

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Respostas fisiológicas, metabólicas, estruturais e produtivas do capim-  
marandu às disponibilidades de fósforo e zinco**

**Lucíola Ellen Calió Martins**

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre em Ciências. Área de  
concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba  
2010**

**Lucíola Ellen Calió Martins**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Respostas fisiológicas, metabólicas, estruturais e produtivas do capim-marandu às disponibilidades de fósforo e zinco**

Orientador:  
Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba**  
**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Martins, Lucíola Ellen Calió

Respostas fisiológicas, metabólicas, estruturais e produtivas do capim-marandu às disponibilidades de fósforo e zinco / Lucíola Ellen Calió Martins. - - Piracicaba, 2010.  
53 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.  
Bibliografia.

1. Brachiaria 2. Capim-marandu 3. Desenvolvimento vegetal 4. Folhas (Plantas) 5. Fósforo  
6. Fotossíntese 7. Perfilhos 8. Produção vegetal 9. Sistema radicular 10. Zinco I. Título

CDD 633.2  
M385r

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**





*Aos meus amados pais **Umberto e Querêm** e à minha querida irmã **Fabiola**,  
pelo amor e confiança e por compartilharem dos meus sonhos.  
Amo muito vocês.*

*Aos meus amigos **Adriana, Cristiane, Elisângela, Fábiana, Fabiano, Marcio e Tiago**,  
pelo carinho e paciência.  
Sentirei saudade.*

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e sorte e à minha família, pelo amor.

Em especial, ao professor Francisco Antonio Monteiro, por acreditar em mim, pela orientação e paciência, o meu respeito e gratidão.

Ao professor Godofredo Cesar Vitti, pelos ensinamentos, amizade e carinho, o meu afeto, admiração e estima.

Ao pesquisador Bruno Carneiro e Pedreira, pela dedicação, incentivo e exemplo de profissionalismo, o meu carinho, admiração e gratidão.

Ao professor Quirino Augusto de Camargo Carmello e demais professores do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao professor Carlos Guilherme Silveira Pedreira, pela solicitude e empréstimo do medidor portátil de fotossíntese, a minha gratidão.

À professora Hermínia Emília Prieto Martinez (UFV), pela disposição e doação da resina trocadora de ânions, a minha gratidão.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, e ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores Enes Furlani Júnior e Salatiér Buzetti (UNESP Ilha Solteira), pelos ensinamentos e exemplo de profissionalismo, o meu apreço.

Às funcionárias do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas Edinéia Mondoni, Lúcia Forti, Lurdes González, Sueli Bovi e, em especial, à Nivanda Ruiz, pelo carinho e dedicação, a minha gratidão.

Aos amigos Adenilson Paiva, Carlos Nascimento, Carolina Brandani, Diego do Vale, Elaine Guedes, Eloana Bonfleur, Guilherme Congio, Gustavo Geraldo, Leandro Barbero, Letícia Faria, Luísa Pissioni, Maísa Honório, Michele Megda, Thalita Abbruzzini, Renata Alvarenga, Roberta Nogueirol e Sueli Rodrigues, pelos momentos de alegria, a minha saudade.

Ao grupo de estagiários da Nutrição Mineral de Plantas, pelos bons momentos e pelo apoio, o meu carinho e gratidão.





*“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”*

**John Ruskin**



## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	17
2 FOTOSÍNTESE E EXPANSÃO FOLIAR DO CAPIM-MARANDU À DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E ZINCO.....	21
Resumo.....	21
Abstract.....	21
2.1 Introdução.....	22
2.2 Material e métodos.....	23
2.2.1 Solução nutritiva e colheita das plantas.....	23
2.2.2 Número de folhas, área foliar e massa de forragem.....	25
2.2.3 Parâmetros de trocas gasosas e nutrição.....	25
2.2.4 Concentração do aminoácido triptofano.....	26
2.2.5 Análise estatística.....	26
2.3 Resultados.....	26
2.3.1 Concentração de fósforo nas lâminas de folhas recém-expandidas.....	26
2.3.2 Parâmetros de trocas gasosas.....	27
2.3.3 Nitrogênio.....	29
2.3.4 Número de folhas, área foliar e massa de forragem.....	30
2.3.5 Concentração do aminoácido triptofano.....	32
2.4 Discussão.....	33
Referências.....	34
3 MODIFICAÇÕES METABÓLICAS, PERFILAMENTO E SISTEMA RADICULAR DO CAPIM-MARANDU EM RESPOSTA À DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E ZINCO.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	39
3.1 Introdução.....	40

3.2 Material e métodos.....	41
3.2.1 Solução nutritiva e colheita das plantas.....	41
3.2.2 Número de perfilhos e sistema radicular.....	42
3.2.3 Concentração, conteúdo e índice de utilização de fósforo.....	43
3.2.4 Atividade da enzima fosfatase ácida.....	43
3.2.5 Análise estatística.....	43
3.3 Resultados.....	43
3.3.1 Concentração, conteúdo e índice de utilização de fósforo.....	44
3.3.2 Atividade da enzima fosfatase ácida.....	45
3.3.3 Número de perfilhos e sistema radicular.....	46
3.4 Discussão.....	48
Referências.....	49
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	53

## RESUMO

### **Respostas estruturais, fisiológicas, metabólicas e produtivas do capim-marandu às disponibilidades de fósforo e zinco**

As disponibilidades de fósforo e zinco afetam as características estruturais, fisiológicas, metabólicas e produtivas das plantas, com reflexos no estabelecimento e produção de forragem da gramínea forrageira. Objetivou-se identificar e quantificar as alterações nas concentrações foliares de fósforo e zinco, trocas gasosas, concentração do aminoácido triptofano, atividade da enzima fosfatase ácida, área foliar, números de folhas e de perfilhos, sistema radicular e massa de forragem da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em resposta ao suprimento de fósforo e zinco. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, em Piracicaba (SP), Brasil, no período de janeiro a abril de 2010. Foram avaliadas as combinações de cinco doses de fósforo (0,1; 0,6; 1,1; 1,6 e 2,1 mmol L<sup>-1</sup>) com cinco doses de zinco (0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 3,00 μmol L<sup>-1</sup>), em solução nutritiva, em fatorial 5<sup>2</sup> fracionado. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, com quatro repetições. Realizaram-se duas colheitas do capim-marandu, sendo a primeira aos 38 dias após o transplantio e a segunda aos 30 dias da rebrotação. O fornecimento de fósforo propiciou incremento na taxa fotossintética foliar e na condutância estomática e decréscimo na concentração de CO<sub>2</sub> intercelular, no segundo período de crescimento do capim-marandu. A concentração foliar de nitrogênio não foi limitante ao desenvolvimento das plantas, durante todo o experimento. A disponibilidade de zinco resultou em aumento da concentração de triptofano, no segundo período de crescimento da gramínea forrageira. A atividade da enzima fosfatase ácida e o índice de utilização de fósforo diminuíram com o aumento da disponibilidade de fósforo. Os números de folhas e de perfilhos e os parâmetros radiculares ajustaram-se exponencialmente em resposta às doses de fósforo. A interação doses de fósforo x doses de zinco foi significativa para as variáveis área foliar e massa de forragem, no segundo período de crescimento do capim-marandu. A elevada eficiência de utilização de fósforo foi confirmada pela alta atividade da fosfatase ácida e o suprimento de fósforo foi determinante para o perfilhamento e desenvolvimento do sistema radicular da gramínea forrageira. As disponibilidades de fósforo e zinco afetaram a produção de forragem do capim-marandu como reflexo da alteração na área foliar do dossel.

Palavras-chave: Área foliar; Assimilação de CO<sub>2</sub>; *Brachiaria brizantha*; Eficiência de utilização de fósforo; Fosfatase ácida; Perfilhamento; Sistema radicular; Triptofano



## ABSTRACT

### **Physiological, metabolic, structural and productive responses of Marandu palisadegrass to phosphorus and zinc availabilities**

The availability of phosphorus (P) and zinc (Zn) affects physiological, metabolic, structural and production characteristics, which can influence forage grass establishment and production. The objective of the present study was to identify and quantify changes in leaf concentrations of P and Zn, gas exchange, amino acid tryptophan concentration, acid phosphatase enzyme activity, leaf area, number of leaves and tillers, root and forage mass of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Marandu palisadegrass), in response P and Zn supply. The experiment was carry out in a greenhouse at Piracicaba, São Paulo State, Brazil, from January to April, 2010. Five rates of P (0.1, 0.6, 1.1, 1.6 and 2.1 mmol L<sup>-1</sup>) and five rates of Zn (0.00, 0.75, 1.5, 2.25 and 3.00 µmol L<sup>-1</sup>) were tested in a 5<sup>2</sup> fractioned factorial. The experimental used was randomized block design with four replications. Plant shoots were harvested 38 d after transplanting and 30 d after the first harvest. P supply resulted in increased leaf photosynthetic rate and stomatal conductance and decrease in intercellular CO<sub>2</sub> concentration in the second growth period of Marandu palisadegrass. The leaf concentration of nitrogen (N) was not limiting to plant development throughout the experiment. Zn supply increased the tryptophan concentration in second growth period of forage grass. The acid phosphatase enzyme activity and the P use index decreased with the increased availability of P. The number of leaves and tillers and root parameters were exponentially adjusted as a function of P rates. The interaction P rates x Zn rates was significant for the variables leaf area and forage mass in the second growth period of Marandu palisadegrass. The high P use efficiency was confirmed by the high acid phosphatase enzyme activity and the P supply was determinant for the tillering and root systems development of the forage grass. P and Zn availabilities affected the forage production of Marandu palisadegrass reflecting the change in canopy leaf area.

Keywords: Acid phosphatase; *Brachiaria brizantha*; CO<sub>2</sub> assimilation; Leaf area; Phosphorus use efficiency; Root system; Tillering; Tryptophan





## 1 INTRODUÇÃO

A atividade pecuária brasileira foi desenvolvida e se mantém com base na criação de animais se alimentando em pastagens. Extensas áreas de pastagens cobrem grande parte do Brasil, estendendo-se desde os campos nativos do pampa brasileiro até as vastas áreas de pastagens cultivadas nos cerrados e na região amazônica. Nas pastagens cultivadas, as gramíneas tropicais do gênero *Brachiaria* dominam o cenário atual pela adaptabilidade às variadas condições de clima e solo, além do potencial de produção de forragem para consumo animal. O metabolismo fisiológico C<sub>4</sub> confere a essas plantas alta eficiência no uso da radiação solar, elementos essenciais do solo e água (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A maior parte da exploração do sistema de produção de bovinos brasileiro desenvolve-se em pastos formados pela *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (MITIDIARI, 2003), localizados na região dos cerrados, ocupando solos com reconhecidas limitações de fertilidade. A baixa disponibilidade de fósforo é uma das condições mais restritivas à produção das pastagens nesses solos, em função da elevada acidez e capacidade de adsorção de fosfato, e a disponibilidade limitada de zinco dos solos dos cerrados, devida ao baixo teor do nutriente no material de origem, pode ser determinante para o desenvolvimento das plantas forrageiras.

A essencialidade do fósforo para as plantas decorre de sua participação nas membranas celulares, fosfolipídios, ácidos nucleicos e em compostos que armazenam, transportam e fornecem energia e, conseqüentemente, em processos metabólicos, como fotossíntese, síntese de carboidratos, proteínas, lipídeos e absorção ativa de nutrientes. O zinco é fundamental para o desenvolvimento vegetal, pois é catalisador e componente estrutural de enzimas, está associado ao metabolismo de proteínas, carboidratos e auxinas e é requerido para manter a integridade das membranas celulares (MARSCHNER, 1995).

A produção de forragem em pastagens depende do desenvolvimento da área foliar do dossel e, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, o crescimento foliar pode ser limitado pela expansão celular insuficiente, pela redução na capacidade fotossintética das plantas ou pela ação conjunta desses fatores.

O suprimento limitado de fósforo reduz a área foliar total e a taxa fotossintética de folhas individuais, e, conseqüentemente, a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> das plantas (MASON et al., 2000; CHIERA; THOMAS; RUFTY, 2002), pela redução no número de folhas e na área foliar

individual da gramínea forrageira (RODRÍGUEZ et al., 1998; CHIERA; THOMAS; RUFTY, 2002). A deficiência de fósforo limita o transporte de fotoassimilados para os drenos da gramínea forrageira, resultando em baixa produção (DENTON et al., 2007; MANTLANA et al., 2008; REICH; OLEKSYN; WRIGHT, 2009).

A disponibilidade limitada de zinco comumente diminui a síntese ou aumenta a degradação de auxinas, em particular do ácido indolacético (CAKMAK; MARSCHNER; BANGERTH, 1999), restringindo a produção de massa pela redução do desenvolvimento da planta em área foliar e altura (SALAMI; KENEFICK, 1970; MARSCHNER, 1995). A deficiência de zinco também influencia o metabolismo do ácido indolacético pela redução na síntese do aminoácido triptofano, precursor da biossíntese dessa auxina (TAIZ; ZEIGER, 2009; ZHAO, 2010).

Para permitir a aquisição e a utilização de fósforo em ambiente onde o suprimento desse nutriente é limitante, as plantas desenvolveram mecanismos que aumentam o conteúdo de fósforo absorvido e afetam a eficiência em utilizar este nutriente para a produção de biomassa. Os processos que propiciam o aumento da absorção de fósforo incluem o maior crescimento radicular associado a mudanças na distribuição e expansão da superfície radicular. Os mecanismos que aumentam a eficiência de utilização do nutriente envolvem a redução na taxa de crescimento das plantas, a remobilização de fósforo e as modificações no metabolismo do carbono (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003).

A adaptação das plantas à baixa disponibilidade de fósforo é favorecida por processos que aumentam a eficiência de utilização do nutriente (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003; JAIN et al., 2007), como o incremento da atividade da enzima fosfatase ácida em plantas deficientes em fósforo (YUN; KAEPLER, 2001; GAUME et al., 2010). A fosfatase ácida está associada à remobilização do nutriente e a elevada atividade dessa enzima está relacionada à baixa concentração de fósforo inorgânico nas plantas (BALDWIN; KARTHKEYAN; RAGHOTHAMA, 2001; BOZZO; DUNN; PLAXTON, 2006). Assim, é razoável assumir que a enzima fosfatase ácida está associada à translocação de fósforo dos tecidos velhos para os jovens, em condição de baixa disponibilidade do nutriente.

O mecanismo difusivo de contato fosfato/raiz limita a absorção do nutriente pelas plantas, as quais respondem a essa restrição com o aumento do desenvolvimento das raízes (HODGE, 2004; HERMANS et al., 2006; HAMMOND; WHITE, 2008). Sistemas radiculares mais extensos

umentam a área de contato entre as raízes e o substrato, sendo a absorção do íon fosfato frequentemente relacionada ao comprimento radicular. A distribuição radicular, associada ao comprimento das raízes, indica a capacidade do sistema radicular de exploração do meio e a morfologia radicular, relacionada à superfície das raízes, refere-se ao volume de substrato que pode ser explorado pelas raízes (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003).

O sistema radicular é fundamental para garantir o processo de perfilhamento, característica estrutural responsável pela formação, produtividade e longevidade das pastagens formadas por gramíneas (LANGER, 1963). O perfilho é a unidade básica de produção e o perfilhamento é o principal mecanismo de perenização dessas plantas (HODGSON, 1990). O fósforo é o nutriente mais importante no período inicial de desenvolvimento das gramíneas forrageiras, com grande influência no perfilhamento, sendo o comprometimento no estabelecimento das plantas atribuído à baixa disponibilidade desse elemento.

A produção de massa do capim-marandu é o resultado do processo de crescimento e desenvolvimento dos seus órgãos, cuja intensidade está relacionada ao equilíbrio fisiológico e metabólico da planta. As disponibilidades de fósforo e zinco podem afetar as características fisiológicas, metabólicas, estruturais e produtivas, com reflexos no estabelecimento e produção de forragem da gramínea forrageira. Dessa forma, objetivou-se identificar e quantificar as alterações nas concentrações foliares de fósforo e zinco, trocas gasosas, concentração do aminoácido triptofano, atividade da enzima fosfatase ácida, área foliar, números de folhas e de perfilhos, sistema radicular e produção de massa de forragem do capim-marandu, em resposta ao suprimento de fósforo e zinco.

## Referências

BALDWIN, J.C.; KARTHIKEYAN, A.S.; RAGHOTHAMA, G. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 125, p. 728-737, 2001.

BOZZO, G.G.; DUNN, E.L.; PLAXTON, W.C. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 29, p. 303-313, 2006.

CAKMAK, I.; MARSCHNER, H.; BANGERTH, F. Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 40, p. 405-412, 1989.

CHIERA, J.; THOMAS, J.; RUFTY, T. Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, p. 473-481, 2002.

DENTON, M.; VENEKLAAS, E.J.; FREIMOSER, F.M.; LAMBERS, H. Banksia species (Proteaceae) from severely phosphorus-impooverished soils exhibit extreme efficiency in the use and remobilization of phosphorus. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 30, p. 1557-1565, 2007.

GAUME, A.E.L.; RAO, I.M.; GAUME, A.J.; FROSSARD, E. A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. **Plant and Soil**, Crawley, v. 328, p. 155-164, 2010.

HAMMOND, J.P.; WHITE, P.J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p.93-109, 2008.

HERMANS, C.; HAMMOND, J.P.; WHITE, P.J.; VERBRUGGEN, N. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 610-617, 2006.

HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. **New Phytologist**, Malden, v. 162, p. 9-14, 2004.

HODGSON, J. **Grazing management: science into practice**. New York: John Wiley; Longman Scientific and Technical, 1990. 203 p.

JAIN, A.; VASCONCELOS, M.J.; RAGHOTHAMA, K.G.; SAHI, S.V. Molecular mechanisms of plant adaptation to phosphate deficiency. **Plant Breeding Reviews**, Korbeek, v. 29, p.359-419, 2007.

LANGER, R.H.M. Tillering in herbage grasses. **Herbage Abstract**, Lawrence, v. 33, p. 141-148, 1963.

MANTLANA, K.B.; ARNETH, A.; VEENENDAAL, E.M.; WOHLAND, P.; WOLSKI, P.; KOLLE, O.; WAGNER, M.; LLOYD, J. Photosynthetic properties of C<sub>4</sub> plants growing in an African savanna/wetland mosaic. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p. 3941-3952, 2008.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.

MASON, P.A.; INGLEBY, K.; MUNRO, R.C.; WILSON, J.; IBRAHIM, K. Interactions of nitrogen and phosphorus on mycorrhizal development and shoot growth of *Eucalyptus globulus* (Labill.) seedlings inoculated with two different ectomycorrhizal fungi. **Forest Ecology and Management**, Ringwood, v. 128, p. 259-268, 2000.

MITIDIERI, F.J. Mais do que nunca, o “boi de capim” agrega valor. In: FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **ANUALPEC 2003: anuário da pecuária brasileira**. São Paulo, 2003. p. 51-52.

- REICH, P.B.; OLEKSYN, J.; WRIGHT, I.J. Leaf phosphorus influences the photosynthesis-nitrogen relation: a cross-biome analysis of 314 species. **Oecologia**, Marburg, v. 160, p. 207-212, 2009.
- ROGRÍGUEZ, D.; ZUBILLAGA, M.M.; PLOCHUK, E.L.; KELTJENS, W.G.; GOUDRIAAN, J.; LAVADO, R.S. Leaf area expansion and assimilate production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) growing under low phosphorus conditions. **Plant and Soil**, Crawley, v. 202, p. 133-147, 1998.
- SALAMI, A.U.; KENEFICK, D.G. Stimulation of growth in zinc-deficient corn seedlings by the addition of tryptophan. **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 291-294, 1970.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.
- VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLEN, D.L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Malden, v. 157, p. 423-447, 2003.
- YUN, S.J.; KAEPLER, S.M. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. **Plant and Soil**, Crawley, v. 237, p. 109-115, 2001.
- ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, San Diego, v. 61, p. 49-64, 2010.



## 2 FOTOSSÍNTESE E EXPANSÃO FOLIAR DO CAPIM-MARANDU À DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E ZINCO

### Resumo

A deficiência nutricional é um dos principais fatores limitantes da produtividade, restringindo a capacidade fotossintética e o desenvolvimento das plantas. Objetivou-se identificar e quantificar as modificações fisiológicas e metabólicas que afetam a produção de forragem da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, submetida a doses de fósforo e zinco. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, em Piracicaba (SP), Brasil, no período de janeiro a abril de 2010. Foram avaliadas as combinações de cinco doses de fósforo (0,1; 0,6; 1,1; 1,6 e 2,1 mmol L<sup>-1</sup>) com cinco doses de zinco (0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 3,00 μmol L<sup>-1</sup>), em solução nutritiva, em fatorial 5<sup>2</sup> fracionado. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, com quatro repetições. Realizaram-se duas colheitas do capim-marandu, sendo a primeira aos 38 dias após o transplante e a segunda aos 30 dias da rebrotação. A interação doses de fósforo x doses de zinco foi significativa para as variáveis área foliar e massa de forragem, no segundo período de crescimento do capim-marandu. O fornecimento de fósforo propiciou incremento na taxa fotossintética foliar e a disponibilidade de zinco aumentou a concentração de triptofano, no segundo período de crescimento da gramínea forrageira. As disponibilidades de fósforo e zinco afetaram a produção de massa forragem do capim-marandu como reflexo da alteração na área foliar do dossel.

Palavras-chave: Área foliar; Assimilação de CO<sub>2</sub>; *Brachiaria brizantha*; Nitrogênio; Triptofano

### Abstract

Nutrient deficiency is one of the most important factors limiting plant productivity, decreasing photosynthesis efficiency and plant growth. The objective of the present study was to identify and quantify the physiologic and metabolic changes that interfere in the forage production of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Marandu palisadegrass) when grown in rates of phosphorus (P) and zinc (Zn). The experiment was carry out in a greenhouse at Piracicaba, São Paulo State, Brazil, from January to April, 2010. Five rates of P (0.1, 0.6, 1.1, 1.6 and 2.1 mmol L<sup>-1</sup>) and five rates of Zn (0.00, 0.75, 1.5, 2.25 and 3.00 μmol L<sup>-1</sup>) were tested in a 5<sup>2</sup> fractioned factorial. The experimental used was randomized block design with four replications. Plant shoots were harvested 38 d after transplanting and 30 d after the first harvest. The interaction P rates x Zn rates was significant for leaf area and forage mass, during the second growth period. P supply increased photosynthesis rate and Zn supply increased the tryptophan concentration during the second growth period. The availability of P and Zn interfered in the Marandu palisadegrass productivity by changing the canopy leaf area.

Keywords: *Brachiaria brizantha*; CO<sub>2</sub> assimilation; Leaf area; Nitrogen; Tryptophan



## 2.1 Introdução

A atividade pecuária brasileira foi desenvolvida e se mantém com base na criação de animais se alimentando em pastagens. O Brasil possui 196 milhões de hectares de pastagem, sendo 105 milhões de hectares de pastagens cultivadas, e 207 milhões de cabeças de bovinos, representando a quarta maior área de pastagem e o maior rebanho comercial do mundo (FAO, 2007). Nas pastagens cultivadas, as gramíneas tropicais do gênero *Brachiaria* dominam o cenário atual pela adaptabilidade às variadas condições de clima e solo, além do potencial de produção de forragem para consumo animal.

A produção de forragem em pastagens é o resultado do processo de crescimento e desenvolvimento dos seus órgãos, cuja intensidade está relacionada ao equilíbrio fisiológico e metabólico da planta. A eficiência do dossel na conversão da energia luminosa em massa depende da taxa fotossintética de folhas individuais, embora a utilização da energia solar possa ser limitada pela deficiência nutricional. A superfície de interceptação luminosa é representada pelas folhas, as quais, apesar de terem suas características determinadas geneticamente, podem ser influenciadas por fatores ambientais (PEDREIRA; PEDREIRA, 2007). O aumento da biomassa depende do desenvolvimento da área foliar do dossel e, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, o crescimento foliar pode ser limitado pela expansão celular insuficiente, pela redução na capacidade fotossintética das plantas ou pela ação conjunta desses fatores.

Ainda que o nitrogênio seja o nutriente mais comumente relacionado à fotossíntese, particularmente devido a sua participação na enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), que é o substrato para a fixação do CO<sub>2</sub> (FIELD; MOONEY, 1986), a disponibilidade de fósforo influencia o processo de fixação fotossintética do CO<sub>2</sub> e altera o desenvolvimento das plantas (WRIGHT et al., 2004; WHITEHEAD et al., 2005; CAMPBELL; SAGE, 2006; DENTON et al., 2007; MANTLANA et al., 2008; REICH; OLEKSYN; WRIGHT, 2009). A baixa concentração de fósforo na planta limita a capacidade fotossintética foliar por meio de mecanismos regulatórios, restringindo a regeneração e carboxilação da rubisco (LOUSTAU et al., 1999; CAMPBELL; SAGE, 2006; THOMAS; MONTAGU; CONROY, 2006a), eficiência do uso de luz (CONROY et al., 1986) e condutância estomática (KIRSCHBAUM; TOMPKINS, 1990; JACOB; LAWLOR, 1991).

A deficiência de fósforo limita a produção de massa (NANAMORI et al., 2004; GHANNOUM; CONROY, 2007; GHANNOUM et al., 2008; NUNES et al., 2008; GAUME et al., 2010) pela redução da atividade dos drenos e, indiretamente, pela redução na capacidade fotossintética das plantas (CHIERA; THOMAS; RUFTY, 2002). O baixo suprimento de fósforo resulta em reduzida área foliar, em consequência, principalmente, do pequeno número de folhas, pela restrição na taxa de aparecimento foliar, e, secundariamente, da limitação à expansão da folha (LYNCH; LÄUCHLI; EPSTEIN, 1991; RODRÍGUEZ et al., 1998; CHIERA; THOMAS; RUFTY, 2002).

A disponibilidade limitada de zinco comumente diminui a síntese ou aumenta a degradação de auxinas, em particular do ácido indolacético (CAKMAK; MARSCHNER; BANGERTH, 1999), restringindo a produção de massa pela redução do desenvolvimento da planta em área foliar e altura (SALAMI; KENEFICK, 1970; MARSCHNER, 1995). A deficiência de zinco também influencia o metabolismo do ácido indolacético pela redução na síntese do aminoácido triptofano, precursor da biossíntese dessa auxina (TAIZ; ZEIGER, 2009; ZHAO, 2010).

Considerando que o baixo suprimento de fósforo limita a capacidade fotossintética e a área foliar, bem como a deficiência de zinco restringe o crescimento foliar, comprometendo a produtividade das plantas, objetivou-se identificar e quantificar as modificações fisiológicas e metabólicas da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu que afetam a produção da planta forrageira, em função da disponibilidade de fósforo e zinco.

## **2.2 Material e métodos**

### **2.2.1 Solução nutritiva e colheita das plantas**

O estudo foi conduzido em solução nutritiva, sob condições controladas de ambiente, em Piracicaba-SP (22° 43' S, 47° 38' O), Brasil, no período de janeiro a abril de 2010, utilizando-se quartzo moído como substrato para o cultivo da gramínea forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em vasos de 3,6 L. Foram estudadas as combinações de cinco doses de fósforo (0,1; 0,6; 1,1; 1,6 e 2,1 mmol L<sup>-1</sup>) com cinco doses de zinco (0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 3,00 μmol L<sup>-1</sup>), em estudo de superfície de resposta, num fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, de acordo com Littell e Mott

(1975). O delineamento experimental foi o de blocos completos aleatorizados, com quatro repetições. As 13 combinações das doses de fósforo com as doses de zinco foram: 0,1-0; 0,1-1,50; 0,1-3,00; 0,6-0,75; 0,6-2,25; 1,1-0; 1,1-1,50; 1,1-3,00; 1,6-0,75; 1,6-2,25; 2,1-0; 2,1-1,50 e 2,1-3,00. O fósforo e o zinco foram fornecidos como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{ZnCl}_2$ , respectivamente.

A solução nutritiva foi preparada com base na solução completa de Hoagland e Arnon (1950), modificada para atender as doses de fósforo e zinco do experimento, e foi trocada a cada 14 dias. Para evitar a contaminação da solução pela presença indesejável de zinco, a qual poderia interferir nos resultados experimentais, foi realizada a purificação dos reagentes para análise, utilizados para compor cada solução estoque. Para a purificação das soluções de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{MgSO}_4$  foi utilizada a solução extratora de zinco, dissolvendo-se 10 mg de pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) em 100 mL de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) (WALLIHAN; BRADFORD, 1977). A solução estoque de Fe-EDTA foi purificada pela utilização de resina de troca aniônica, a qual retém o zinco quando o mesmo está presente em solução de HCl (KRAUS; MOORE, 1953; RUSH; YOE, 1954; WALLIHAN; BRADFORD, 1977). À solução de  $\text{FeCl}_3$  purificada foi adicionada solução quelante de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , obtendo-se a solução estoque de Fe-EDTA.

Tabela 2.1 - Volumes das soluções estoque empregadas no preparo das soluções nutritivas para as combinações de doses de fósforo e zinco

Fósforo ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	0,1	0,1	0,1	0,6	0,6	1,1	1,1	1,1	1,6	1,6	2,1	2,1	2,1
Zinco ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00
Solução estoque	Volume ( $\text{mL L}^{-1}$ )												
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	0,1	0,1	0,1	0,6	0,6	1,1	1,1	1,1	1,6	1,6	2,1	2,1	2,1
KCl ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	5,9	5,9	5,9	5,4	5,4	4,9	4,9	4,9	4,4	4,4	3,9	3,9	3,9
$\text{KNO}_3$ ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
$\text{MgSO}_4$ ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Micro-Zn*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe-EDTA**	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25
$\text{ZnCl}_2$ ***	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00

\* Composição da solução estoque de micronutrientes sem zinco ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{H}_3\text{BO}_3=2,86$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}=1,81$ ;  $\text{CuCl}_2=0,10$  e  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}=0,02$ .

\*\* Para preparar a solução de Fe-EDTA purificada, utilizou-se 10,8 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  diluído em 100 mL de HCl 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , adicionado a 14,88 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  diluído em 400 mL de água desionizada e completou-se o volume para 1 L.

\*\*\*  $\text{ZnCl}_2=0,136 \text{ g L}^{-1}$ .

Cada unidade experimental foi composta por cinco plantas por vaso, as quais foram submetidas a duas colheitas, sendo a primeira 38 dias após o transplante e segunda aos 30 dias

da rebrotação. O momento das colheitas foi determinado mediante observação visual do início do processo de senescência das folhas maduras, caracterizado pelo amarelecimento da lâmina foliar.

### 2.2.2 Número de folhas, área foliar e massa de forragem

O número de folhas, a área foliar e a massa de forragem foram quantificados na ocasião de cada colheita. Em cada unidade experimental, foi contabilizado o número de folhas, as quais foram destacadas e utilizadas para determinar a área foliar, com o auxílio do aparelho integrador de área foliar, modelo LI-3100 (LI-COR, Lincoln Nebraska, EUA). A massa de forragem foi determinada a partir do corte das plantas a 5 cm de altura do substrato, secagem do material vegetal em estufa de ventilação forçada a 65 °C até massa constante com posterior pesagem do material seco.

### 2.2.3 Parâmetros de trocas gasosas e nutrição

As variáveis taxa fotossintética foliar e as concentrações de fósforo, zinco e nitrogênio foram determinadas nas lâminas de folhas recém-expandidas, de acordo com Pedreira e Pedreira (2007) e Monteiro (2005), respectivamente. A taxa fotossintética líquida de folhas individuais, condutância estomática e concentração de CO<sub>2</sub> intercelular foram mensuradas no segundo período de crescimento, 30 dias após a rebrotação, utilizando-se medidor de fotossíntese portátil, modelo LI-6400 (LI-COR, Lincoln Nebraska, EUA), entre 8 e 11 h da manhã, em dia de céu claro. A intensidade de luz na câmara foliar foi de 2000  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e foi utilizada concentração média de CO<sub>2</sub> de 350  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , a qual foi conseguida pela utilização de cilindro de CO<sub>2</sub> acoplado ao aparelho. As concentrações de fósforo, zinco e nitrogênio foram determinadas por colorimetria, espectrofotometria de absorção atômica e titulometria, respectivamente (SARRUGE; HAAG, 1974). O conteúdo de nitrogênio foi calculado com a utilização da concentração de nitrogênio e da massa das folhas recém-expandidas por unidade experimental.

#### 2.2.4 Concentração do aminoácido triptofano

A concentração do aminoácido triptofano foi determinada pelo método da hidrólise enzimática (LUCAS; SOTELO, 1980), utilizando-se 50 mg de material seco. Adicionou-se 0,8 mL de solução de pronase a cada amostra, posteriormente incubada em solução tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em banho-maria a  $45^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e adicionaram-se 9 mL de solução 4-dimetil-amino-benzaldeído, permanecendo em repouso por 6 horas. Após esse período, adicionou-se 0,1 mL de solução nitrito de sódio e, novamente, as amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos. Realizaram-se as leituras no espectrofotômetro em comprimento de onda de 590 nm.

#### 2.2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se os procedimentos MIXED (nível de significância de 5%) e RSREG (para as regressões), do programa “Statistical Analysis System” (LITTELL et al., 2006). Os símbolos (\*) e (\*\*) nos parâmetros das equações de regressão indicam significância de 5 e 1%, respectivamente.

### 2.3 Resultados

#### 2.3.1 Concentração de fósforo nas lâminas de folhas recém-expandidas

Com o incremento da disponibilidade de fósforo, houve aumento linear na concentração desse nutriente nas folhas recém-expandidas do capim-marandu nos dois períodos de crescimento ( $P < 0,0001$ ) (Figura 2.1) e a concentração de fósforo variou de 0,62 a  $2,30 \text{ g kg}^{-1}$  e de 0,46 a  $2,24 \text{ g kg}^{-1}$ , nas folhas recém-expandidas da primeira e segunda colheita das plantas, respectivamente. O nível crítico de  $1,20 \text{ g kg}^{-1}$  para o capim-marandu (MONTEIRO, 2005) foi atingido nas doses de 0,79 e  $0,93 \text{ mmol L}^{-1}$ , no primeiro e segundo período, respectivamente. O crescimento e perfilhamento limitado das plantas foram verificados, como sintoma característico da deficiência de fósforo em gramíneas forrageiras, na dose mais baixa do nutriente.

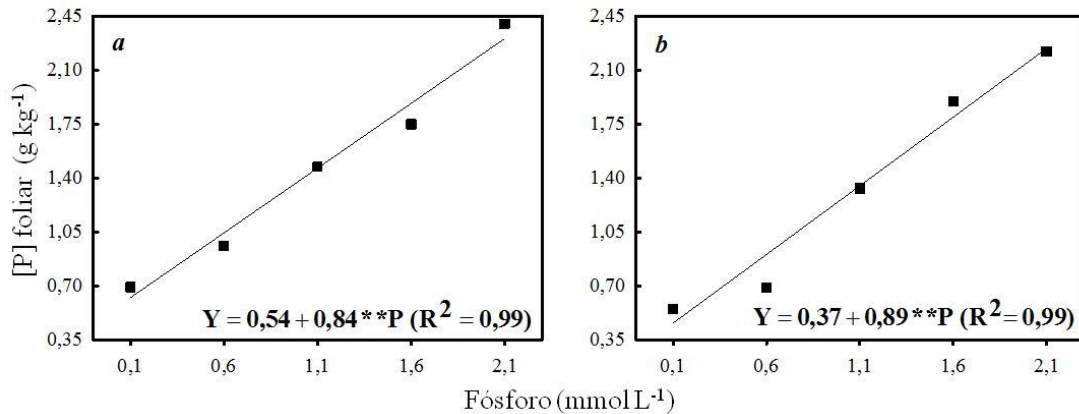


Figura 2.1 – Concentração de fósforo nas lâminas de folhas recém-expandidas ([P] foliar) do capim-marandu, no primeiro (a) e segundo crescimento (b), em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

### 2.3.2 Parâmetros de trocas gasosas

A interação doses de fósforo  $\times$  doses de zinco não foi significativa ( $P > 0,05$ ) para a taxa fotossintética foliar do capim-marandu, sendo verificado efeito positivo do suprimento de fósforo ( $P < 0,0003$ ) no aumento dessa variável até a dose de  $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 2.2a), a partir da qual houve decréscimo na capacidade fotossintética do capim-marandu. Com a dose de fósforo de  $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$  obteve-se o valor mais elevado da taxa fotossintética foliar, que atingiu  $22,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Sugere-se que, na dose de fósforo de  $2,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , houve redução da capacidade fotossintética da gramínea pelo declínio metabólico das plantas, as quais se encontravam em estágio de desenvolvimento mais avançado do que as que receberam as outras doses do nutriente. O incremento na disponibilidade de fósforo aumenta a atividade e renovação celular e, conseqüentemente, o ritmo de iniciação e senescência das folhas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Verificou-se limitada condutância estomática com a redução do suprimento de fósforo ( $P < 0,0003$ ) (Figura 2.2b) e declínio na concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular com o aumento da disponibilidade do nutriente ( $P < 0,008$ ) (Figura 2.2c). A condutância estomática mais elevada foi atingida na dose de fósforo de  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e a dose de fósforo de  $1,3 \text{ mmol L}^{-1}$  foi correspondente a mais baixa concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular. As concentrações de fósforo mais baixas, reflexos dos mais baixos suprimentos do nutriente, limitaram o aumento da fotossíntese com o aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  intercelular e esta resposta é condizente com as

mudanças associadas à limitação da capacidade fotossintética pela baixa atividade da rubisco e regeneração da enzima em plantas deficientes em fósforo (CAMPBELL; SAGE, 2006).

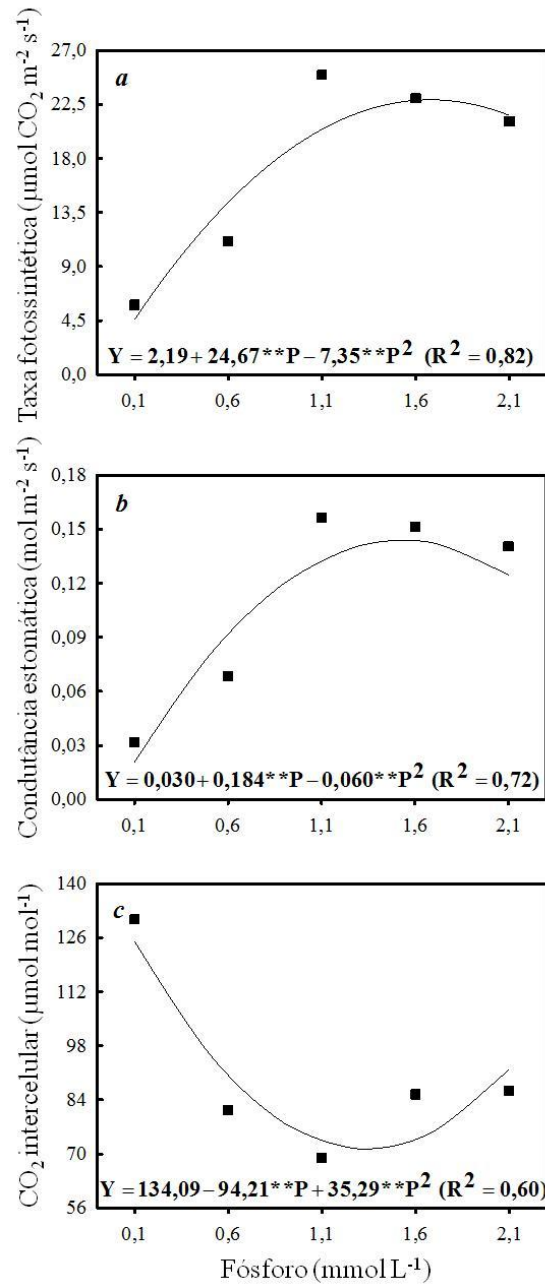


Figura 2.2 – Taxa fotossintética foliar (a), condutância estomática (b) e concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (c) nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim-marandu, no segundo crescimento, em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

### 2.3.3 Nitrogênio

Os valores de concentração e conteúdo de nitrogênio nas folhas recém-expandidas (Figura 2.3) ajustaram-se exponencialmente em função das doses de fósforo, nos dois períodos de crescimento da gramínea ( $P < 0,0001$ ). A concentração mais elevada e o mais baixo conteúdo de nitrogênio foram verificados com a dose de fósforo de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ . No primeiro período de crescimento, a concentração de nitrogênio variou de  $20,7$  a  $32,4 \text{ g kg}^{-1}$  e o conteúdo do nutriente variou de  $99,3$  a  $160,0 \text{ mg}$  por unidade experimental. Para o segundo crescimento do capim-marandu, verificou-se concentração de nitrogênio de  $21,4$  a  $37,2 \text{ g kg}^{-1}$  e conteúdo do nutriente de  $97,5$  a  $211,3 \text{ mg}$  por unidade experimental. A concentração do nitrogênio não foi limitante à capacidade fotossintética das plantas e ao desenvolvimento de área foliar, visto que, mesmo na dose de fósforo mais elevada, a concentração do nutriente foi maior do que o nível crítico, que varia de  $19$  a  $23 \text{ g kg}^{-1}$  para o capim-marandu (MONTEIRO, 2005).

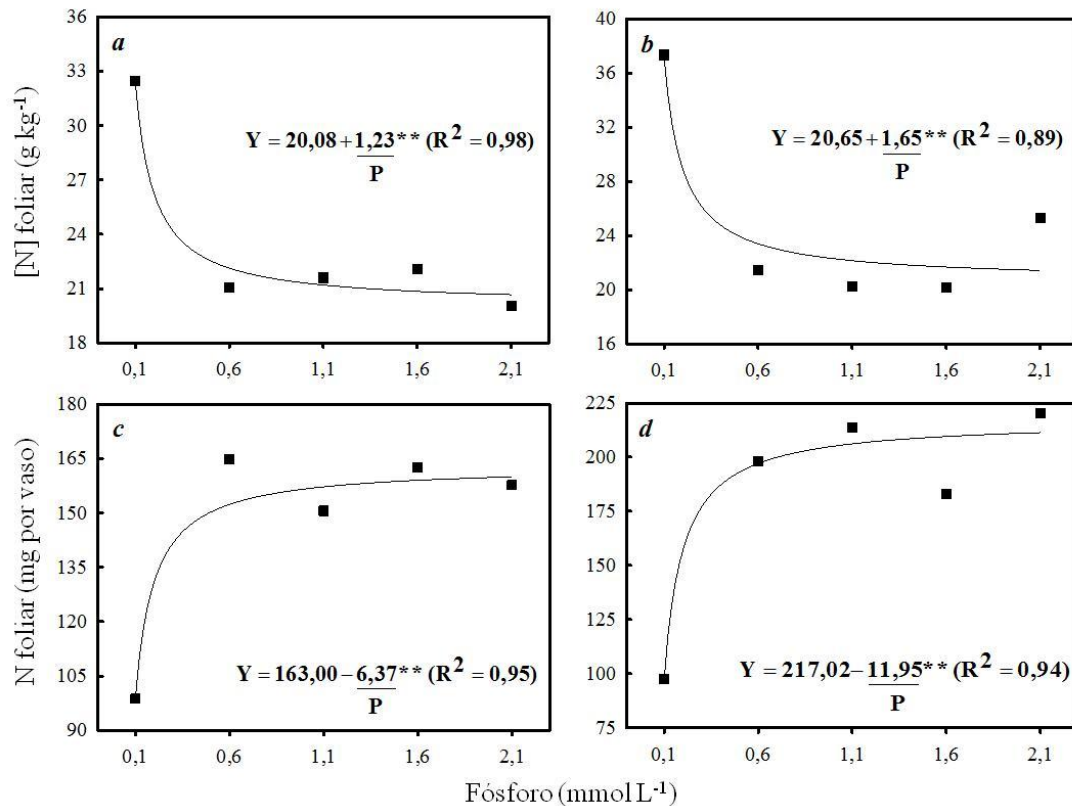


Figura 2.3 – Concentração ([N] foliar) e conteúdo (N foliar) de nitrogênio nas lâminas de folhas recém-expandidas, no primeiro (a;c) e segundo crescimento (b;d) do capim-marandu, em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )



#### 2.3.4 Número de folhas, área foliar e massa de forragem

Os valores de número de folhas ajustaram-se exponencialmente em função das doses de fósforo ( $P < 0,0001$ ) e o suprimento de zinco não interferiu nessa variável ( $P > 0,05$ ). O número de folhas variou de 79,6 a 120,2 e de 90,6 a 185,7 unidades por unidade experimental, na ocasião do primeiro e segundo crescimento, respectivamente (Figuras 2.4a e 2.4b). Com relação ao primeiro crescimento da planta forrageira, a interação doses de fósforo  $\times$  doses de zinco não foi significativa para a variável área foliar, com ajuste exponencial em função das doses de fósforo (Figura 2.4c) e esse mesmo padrão de resposta foi observado para a variável massa de forragem (Figura 2.4e). No segundo período de crescimento, o aumento da disponibilidade de fósforo combinado com o aumento da disponibilidade de zinco resultou em variação significativa da área foliar do capim-marandu (Figura 2.4d) e, conseqüentemente, na alteração da massa de forragem (Figura 2.4f).

A variação da disponibilidade de zinco não alterou a concentração desse nutriente nas folhas recém-expandidas do capim-marandu ( $P > 0,05$ ), no primeiro período de crescimento, com concentração média de 21 mg kg<sup>-1</sup>. A concentração de zinco nas lâminas foliares, no segundo período de crescimento da planta forrageira (Figura 2.5), variou de 11,4 a 15,5 mg kg<sup>-1</sup>, ajustando-se linearmente em função das doses de zinco ( $P < 0,0001$ ). Não houve influência da disponibilidade de zinco nas variáveis área foliar e massa de forragem ( $P > 0,05$ ), no primeiro período de crescimento, provavelmente, devido a não limitação do nutriente para a nutrição das plantas, as quais apresentaram concentração média dentro da faixa de suficiência para o capim-marandu, que varia de 20 a 50 mg kg<sup>-1</sup> (MONTEIRO, 2005). O conteúdo de zinco da semente pode ter se tornado importante fonte para as plantas, especialmente no início do desenvolvimento, quando as condições do ambiente restringem o crescimento radicular e/ou quando o teor do nutriente no substrato é limitante.

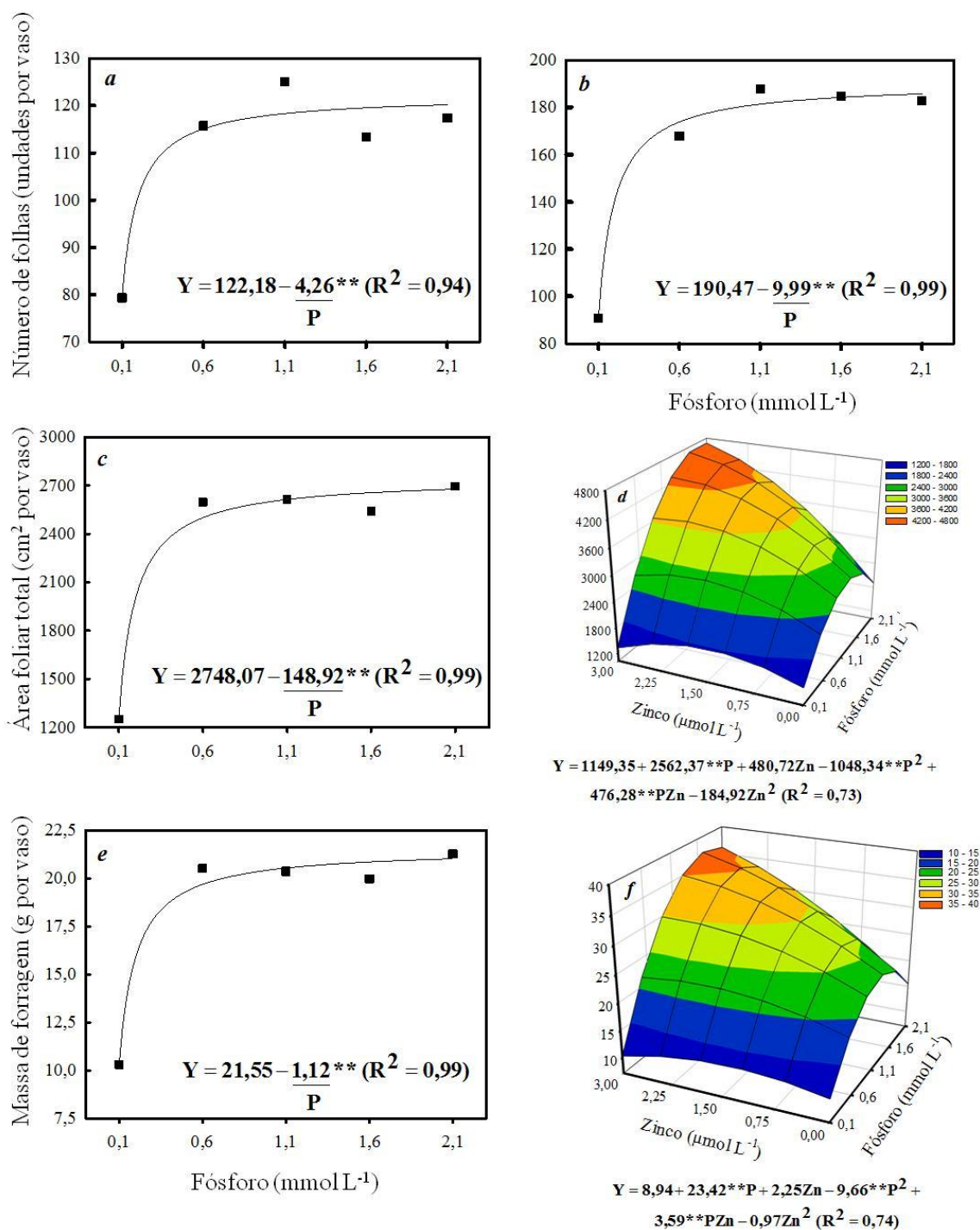


Figura 2.4 - Número de folhas do capim-marandu em resposta à disponibilidade de fósforo (a,b). Área foliar e massa de forragem do capim-marandu em resposta à disponibilidade de fósforo (c,e) e ao suprimento combinado de fósforo e zinco (d,f), no primeiro (a;c;d) e segundo crescimento (b;e;f) ( $P < 0,05$ )

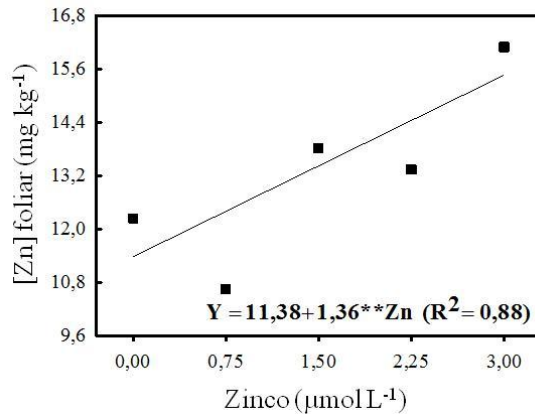


Figura 2.5 - Concentração de zinco ([Zn] foliar) nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim-marandu, no segundo crescimento, em resposta à disponibilidade de zinco ( $P < 0,05$ )

### 2.3.5 Concentração do aminoácido triptofano

No primeiro crescimento da gramínea, a concentração de triptofano não foi alterada com a variação da disponibilidade de zinco ( $P > 0,05$ ), apresentando concentração média do aminoácido de  $1,8 \text{ g kg}^{-1}$ . Houve incremento da concentração de triptofano com o aumento da disponibilidade de zinco (Figura 2.6), no segundo crescimento da planta forrageira ( $P < 0,05$ ), quando a concentração do aminoácido oscilou de  $1,7$  a  $2,4 \text{ g kg}^{-1}$ .

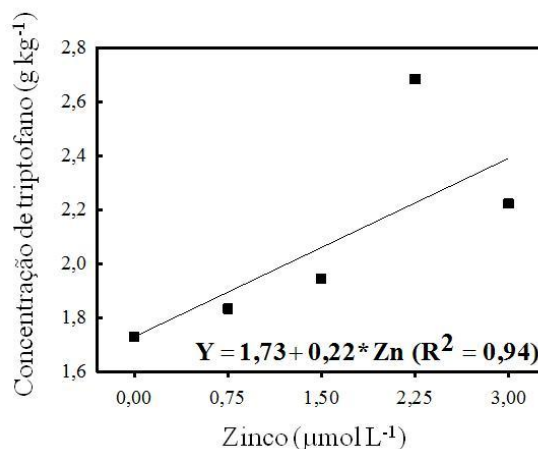


Figura 2.6 - Concentração de triptofano nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim-marandu, no segundo crescimento, em resposta à disponibilidade de zinco ( $P < 0,05$ )

## 2.4 Discussão

A disponibilidade limitada de fósforo afetou o suprimento de CO<sub>2</sub> do dossel e o desenvolvimento das plantas, em maior proporção pela redução da área foliar, por meio da inibição da expansão celular, do que pela restrição da capacidade fotossintética das plantas (MASON et al., 2000; CHIERA; THOMAS; RUFTY, 2002; THOMAS; MONTAGU; CONROY, 2006b; GHANNOUM; CONROY, 2007). A influência da disponibilidade de fósforo na fixação de CO<sub>2</sub> foi demonstrada pela diminuição da taxa fotossintética foliar em plantas com baixa concentração do nutriente (THOMAS; MONTAGU; CONROY, 2006a; GHANNOUM; CONROY, 2007; GHANNOUM et al., 2008; MANTLANA et al., 2008). A redução da capacidade fotossintética, como resposta à baixa disponibilidade de fósforo, pode resultar em mudanças nos mecanismos de captação de luz ou inibição das reações da fotossíntese. O decréscimo da concentração de CO<sub>2</sub> intercelular restringe a capacidade fotossintética das plantas deficientes em fósforo pela limitação na condutância estomática (ASPELMEIER; LEUSCHNER; 2004), como demonstrado nesse estudo, e pela restrição da atividade da rubisco ou capacidade de regeneração da enzima (CAMPBELL; SAGE, 2006; REICH; OLEKSYN; WRIGHT, 2009). A redução na capacidade de regeneração de trifosfato de adenosina, rubisco ou baixa atividade ou conteúdo dessa enzima pode variar com a disponibilidade de fósforo independentemente da concentração de nitrogênio (PIETERS; PAUL; LAWLOR, 2001; WARREN; ADAMS; 2002).

A limitação na produção de massa do capim-marandu consequente à redução da área foliar, em resposta ao baixo suprimento do zinco pode ser associada à concentração de triptofano, aminoácido indicado como provável precursor da biossíntese de auxinas, em particular do indol-3-acético (MARSCHNER, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2009). O ácido indolacético é a principal auxina envolvida no crescimento foliar, atuando diretamente no mecanismo de expansão celular. O aminoácido triptofano tem sido discutido como o precursor primário da biossíntese do ácido indolacético (MÜLLER et al., 2010) e foram identificadas três rotas de conversão do aminoácido em ácido indolacético (DELKER; RASCHKE; QUINT, 2008). A rota do indol-3-acetonitrila (IAN), em que o triptofano é primeiro convertido a indol-3-acetaldoxima e, então, a IAN, o qual é convertido a ácido indolacético pela enzima nitrilase, parece ser importante para as gramíneas pela presença de quatro genes que codificam essa enzima, expressando a capacidade dessas

plantas em responder ao IAN como uma auxina, devido a sua hidrólise a ácido indolacético (SCHMIDT et al., 1996; PIOTROWSKI, 2008; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A produção de forragem da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foi determinada pelo crescimento da área foliar do dossel. O suprimento limitado de fósforo reduziu a taxa fotossintética e, mais efetivamente, restringiu a expansão das folhas. O aumento da captação de luz pela fotossíntese, com o aumento da disponibilidade de fósforo, foi consequência do aumento da área foliar da planta forrageira. O acréscimo da disponibilidade de zinco propiciou aumento da concentração de triptofano, resultando em aumento da área foliar da gramínea pelo provável envolvimento do aminoácido triptofano com o metabolismo do ácido indolacético. O aumento da disponibilidade de fósforo combinado com o incremento do suprimento de zinco proporcionou elevação da produção de forragem, demonstrando a importância da disponibilidade desses nutrientes para garantir a produtividade em sistemas de produção com base em pastagens de gramíneas forrageiras tropicais.

## Referências

- ASPELMEIER, S.; LEUSCHNER, C. Genotypic variation in drought response of silver birch (*Betula pendula*): leaf water status and carbon gain. **Tree Physiology**, Durham, v. 24, p. 517-528, 2004.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H.; BANGERTH, F. Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 40, p. 405-412, 1989.
- CAMPBELL, C.D.; SAGE, R.F. Interactions between the effects of atmospheric CO<sub>2</sub> content and P nutrition on photosynthesis in white lupin (*Lupinus albus* L.). **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 29, p. 844-853, 2006.
- CHIERA, J.; THOMAS, J.; RUFTY, T. Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 53, p. 473-481, 2002.
- CONROY, J.P.; SMILLIE, R.M.; KÜPPERS, M.; BEVEGE, D.I.; BARLOW, E.W. Chlorophyll a fluorescence and photosynthetic and growth response of *Pinus radiata* to phosphorus deficiency, drought stress and high CO<sub>2</sub>. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 81, p. 423-429, 1986.
- DELKER, C.; RASCHKE, A.; QUINT, M. Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. **Planta**, Berkeley, v. 227, p. 929-941, 2008.

DENTON, M.; VENEKLAAS, E.J.; FREIMOSER, F.M.; LAMBERS, H. Banksia species (Proteaceae) from severely phosphorus-impooverished soils exhibit extreme efficiency in the use and re-mobilization of phosphorus. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 30, p. 1557-1565, 2007.

FAO. **FAOSTAT, Statistical databases:** Faostat. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 25 set. 2010.

FIELD, C.; MOONEY, H.A. The photosynthesis–nitrogen relationship in wild plants. In: GIVNISH, T. (Ed.). **On the economy of plant form and function**. London: Cambridge University Press, 1986. p. 25-55.

GAUME, A.E.L.; RAO, I.M.; GAUME, A.J.; FROSSARD, E. A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. **Plant and Soil**, Crawley, v. 328, p. 155-164, 2010.

GHANNOUM, O.; CONROY, J.P. Phosphorus deficiency inhibits growth in parallel with photosynthesis in a C<sub>3</sub> (*Panicum laxum*) but not two C<sub>4</sub> (*P. coloratum* and *Cenchrus ciliaris*) grasses. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.34, p. 72-81, 2007.

GHANNOUM, O.; PAUL, M.J.; WARD, J.L.; BEALE, M.B.; COROL, D.; CONROY, J.P. The sensitivity of photosynthesis to phosphorus deficiency differs between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> tropical grasses. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 35, p. 213-221, 2008.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Davis: California Agriculture Experimental Station, 1950. 347 p.

JACOB, J.; LAWLOR, D.W. Stomatal and mesophyll limitations of photosynthesis in phosphate deficient sunflower, maize and wheat plants. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 42, p. 1003-1011, 1991.

KIRSCHBAUM, M.U.F.; TOMPKINS, D. Photosynthetic responses to phosphorus nutrition in *Eucalyptus grandis* seedlings. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 17, p. 527-535, 1990.

KRAUS, K.A.; MOORE, G.E. Anion exchange studies. VI. The divalent transition elements manganese to zinc in hydrochloric acid. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 75, p. 1460-1462, 1953.

LITTELL, R.C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings**, Ona, v. 34, p. 94-97, 1975.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D.; SCHABENBERGER, O. **SAS for mixed models**. Cary: SAS Institute, 2006. 633 p.

- LOUSTAU, D.; BEN BRAHIM, M.; GAUDILLERE, J.P.; DREYER, E. Photosynthetic responses to phosphorus nutrition in 2-year-old maritime pine seedlings. **Tree Physiology**, Durham, v. 19, p. 707-715, 1999.
- LUCAS, B.; SOTELO, A. Effect of different alkalies, temperatura, and hydrolisis times on tryptophan determination of pure proteins and of foods. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 109, p. 192-197, 1980.
- LYNCH, J.; LÄUCHLI, A.; EPSTEIN, E. Vegetative growth of the common bean in response to phosphorus nutrition. **Crop Science**, Madison, v. 31, p. 380-387, 1991.
- MANTLANA, K.B.; ARNETH, A.; VEENENDAAL, E.M.; WOHLAND, P.; WOLSKI, P.; KOLLE, O.; WAGNER, M.; LLOYD, J. Photosynthetic properties of C<sub>4</sub> plants growing in an African savanna/wetland mosaic. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p. 3941-3952, 2008.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1995. 889 p.
- MASON, P.A.; INGLEBY, K.; MUNRO, R.C.; WILSON, J.; IBRAHIM, K. Interactions of nitrogen and phosphorus on mycorrhizal development and shoot growth of *Eucalyptus globulus* (Labill.) seedlings inoculated with two different ectomycorrhizal fungi. **Forest Ecology and Management**, Ringwood, v. 128, p. 259-268, 2000.
- MONTEIRO, F.A. Amostragem de solo e de planta para fins de análises químicas: métodos e interpretação de resultados. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, 22., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 151-179.
- MÜLLER, J.L.; DENK, K.; COHEN, J.D.; QUINT, M. An inhibitor of tryptophan-dependent biosynthesis of indol-3-acetic acid alters seedling development in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Growth Regulation**, Dresden, v. 29, p. 242-248, 2010.
- NANAMORI, M.; SHIMANO, T.; WASAKI, J.; YAMAMURA, T.; RAO, I.M.; OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthase partitioning in tropical forrage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. **Plant and Cell Physiology**, Nagoya, v. 45, p. 460-469, 2004.
- NUNES, F.N.; CANTARUTTI, R.B.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I.R.; TÓTOLA, M.R.; RIBEIRO, B.N. Atividade de fosfatases em gramíneas forrageiras em resposta à disponibilidade de fósforo no solo e à altura de corte das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1899-1909, 2008.
- PEDREIRA, B.C.; PEDREIRA, C.G.S. Fotossíntese foliar do capim-xaraés [*Brachiaria brizantha* (A. Rich.) Stapf. cv. Xaraés] e modelagem da assimilação potencial de dosséis sob estratégias de pastejo rotativo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 773-779, 2007.

- PIETERS, A.J.; PAUL, M.J.; LAWLOR, D.W. Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 52, p. 1083-1091, 2001.
- PIOTROWSKI, M. Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. **Phytochemistry**, Egham, v. 69, p. 2655-2667, 2008.
- REICH, P.B.; OLEKSYN, J.; WRIGHT, I.J. Leaf phosphorus influences the photosynthesis-nitrogen relation: a cross-biome analysis of 314 species. **Oecologia**, Marburg, v. 160, p. 207-212, 2009.
- ROGRÍGUEZ, D.; ZUBILLAGA, M.M.; PLOCHUK, E.L.; KELTJENS, W.G.; GOUDRIAAN, J.; LAVADO, R.S. Leaf area expansion and assimilate production in sunflower (*Helianthus annuus* L.) growing under low phosphorus conditions. **Plant and Soil**, Crawley, v. 202, p. 133-147, 1998.
- RUSH, R.M.; YOE, J.H. Colorimetric determination of zinc and copper with 2 carboxy-2'-hidroxy-5'-sulfoformazylbenzeno. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 26, p. 1345-1347, 1954.
- SALAMI, A.U.; KENEFICK, D.G. Stimulation of growth in zinc-deficient corn seedlings by the addition of tryptophan. **Crop Science**, Madison, v. 10, p. 291-294, 1970.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.
- SCHMIDT, R.C.; MÜLLER, A.; HAIN, R.; BARTLING, D.; WEILER, E.W. Transgenic tobacco plants expressing the *Arabidopsis thaliana* nitrilase II enzyme. **Plant Journal**, Michigan, v. 9, p. 683-691, 1996.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 820 p.
- THOMAS, D.S.; MONTAGU, K.D.; CONROY, J.P. Leaf inorganic phosphorus as a potential indicator of phosphorus status, photosynthesis and growth of *Eucalyptus grandis* seedlings. **Forest Ecology and Management**, Ringwood, v. 223, p. 267-274, 2006a.
- \_\_\_\_\_. Why does phosphorus limitation increase wood density in *Eucalyptus grandis* seedlings? **Tree Physiology**, Durham, v. 26, p. 35-42, 2006b.
- WALLIHAN, E.F.; BRADFORD, G.R. Simplified methods for inducing micronutrient deficiencies. **HortScience**, Alexandria, v. 12, p. 327-328, 1997.
- WARREN, C.R.; ADAMS, M.A. Phosphorus affects growth and partitioning of nitrogen to Rubisco in *Pinus pinaster*. **Tree Physiology**, Durham, v. 22, p. 11-19, 2002.



WHITEHEAD, D.; BOELMAN, N.T.; TURNBULL, M.H.; GRIFFIN, K.L.; TISSUE, D.T.; BARBOUR, M.M.; HUNT, J.E.; RICHARDSON, S.J.; PELTZER, D.A. Photosynthesis and reflectance indices for rainforest species in ecosystems undergoing progression and retrogression along a soil fertility chronosequence in New Zealand. **Oecologia**, Marburg, v. 144, p. 233-244, 2005.

WRIGHT, I.J.; REICH, P.B.; WESTOBY, M.; ACKERLY, D.D.; BARUCH, Z.; BONGERS, F.; CAVENDER-BARES, J.; CHAPIN, T.; CORNELISSEN, J.H.C.; DIEMER, M.; FLEXAS, J.; GARNIER, E.; GROOM, P.K.; GULIAS, J.; HIKOSAKA, K.; LAMONT, B.B.; LEE, T.; LEE, W.; LUSK, C.; MIDGLEY, J.J.; NAVAS, M-L.; NIINEMETS, Ü.; OLEKSYN, J.; OSADA, N.; POORTER, H.; POOT, P.; PRIOR, L.; PYANKOV, V.I.; ROUMET, C.; THOMAS, S.C.; TJOELKER, M.G.; VENEKLAAS, E.J.; VILLAR, R. The worldwide leaf economics spectrum. **Nature**, London, v. 428, p. 821-827, 2004.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, San Diego, v. 61, p. 49-64, 2010.

### 3 MODIFICAÇÕES METABÓLICAS, PERFILHAMENTO E SISTEMA RADICULAR DO CAPIM-MARANDU EM RESPOSTA À DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO E ZINCO

#### Resumo

As disponibilidades de fósforo e zinco são importantes para a nutrição e estabelecimento das gramíneas forrageiras tropicais. Objetivou-se identificar e quantificar as alterações no metabolismo, número de perfilhos e sistema radicular da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em resposta às disponibilidades de fósforo e zinco. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, em Piracicaba (SP), Brasil, no período de janeiro a abril de 2010. Foram avaliadas as combinações de cinco doses de fósforo (0,1; 0,6; 1,1; 1,6 e 2,1 mmol L<sup>-1</sup>) com cinco doses de zinco (0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 3,00 μmol L<sup>-1</sup>), em solução nutritiva, em fatorial 5<sup>2</sup> fracionado. O delineamento experimental foi o de blocos aleatorizados, com quatro repetições. Realizaram-se duas colheitas do capim-marandu, sendo a primeira aos 38 dias após o transplante e a segunda aos 30 dias da rebrotação. A interação doses de fósforo x doses de zinco e o efeito do suprimento de zinco não foram significativos para as variáveis atividade da enzima fosfatase ácida, índice de utilização de fósforo, número de perfilhos e parâmetros radiculares do capim-marandu. A atividade da enzima fosfatase ácida e o índice de utilização de fósforo diminuíram com o aumento da disponibilidade de fósforo, nos dois períodos de crescimento das plantas forrageiras. A elevada eficiência de utilização de fósforo foi confirmada pela alta atividade da fosfatase ácida e o suprimento de fósforo foi determinante para o desenvolvimento do sistema radicular do capim-marandu.

Palavras-chave: *Brachiaria brizantha*; Comprimento radicular; Eficiência de utilização; Fosfatase ácida; Superfície radicular

#### Abstract

The phosphorus (P) and zinc (Zn) are important for plant nutrition and establishment of tropical grasses. The objective of the present study was to identify and quantify changes in metabolism, number of tillers and root growth of *Brachiaria brizantha* cv. Marandu (Marandu palisadegrass) in response to the availability of P and Zn. The experiment was carry out in a greenhouse at Piracicaba, São Paulo State, Brazil, from January to April, 2010. Five rates of P (0.1, 0.6, 1.1, 1.6 and 2.1 mmol L<sup>-1</sup>) and five rates of Zn (0.00, 0.75, 1.5, 2.25 and 3.00 μmol L<sup>-1</sup>) were tested in a 5<sup>2</sup> fractioned factorial. The experimental used was randomized block design with four replications. Plant shoots were harvested 38 d after transplanting and 30 d after the first harvest. The interaction P rates x Zn rates and the effect of Zn supply were not significant for the variables acid phosphatase enzyme activity, phosphorus use index, number of tillers and root parameters of Marandu palisadegrass. The P use efficiency and acid phosphatase enzyme activity decreased with increasing P availability in two growth period of grasses. The high P use efficiency was confirmed by the high acid phosphatase activity and P supply was decisive to the development of root system Marandu palisadegrass.

Keywords: Acid phosphatase; *Brachiaria brizantha*; Root length; Root surface; Phosphorus use efficiency

### 3.1 Introdução

A maior parte da exploração do sistema de produção de bovinos brasileiro é localizada na região dos cerrados, ocupando solos com reconhecidas limitações de fertilidade, destacando-se a baixa disponibilidade de fósforo como uma das condições mais restritivas à produção das pastagens, em função da elevada acidez do solo e capacidade de adsorção de fosfato.

A adaptação das plantas à baixa disponibilidade de fósforo é favorecida por processos que aumentam a eficiência de utilização do nutriente (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003; JAIN et al., 2007). Alterações bioquímicas em resposta à disponibilidade limitada de fósforo, como o incremento da atividade da enzima fosfatase ácida, são mecanismos que aumentam a remobilização de fósforo pelas plantas (YUN; KAEPLER, 2001; NUNES et al., 2008; GAUME et al., 2010). Assim, a fosfatase ácida está associada à remobilização de fósforo e a elevada atividade dessa enzima está relacionada à baixa concentração de fósforo inorgânico nas plantas (RICHARDSON; HABODAS; HAYES, 2000; BALDWIN; KARTHKEYAN; RAGHOTHAMA, 2001; BOZZO; DUNN; PLAXTON, 2006). Para aumentar a eficiência de utilização de fósforo, conferida pela remobilização mais eficiente do nutriente, as plantas desenvolveram mecanismos associados à redução do requerimento de fósforo (HALSTED; LYNCH, 1996), os quais contribuem para a adaptação a condições nutricionais limitantes (YAN et al., 2001; NANAMORI et al., 2004; NUNES et al., 2008). Dessa forma, é razoável assumir que a enzima fosfatase ácida está associada à translocação de fósforo para regiões de elevada demanda metabólica das gramíneas forrageiras tropicais, em condição de baixa disponibilidade do nutriente.

O fluxo difusivo, que é o meio de transporte do fósforo no substrato, limita a absorção do nutriente pelas plantas, as quais respondem a essa restrição com o aumento do desenvolvimento das raízes, tanto em massa quanto em comprimento e superfície (WATT; EVANS, 2003; HODGE, 2004; HERMANS et al., 2006; HAMMOND; WHITE, 2008). O sistema radicular é fundamental para garantir o processo de perfilhamento, o qual representa a principal característica estrutural responsável pela formação, produtividade e perenidade das plantas forrageiras (LANGER, 1963).

Dada a importância da disponibilidade de fósforo para o estabelecimento das pastagens tropicais e do suprimento de zinco para a nutrição das plantas forrageiras, objetivou-se identificar

e quantificar as alterações no metabolismo, perfilhamento e sistema radicular da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em resposta à disponibilidade de fósforo e zinco. Embora a disponibilidade de zinco seja necessária para o balanço nutricional das pastagens tropicais, não há relatos da influência desse nutriente nas variáveis analisadas nesse estudo.

### 3.2 Material e métodos

#### 3.2.1 Solução nutritiva e colheita das plantas

O experimento foi realizado em casa de vegetação, em vasos com capacidade de 3,6 L, em Piracicaba-SP (22° 43' S, 47° 38' O), Brasil, no período de janeiro a abril de 2010, utilizando-se a gramínea forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Em solução nutritiva, foram estudadas as combinações de cinco doses de fósforo (0,1; 0,6; 1,1; 1,6 e 2,1 mmol L<sup>-1</sup>) com cinco doses de zinco (0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 3,00 µmol L<sup>-1</sup>), em estudo de superfície de resposta, num fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, de acordo com Littell e Mott (1975). O delineamento experimental foi o de blocos completos aleatorizados, com quatro repetições. As 13 combinações das doses de fósforo com as doses de zinco foram: 0,1-0; 0,1-1,50; 0,1-3,00; 0,6-0,75; 0,6-2,25; 1,1-0; 1,1-1,50; 1,1-3,00; 1,6-0,75; 1,6-2,25; 2,1-0; 2,1-1,50 e 2,1-3,00. O fósforo e o zinco foram fornecidos como KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e ZnCl<sub>2</sub>, respectivamente.

A solução nutritiva foi preparada de acordo com a solução completa de Hoagland e Arnon (1950), modificada para atender as doses de fósforo e zinco do experimento, e foi trocada a cada 14 dias. Para evitar a contaminação da solução pela presença indesejável de zinco, que poderia interferir nos resultados experimentais, foi realizada a purificação dos reagentes para análise, utilizados para compor cada solução estoque. Para a purificação das soluções de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e MgSO<sub>4</sub> foi utilizada a solução extratora de zinco, dissolvendo-se 10 mg de pirrolidina ditiocarbamato de amônio (APDC) em 100 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) (WALLIHAN; BRADFORD, 1977). A solução estoque de Fe-EDTA foi purificada pela utilização de resina de troca aniônica, que retém o zinco quando este está presente em solução de HCl (KRAUS; MOORE, 1953; RUSH; YOE, 1954; WALLIHAN; BRADFORD, 1977). À solução de FeCl<sub>3</sub> purificada foi adicionada a solução quelante de Na<sub>2</sub>EDTA, obtendo-se a solução estoque de Fe-EDTA.

Tabela 3.1 - Volumes das soluções estoque empregadas no preparo das soluções nutritivas para as combinações de doses de fósforo e zinco

Fósforo (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	0,6	0,6	1,1	1,1	1,1	1,6	1,6	2,1	2,1	2,1
Zinco (µmol L <sup>-1</sup> )	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00
Solução estoque	Volume (mL L <sup>-1</sup> )												
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	0,6	0,6	1,1	1,1	1,1	1,6	1,6	2,1	2,1	2,1
KCl (1 mol L <sup>-1</sup> )	5,9	5,9	5,9	5,4	5,4	4,9	4,9	4,9	4,4	4,4	3,9	3,9	3,9
KNO <sub>3</sub> (1mol L <sup>-1</sup> )	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1mol L <sup>-1</sup> )	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
MgSO <sub>4</sub> (1mol L <sup>-1</sup> )	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1mol L <sup>-1</sup> )	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Micro-Zn*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe-EDTA**	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25
ZnCl <sub>2</sub> ***	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00	0,75	2,25	0,00	1,50	3,00

\* Composição da solução estoque de micronutrientes sem zinco (g L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>=2,86; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O=1,81; CuCl<sub>2</sub>=0,10 e H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O=0,02.

\*\* Para preparar a solução de Fe-EDTA purificada, utilizou-se 10,8 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O diluído em 100 mL de HCl 0,5 N, adicionado à 14,88 g de Na<sub>2</sub>EDTA diluído em 400 mL de água desionizada e completou-se o volume para 1 L.

\*\*\* ZnCl<sub>2</sub>=0,136 g L<sup>-1</sup>.

Para compor cada unidade experimental cultivaram-se cinco plantas por vaso, as quais foram submetidas a duas colheitas, sendo a primeira aos 38 dias após o transplante e a segunda aos 30 dias da rebrotação. O momento das colheitas foi determinado mediante observação visual do início do processo de senescência das folhas maduras, caracterizado pelo amarelecimento da lâmina foliar.

### 3.2.2 Número de perfilhos e sistema radicular

O número de perfilhos foi quantificado na ocasião das colheitas e o comprimento, a superfície e a massa das raízes foram determinados após a colheita final. As determinações do comprimento e da superfície das raízes foram realizadas com auxílio do aplicativo Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo (SIARCS) (JORGE; CRESTANA, 1996), sendo digitalizado, aproximadamente, 20% do volume total das raízes (ROSSIELO et al., 1995). A massa da parte aérea e das raízes foi determinada pela pesagem do material vegetal após secagem em estufa de ventilação forçada a 65 °C até massa constante.

### 3.2.3 Concentração, conteúdo e índice de utilização de fósforo

A concentração de fósforo foi determinada nas lâminas de folhas recém-expandidas e na parte aérea, na ocasião das colheitas, por colorimetria (SARRUGE; HAAG, 1974). O conteúdo de fósforo foi estimado a partir da massa de forragem e da concentração de fósforo da parte aérea do capim-marandu. O índice de utilização de fósforo foi calculado de acordo com Siddiqi e Glass (1981), o qual é expresso por índice de utilização de fósforo = massa de forragem/concentração de fósforo.

### 3.2.4 Atividade da enzima fosfatase ácida

A atividade da enzima fosfatase ácida foi determinada na ocasião das colheitas. Foram utilizados 100 mg de lâminas de folhas recém- expandidas, incubados com 8 mL de para-nitrofenilfosfato  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a pH 4,0, e mantidos em banho-maria por 30 minutos a  $30^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram adicionados 2 mL de NaOH  $2 \text{ mol L}^{-1}$  a 5 mL do sobrenadante e as leituras foram realizadas em fotocolorímetro com comprimento de onda de 490 nm (McLACHLAN; De MARCO, 1982; SILVA; BASSO, 1993).

### 3.2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se os procedimentos MIXED (nível de significância de 5%) e RSREG (para as regressões), do programa “Statistical Analysis System” (LITTELL et al., 2006). Os símbolos (\*) e (\*\*) nos parâmetros das equações de regressão indicam significância de 5 e 1%, respectivamente.

## 3.3 Resultados

A interação doses de fósforo  $\times$  doses de zinco e o efeito isolado do suprimento de zinco não foram significativos ( $P > 0,05$ ) para as variáveis concentração, conteúdo e índice de utilização de fósforo, atividade da enzima fosfatase ácida, número de perfilhos e comprimento, superfície e

massa de raízes do capim-marandu, sendo verificado apenas efeito da disponibilidade de fósforo nessas variáveis.

### 3.3.1 Concentração, conteúdo e índice de utilização de fósforo

Com o incremento da disponibilidade de fósforo, houve aumento linear na concentração (Figura 3.1) e no conteúdo (Figura 3.2) do nutriente nas folhas recém-expandidas nos dois períodos de crescimento da planta forrageira ( $P < 0,0001$ ). A concentração de fósforo variou de 0,62 a 2,30 g kg<sup>-1</sup> e de 0,46 a 2,24 g kg<sup>-1</sup>, e o conteúdo de fósforo variou de 9,2 a 49,1 e de 6,5 a 59,8 mg por unidade experimental, no primeiro e segundo crescimento, respectivamente. O índice de utilização de fósforo decresceu linearmente com o aumento da disponibilidade do nutriente (Figura 3.3), com variação de 10,2 a 17,9 e 15,7 a 26,4 g<sup>2</sup> mg<sup>-1</sup>, no primeiro ( $P < 0,0005$ ) e segundo ( $P < 0,02$ ) crescimento, respectivamente.

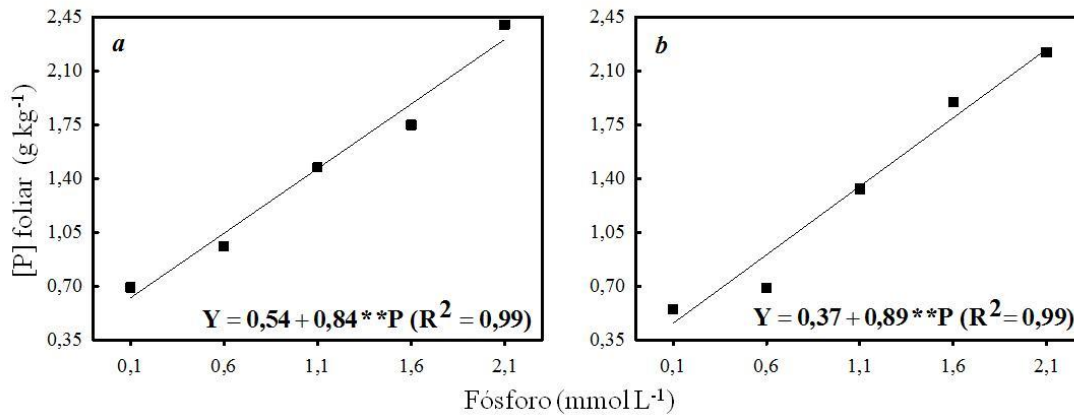


Figura 3.1 – Concentração de fósforo nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim-marandu, no primeiro (a) e segundo crescimento (b), em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

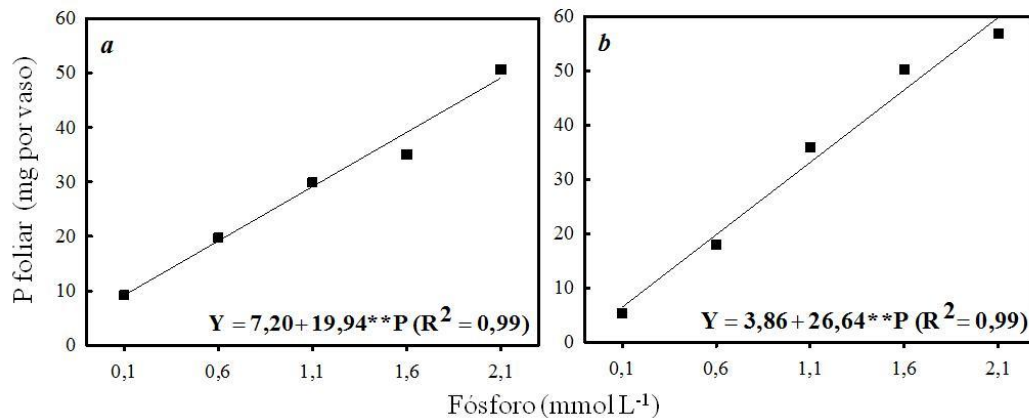


Figura 3.2 – Conteúdo de fósforo (P foliar) na parte aérea do capim-marandu, no primeiro (a) e segundo crescimento (b), em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

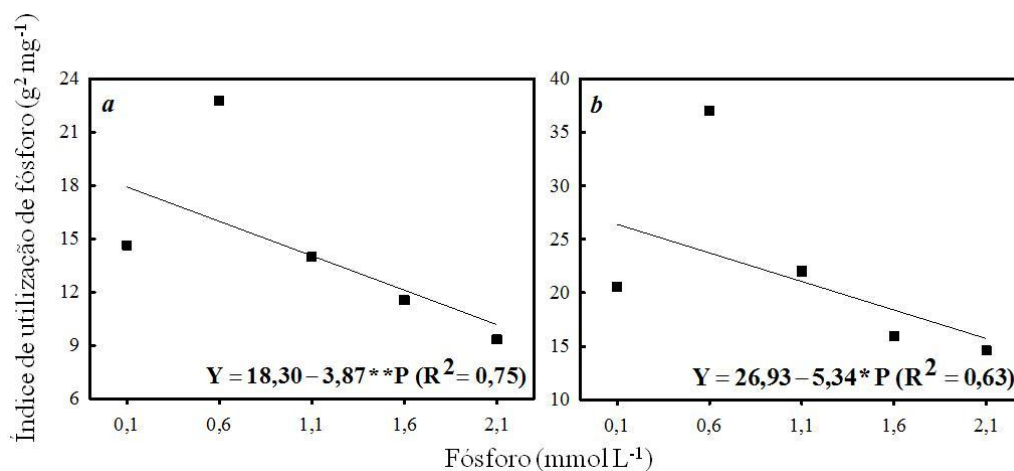


Figura 3.3 – Índice de utilização de fósforo da parte aérea do capim-marandu, no primeiro (a) e segundo crescimento (b), em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

### 3.3.2 Atividade da enzima fosfatase ácida

A atividade da enzima fosfatase ácida decresceu com o aumento da disponibilidade de fósforo (Figura 3.4), durante todo o período de crescimento do capim-marandu. A atividade da enzima variou linearmente de 12,3 a 18,4 e de 12,9 a 22,5  $\mu\text{mol p-NP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , no primeiro ( $P < 0,007$ ) e segundo crescimento ( $P < 0,0001$ ), respectivamente.



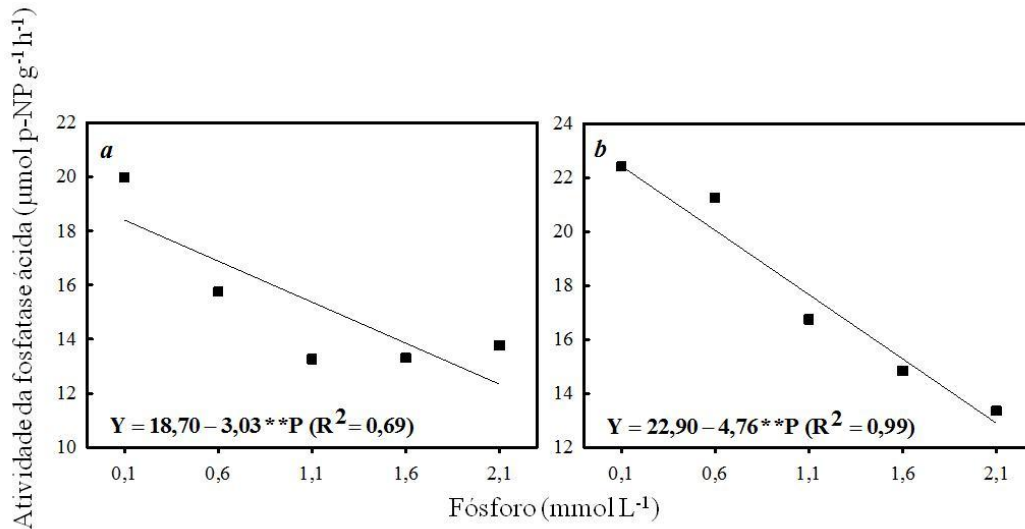


Figura 3.4 – Atividade da enzima fosfatase ácida nas lâminas de folhas recém-expandidas do capim-marandu, no primeiro (a) e segundo crescimento (b), em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

### 3.3.3 Número de perfilhos e sistema radicular

Os valores das variáveis número de perfilhos, comprimento, superfície e massa de raízes ajustaram-se exponencialmente em função das doses de fósforo ( $P < 0,0001$ ). O número de perfilhos (Figura 3.5) variou de 18,5 a 30,1 e de 33,0 a 61,0 unidades por unidade experimental no primeiro e segundo crescimento, respectivamente. O comprimento, superfície e massa de raízes (Figura 3.6) variaram de 313,3 a 712,0 m, de 2096 a 5174 cm<sup>2</sup> e de 8,3 a 20,3 g, respectivamente.

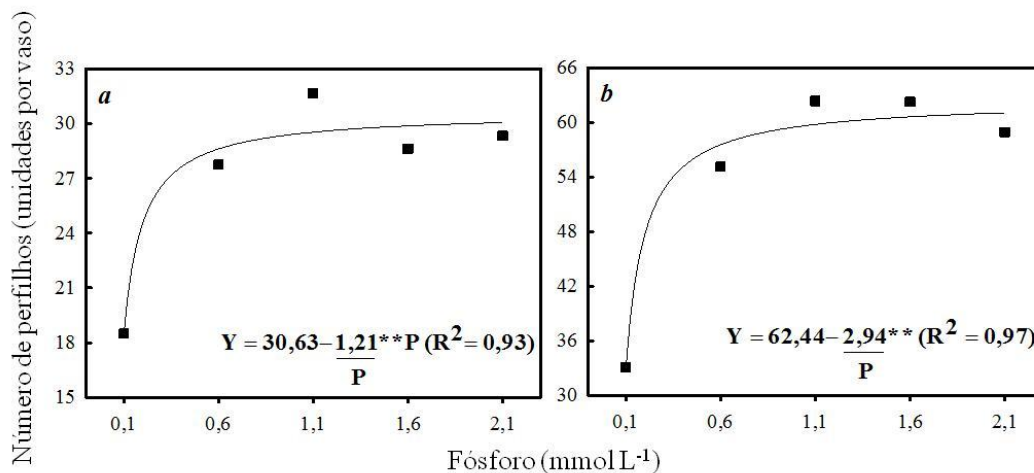


Figura 3.5 – Número de perfilhos do capim-marandu, no primeiro (a) e segundo (b) crescimento, em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

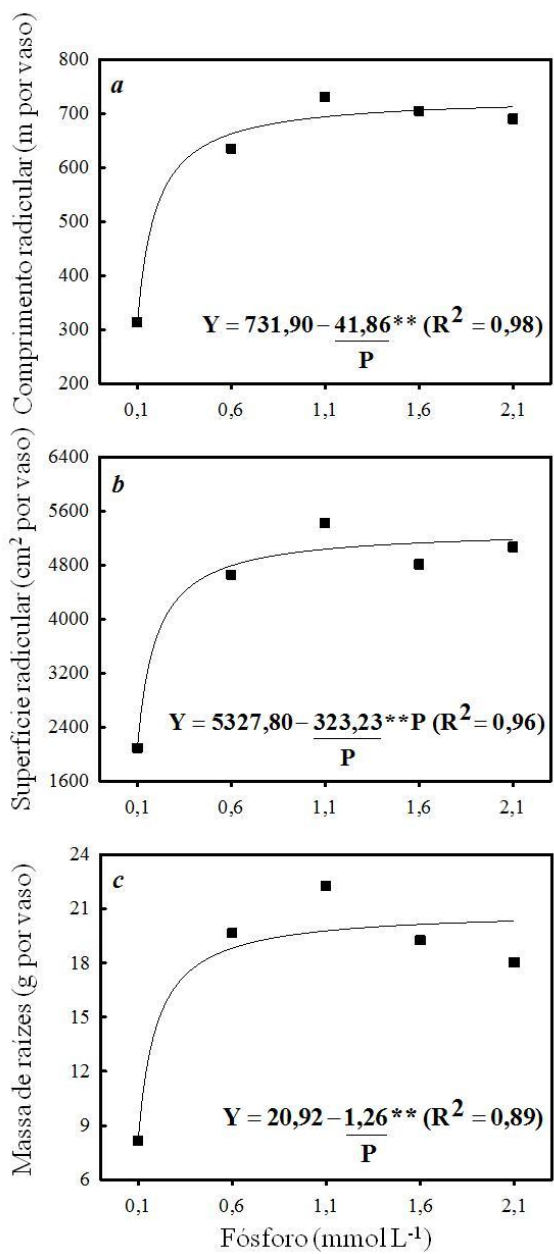


Figura 3.6 – Comprimento (a), superfície (b) e produção de massa de raízes do capim-marandu, em resposta à disponibilidade de fósforo ( $P < 0,05$ )

### 3.4 Discussão

A alta atividade da enzima fosfatase ácida como resposta adaptativa à baixa disponibilidade de fósforo tem sido observada em diversas culturas (YUN; KAEPPLER, 2001; BOZZO; DUNN; PLAXTON, 2006; NUNES et al., 2008; GAUME et al., 2010). A elevada atividade da enzima é associada à maior remobilização de fósforo, conferindo às plantas maior eficiência de utilização de fósforo, quando cultivadas em baixa disponibilidade desse nutriente, o que contribui para a adaptação das gramíneas forrageiras tropicais às condições limitantes de fósforo (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994; YASEEN; MALHI, 2009). Com a disponibilidade limitada de fósforo, plantas de *Brachiaria* apresentaram elevada atividade da enzima, provavelmente, associada às elevadas taxas de remobilização e utilização mais eficiente de fósforo (NANAMORI et al., 2004). Assim, em condições de deficiência de fósforo, as plantas utilizam mecanismos que ativam a desfosforilação de compostos orgânicos, disponibilizando fósforo inorgânico para manutenção do metabolismo celular em regiões meristemáticas (RAGHOTHAMA, 1999; NANAMORI et al., 2004). A elevada atividade da fosfatase ácida nos tecidos vegetais pode ser utilizada como indicadora da deficiência de fósforo (DUFF; SARATH; PLAXTON, 1994), observando-se relação negativa entre a atividade da enzima e a concentração de nutriente (BOSSE; KÖCK, 1998; NANAMORI et al., 2004).

Devido ao fluxo difusivo de transporte do fósforo, o expressivo crescimento radicular associado às mudanças na arquitetura radicular e à expansão da superfície radicular pela proliferação dos pelos radiculares são processos que aumentam a absorção do nutriente (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003) e, conseqüentemente, aumentam o número de perfilhos das gramíneas forrageiras. Dessa forma, confirma-se a importância da disponibilidade de fósforo no estabelecimento das pastagens tropicais. O reduzido número de perfilhos das gramíneas forrageiras com a baixa disponibilidade de fósforo é um mecanismo para regular a utilização do nutriente em condição limitante. A restrição no desenvolvimento vegetal em condição de deficiência de fósforo transforma as raízes em forte dreno de carboidratos, causando maior limitação ao desenvolvimento da parte aérea do que das raízes (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003). A elevada destinação de carbono às raízes em condições de baixa disponibilidade de fósforo, tanto para produção de biomassa quanto para respiração de manutenção, pode se constituir em fator limitante ao desenvolvimento vegetal como um todo

(NIELSEN et al., 1998). Assim, o suprimento adequado de fósforo é essencial para manter a produtividade das pastagens tropicais.

A eficiência de utilização do fósforo é importante característica adaptativa das plantas, particularmente daquelas cultivadas em condições limitantes de disponibilidade do nutriente. A elevada eficiência de utilização de fósforo é conferida pela elevada remobilização do nutriente dos tecidos velhos para os jovens e foi confirmada pela alta atividade da enzima fosfatase ácida. O suprimento limitado de fósforo interferiu no desenvolvimento do sistema radicular, afetando negativamente o perfilhamento do capim-marandu. A disponibilidade de fósforo é essencial para o estabelecimento e produção das pastagens tropicais devido à influência do nutriente no perfilhamento e sistema radicular das gramíneas forrageiras.

## Referências

- BALDWIN, J.C.; KARTHIKEYAN, A.S.; RAGHOTHAMA, G. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 125, p. 728-737, 2001.
- BOSSE, D.; KÖCK, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 21, p. 325-332, 1998.
- BOZZO, G.G.; DUNN, E.L.; PLAXTON, W.C. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. **Plant, Cell and Environment**, Logan, v. 29, p. 303-313, 2006.
- DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 90, p. 791-800, 1994.
- GAUME, A.E.L.; RAO, I.M.; GAUME, A.J.; FROSSARD, E. A comparative study on plant growth and root plasticity responses of two *Brachiaria* forage grasses grown in nutrient solution at low and high phosphorus supply. **Plant and Soil**, Crawley, v. 328, p. 155-164, 2010.
- HALSTED, M.; LYNCH, J. Phosphorus responses of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 47, p. 497-505, 1996.
- HAMMOND, J.P.; WHITE, P.J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 59, p.93-109, 2008.
- HERMANS, C.; HAMMOND, J.P.; WHITE, P.J.; VERBRUGGEN, N. How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 610-617, 2006.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil.** Davis: California Agriculture Experimental Station, 1950. 347 p.

HODGE, A. The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. **New Phytologist**, Malden, v. 162, p. 9-14, 2004.

JAIN, A.; VASCONCELOS, M.J.; RAGHOTHAMA, K.G.; SAHI, S.V. Molecular mechanisms of plant adaptation to phosphate deficiency. **Plant Breeding Reviews**, Korbeek, v. 29, p.359-419, 2007.

JORGE, L.A.C.; CRESTANA, S. SIARCS 3.0: novo aplicativo para análise de imagens digitais aplicado a ciência do solo. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 1.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 4., 1996, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 1996. 1 CD-ROM.

KRAUS, K.A.; MOORE, G.E. Anion exchange studies. VI. The divalent transition elements manganese to zinc in hydrochloric acid. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 75, p. 1460-1462, 1953.

LANGER, R.H.M. Tillering in herbage grasses. **Herbage Abstract**, Lawrence, v. 33, p. 141-148, 1963.

LITTELL, R.C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings**, Ona, v. 34, p. 94-97, 1975.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D.; SCHABENBERGER, O. **SAS for mixed models.** Cary: SAS Institute, 2006. 633 p.

McLACHLAN, K.D. Leaf acid phosphatase activity and the phosphorus status of field-grown wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 33, p. 453-464, 1982.

NANAMORI, M.; SHIMANO, T.; WASAKI, J.; YAMAMURA, T.; RAO, I.M.; OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthase partitioning in tropical forrage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar Mulato compared with rice. **Plant and Cell Physiology**, Nagoya, v. 45, p. 460-469, 2004.

NIELSEN, K.L.; BOUMA, T.J.; LYNCH, J.P.; EISSENSTAT, D.M. Effects of phosphorus availability and vesicular-arbuscular mycorrhizas on the carbon budget of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **New Phytologist**, Malden, v. 139, p. 647-656, 1998.

NUNES, F. N.; CANTARUTTI, R.B.; NOVAIS, R.F.; SILVA, I. R.; TÓTOLA, M.R.; RIBEIRO, B.N. Atividade de fosfatases em gramíneas forrageiras em resposta à disponibilidade de fósforo no solo e à altura de corte das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1899-1909, 2008.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Stanford, v. 50, p. 665-693, 1999.

RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A.; HAYES, J.E.; O'HARA, C.P.; SIMPSON, R.J. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. **Plant and Soil**, Crawley, v. 229, p. 47-56, 2001.

ROSSIELO, R.O.P.; ARAÚJO, A.P.; MANZATTO, C.V.; FERNANDES, M.S. Comparação dos métodos fotoelétricos e da interação na determinação de área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 633-638, 1995.

RUSH, R.M.; YOE, J.H. Colorimetric determination of zinc and copper with 2 carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzeno. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 26, p. 1345-1347, 1954.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization index: A modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 4, p. 289-302, 1981.

SILVA, F.C.; BASSO, L. C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida na folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, p. 371-375, 1993.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLEN, D.L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Malden, v. 157, p. 423-447, 2003.

WALLIHAN, E.F.; BRADFORD, G.R. Simplified methods for inducing micronutrient deficiencies. **HortScience**, Alexandria, v. 12, p. 327-328, 1997.

WATT, M.; EVANS, J.R. Phosphorus acquisition from soil by lupin (*Lupinus albus* L.) and soybean (*Glycine max* L.), species with contrasting root development. **Plant and Soil**, Crawley, v. 248, p. 271-283, 2003.

YAN, X.; LIAO, H.; TRULL, M.C.; BEEBE, S.E.; LYNCH, J.P. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 125, p. 1901-1911, 2001.

YASEEN, MALHI, S.S. Differential growth response of wheat genotypes to ammonium phosphate and rock phosphate phosphorus sources. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 32, p. 410-432, 2009.

YUN, S.J.; KAEPLER, S.M. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. **Plant and Soil**, Crawley, v. 237, p. 109-115, 2001.



#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

As disponibilidades de fósforo e zinco interferiram no crescimento de área foliar da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, com reflexo na produção de forragem. A disponibilidade de fósforo foi essencial para o estabelecimento das plantas devido à influência do nutriente no perfilhamento e no sistema radicular do capim-marandu. O suprimento de fósforo propiciou incremento na taxa fotossintética foliar e na condutância estomática e decréscimo na concentração de CO<sub>2</sub> intercelular, no segundo crescimento do capim-marandu. A atividade da enzima fosfatase ácida e o índice de utilização de fósforo diminuíram com o aumento da disponibilidade de fósforo e os números de folhas e de perfilhos e os parâmetros radiculares ajustaram-se exponencialmente em resposta às doses de fósforo. A disponibilidade de zinco resultou em aumento da concentração de triptofano, no segundo período de crescimento da gramínea forrageira. A interação doses de fósforo  $\times$  doses de zinco foi significativa para as variáveis área foliar e massa de forragem, no segundo crescimento do capim-marandu.