31-49, 1960.
- SNAPP, S.S., LYNCH, J.P. Phosphorus distribution and remobilization in bean plants as influenced by phosphorus nutrition. **Crop Science**, Madison, v.36, n.4, p.929-935, 1996.
- TWARY, S.N., HEICHEL, G.H. Carbon cost of dinitrogen fixation associated with dry matter accumulation in alfalfa. **Crop Science**, Madison, v.31, n.4, p.985-992, 1991.
- VANCE, C.P., HEICHEL, G.H., BARNES, D.K., *et al.* Nitrogen fixation, nodule development and vegetative regrowth of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following harvest. **Plant Physiology**, Rockville, v.64, n.1, p.1-8, 1979.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. London : Blackwell Scientific, 1970. 164p. (IPB Handbook, 15).