

FLANCER NOVAIS NUNES

**ATIVIDADE DE FOSFATASES EM FORRAGEIRAS E FRAÇÕES DE
FÓSFORO NO SOLO COMO INDICADORAS DA DEGRADAÇÃO DE
PASTAGENS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2005

FLANCER NOVAIS NUNES

ATIVIDADE DE FOSFATASES EM FORRAGEIRAS E FRAÇÕES DE FÓSFORO
NO SOLO COMO INDICADORAS DA DEGRADAÇÃO DE PASTAGENS

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

APROVADA: 13 de dezembro de 2005.

Prof. Ivo Ribeiro da Silva
(Conselheiro)

Prof. Roberto Ferreira de Novais
(Conselheiro)

Prof. Julio César Lima Neves

Prof. Marcos Rogério Tótola

Prof. Reinaldo Bertola Cantarutti
(Orientador)

Ao nosso pai celestial

Aos meus pais Júlio César Nunes e Sara Novais Nunes

Ao meu avô Edson Ferreira de Novais

Aos meus irmãos Ariel, Tiago e Vander Luiz

A minha namorada Ana Luiza

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao DPS, pela oportunidade de realização do curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Prof. Reinaldo Bertola Cantarutti, pelas críticas, sugestões, pelo empenho na realização deste trabalho, orientação e principalmente pela consideração;

Ao Prof. Roberto Ferreira de Novais, pelo altruísmo, pela dedicação à ciência e pelos conselhos que muito contribuíram para minha formação profissional e pessoal;

Ao Prof. Ivo Ribeiro da Silva, pela prontidão, competência, pelos conselhos que foram fundamentais à execução deste trabalho e, principalmente, pela amizade;

Ao Prof. Marcos Rogério Tótola, pelo profissionalismo, sugestões e pela disponibilização do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade;

Ao Prof. Julio César de Lima Neves, pela prontidão e pelas sugestões fundamentais à conclusão deste trabalho

Ao Prof. Dilermando Miranda da Fonseca, pelas sugestões e esclarecimentos;

Aos amigos Bruno, Fabrício, Fred e Tiago que muito contribuíram para a montagem, execução e análises laboratoriais;

Aos colegas Augusto, César, Dalton (Descontrolado), Ecila, Frederico, Guilherme (Red), Jackson, Karina, Michelle e Rodinei do Laboratório de Solos Florestais, pela convivência amizade e momentos de descontração.

Aos colegas Adélia, Adriano, Arnaldo, Bruna, Cássia, Gilberto, Maria Tereza, Mariana, Rodolfo, Rose, Sara, Tânia e Ulisses do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade pela amizade e pelo fecundo ambiente de trabalho;

Aos colegas Arley, Carolina, Edgley, Eduardim, Juscimar, Karina, Marcos, Nilson e Paloma, do curso de pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas pela amizade e companheirismo;

Aos meus colegas de república Dalton, Fabrício e Leo e aos amigos que conheci na UFV: Cristiano, Guilhermão, Gustavo, Henrique, Mauro, Tarcísio, Vinícius pelo companheirismo e pelos bons momentos por nós vividos;

Aos funcionários do DPS, principalmente ao Beto, Cardoso, Carlinhos, Carlos, Cláudio, Denise, Luciana, Pedrão, Sonia e Zé Luis pela presteza e amizade;

Às minhas avós materna Conceição e paterna Diva (*in memorium*) pelo carinho, pela bondade e pelo exemplo de vida.

A todos que participaram dos bons momentos que tive nessa jornada.

BIOGRAFIA

FLANCER NOVAIS NUNES, filho de Julio César Nunes e Sara Novais Nunes, nasceu em Patos de Minas, em 24 maio de 1977.

Em março de 2003, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 2003, iniciou o Curso de Mestrado na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de fertilidade do solo e nutrição de plantas, terminando-o em 13 de dezembro de 2005.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1 – Atividade de fosfatases e frações orgânicas de fósforo no Solo na Produtividade de Pastagens em Solos Deficientes neste Nutriente	4
Resumo	4
Abstract.....	5
Introdução	6
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	14
Conclusões	21
CAPÍTULO 2 – Atividade de fosfatases em Gramíneas Forrageiras como Variável da Disponibilidade de Fósforo no Solo e da Altura de Corte das Plantas	22
Resumo	22
Abstract.....	23
Introdução	24
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	30
Conclusões	39
Referências Bibliográficas.....	40
CONCLUSÕES GERAIS.....	45
Apêndice	46

RESUMO

Nunes, Flancer Novais, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005.
Atividade de fosfatases em forrageiras e frações de fósforo no solo como indicadores da degradação de pastagens. Orientador: Reinaldo Bertola Cantarrutti. Conselheiros: Ivo Ribeiro da Silva e Roberto Ferreira de Novais.

A baixa disponibilidade de P é um dos principais limitantes da produtividade nos solos tropicais. No Brasil, uma grande proporção das pastagens está degradada, embora as gramíneas forrageiras tropicais sejam adaptadas às condições de baixa fertilidade. As formas orgânicas de P constituem um grande reservatório deste nutriente nos solos; assim, espera-se que o Po contribua para manter a disponibilidade de P no solo, necessária à manutenção da produtividade das gramíneas forrageiras. Sob condições de deficiência em P, a remobilização deste nutriente na planta é outro fator que pode contribuir para a produtividade das forrageiras e, conseqüentemente, para a sustentabilidade dos pastos. Assim, alterações nos teores das formas orgânicas de P no solo e na sua remobilização na planta poderão sinalizar o início do processo de degradação dos pastos. Um dos objetivos deste trabalho foi relacionar os teores de P de diferentes frações inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po) com a produtividade dos pastos. Outro objetivo foi avaliar a atividade da fosfatase ácida (APase) e da ribonuclease (RNase) em forrageiras crescidas sob diferentes disponibilidades de P e mantidas sob diferentes intensidades de corte. Para atender ao primeiro objetivo foram coletadas amostras de solo de seis pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú com diferentes idades e produtividades, cultivados em um Latossolo Vermelho-Amarelo arenoso, em Brasilândia de Minas, região noroeste de Minas Gerais. Determinaram-se os teores de Pi e Po das frações mais lábeis, extraídas por resina e NaHCO₃, Pi e Po extraídos com NaOH e Pi extraído com H₂SO₄, sendo estas últimas frações, consideradas pouco lábeis. Também foram coletadas amostras de folha, coleto e raiz da forrageira para determinar a atividade da APase e RNase. Para avaliar relação entre a atividade das enzimas e a remobilização de P, plantas de *B. decumbens* e de *Panicum maximum* cv. Tanzânia foram cultivadas em casa de vegetação, em amostras de um Latossolo Vermelho-Amarelo argiloso, que receberam as doses de 100, 200 e 500 mg dm⁻³ de P, e mantidas sem corte e sob duas alturas de corte específicas para cada forrageira. As atividades da

APase e RNase foram determinadas em amostras de folha, base do caule (coleto) e raiz coletadas até 45 dias após o início dos cortes.

A maior produtividade dos pastos foi associada a maiores teores de Pi e Po extraídos pela resina de troca aniônica e pelo NaHCO₃, 0,5 mol L⁻¹, que se caracterizam por serem mais lábeis. Assim, os teores destas frações podem ser indicadores sensíveis para diagnosticar o processo de degradação dos pastos. Os teores foliares de P relacionaram positivamente com os teores de Pi e Po das frações extraídas pela resina e pelo NaHCO₃, e foram significativamente maiores na forrageira dos pastos mais produtivos. A atividade da APase e da RNase não se relacionou com os teores foliares de P e com os teores desse elemento no solo, nas frações mais lábeis (P-resina e P-NaHCO₃), mas houve maior atividade dessas enzimas nos pastos mais produtivos. Não houve diferença significativa entre a produção de biomassa da *Brachiaria* e do *Panicum*, mas a adição de P propiciou maior produção e maior teor deste nutriente na parte aérea destas forrageiras. As plantas com menor altura de corte apresentaram menor produção e maiores teores de P na parte aérea. Ocorreu efeito significativo das doses de P sobre a atividade da APase e da RNase nas duas forrageiras. As plantas cultivadas com a menor dose de P apresentaram as maiores atividades dessas enzimas e maior eficiência de utilização de P (EUP). Independentemente da altura de corte, a *Brachiaria* apresentou maior teor de P e maior eficiência de aquisição deste nutriente, fato suportado pela maior atividade da APase nas raízes dessa forrageira. A atividade de ambas as fosfatases decresceu com a idade das plantas. No tratamento com a menor altura de corte, independentemente da dose de P, tanto a *Brachiaria* quanto o *Panicum* apresentaram menor EUP. Isso ocorreu associado à maior atividade das enzimas APase e RNase, indicando que outros mecanismos relacionados à adaptação das plantas a baixas disponibilidades de P podem estar envolvidos.

ABSTRACT

NUNES, Flancer Novais, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December of 2005.

Phosphatase activity in forrages and phosphorus fractions as indicator degradation of pastures. Adviser: Reinaldo Bertola Cantarrutti. Committee Members: Ivo Ribeiro da Silva and Roberto Ferreira de Novais.

The low P availability is one of the main constraints to crop productivity in tropical soils. In Brazil, a great proportion of pastures is degraded, even though the tropical grasses are adapted to the low fertility conditions. The organic P forms constitute a large reservoir of this nutrient on soils; thus, it is expected that Po contributes to maintain the availability of P in the soil, which is necessary to the maintenance of the forrage grasses productivity. Under deficient P conditions, the remobilization of this nutrient in the plant is another factor that can contribute for the forrages productivity and, consequently, for the pastures sustainability. Thus, alterations in concentration of Poforms in the soil and their remobilization in the plant may indicate the beginning of pastures degradation process. One of the objectives of this work was to relate the P concentration of different inorganic (Pi) and organic (Po) fractions with the pasture productivity. Another objective was to evaluate acid phosphatase (APase) and ribonuclease (RNase) activities in forrages grown under different P availabilities and kept under different cut intensities. In order to accomplish the first objective soil samples from six pastures of *Brachiaria brizantha* cv. Marandú with different ages and productivities cultivated in a loamy-sand Red Latosol, were collected in Brasilândia de Minas, northwestern Minas Gerais state. In these soil samples it was quantified the concentrations of Pi and Po of the more labile fractions, extracted with resin and NaHCO₃, and the less labile Pi and Po fractions were extracted with NaOH, and Pi extracted with H₂SO₄. Also, leaf, crown and roots samples were collected to determine the APase and RNase activity. To evaluate the relation between the enzymes activity and P remobilization, *B. decumbens* and *Panicum maximum* cv. Tanzânia plants were cultivated in a greenhouse, in pots filled with a clayey Yellow Red Latosol. The soil was fertilized with 100, 200 and 500 mg dm⁻³ of P, and plants were kept without cutting, or under two specific cut heights for each. The APase and RNase activities were

determined in samples of leaf, base crown and root collected up to 45 days after beginning the cutting treatments.

The highest pastures productivity was associated to the biggest Pi and Po concentrations extracted with the anion exchange-resin and NaHCO₃, 0,5 mol L⁻¹, which are more labile. Thus, the concentration of these fractions can be more sensitive to early diagnosis the pasture degradation process. The leaf P concentration related positively with Pi and Po concentrations of the fractions extracted with resin and the NaHCO₃, and were significantly higher in plants from the most productive pasture. The APase and the RNase activity did not relate with leaf P concentration and the concentration of this element in soil labile fractions (resin-P and NaHCO₃-P), but greater activity of these enzymes was observed in the most productive pasture. There was no significant difference between the biomass production of the *Brachiaria* and the *Panicum*, but the P addition led to greater production and greater concentration of this nutrient in shoots of these. The plants wiht shorter cut height presented smaller production and greater P concentration in shoots. A significant effect of P rates occurred on the APase and the RNase activity in the two forrages. The plants cultivated with the smaller P rate presented the highest activity of these enzymes and greater P use efficiency (PUE). Independently of the cut height, the *Brachiaria* presented greater P concentration and greater acquisition efficiency of this nutrient, apparently due to the high root APase activity in this forrage. The activity of both phosphatases decreased with the age of the plants. In the treatment with smaller cut height, independently of the P rate, not only the *Brachiaria*, but also the *Panicum* presented smaller PUE. This occurred associated to the highest APase and RNase activities, indicating that other mechanisms may be contribute to the adaptation of these species to low P availability.

INTRODUÇÃO GERAL

Uma grande proporção das pastagens brasileiras encontra-se degradada, mesmo sendo a maioria das forrageiras adaptadas às condições de baixa fertilidade dos solos. Considerando que a pecuária tem sido praticada nos solos mais pobres e que tem como característica principal o extrativismo, a produtividade e a sustentabilidade das pastagens tropicais são estreitamente relacionadas com a fertilidade do solo e com a ciclagem dos nutrientes (Dias Filho & Serrão, 1987). A pastagem degradada caracteriza-se, entre outros indicadores, pela baixa produtividade e pela presença de plantas espontâneas, o que, de modo geral, acentua-se a partir do quinto ano após o estabelecimento.

A baixa disponibilidade de P dos solos é considerada um dos principais limitantes da produtividade em condições tropicais, onde predominam solos altamente intemperizados e com elevada capacidade de adsorção de P (Saraiva et al., 1993; Correa & Reichardt, 1995; Garcia-Montiel et al., 2000). Nessas condições, a disponibilidade de P depende, em parte, da intensidade de sua ciclagem biogeoquímica. Desta forma, a queda na produtividade das pastagens com o tempo pode ser atribuída a uma menor ciclagem do P (Oberson et al., 1999).

Informações sobre as características químicas das frações inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po) do P no solo são necessárias ao entendimento de seu ciclo biogeoquímico e de seu papel na nutrição das plantas. Nesse contexto, métodos de fracionamento de P no solo, têm evidenciado correlações significativas entre o crescimento das plantas e os teores das frações mais lábeis de Po e Pi (Taranto et al., 2000). Apesar disso, esses métodos podem não ser seletivos para estimar algumas frações de Po (Potter et al., 1991). Taranto et al. (2000) admitem que eles podem não discriminar a importância biológica de diferentes frações, além do que, podem subestimar ou superestimar algumas delas. O Po do solo é compreendido, principalmente, pelos P-diésteres (ácidos nucleicos e fosfolipídios) e P-monoésteres (fosfatos de inositol), sendo estes mais recalcitrantes. A disponibilidade de P para as plantas, proveniente do Po depende da intensidade da ciclagem biogeoquímica, que é afetada pelas condições climáticas, fertilidade do solo, pela posição do solo no relevo, pela microbiota e pelo tempo de contato da fonte orgânica com o solo (Taranto et al.,

2000). Turner et al. (2003), estudando diferentes formas de Po e sua contribuição potencial à disponibilidade de P, em solos da região semi-árida no oeste dos Estados Unidos verificaram que os P-monoésteres foram os mais disponíveis, e que seus teores correlacionaram positivamente com a precipitação pluvial média anual, com o teor de carbono orgânico e com teor argila e, negativamente, com o pH do solo e a temperatura média anual.

Trabalhando com pastagens na Amazônia brasileira, Garcia-Montiel et al. (2000) encontraram incremento nos teores de P disponível pela resina de troca aniônica após a queima da floresta, o que contribuiu para suprir a demanda elevada de P das forrageiras na fase de estabelecimento. Tomando o solo com floresta como referência, esses autores observaram que os teores de Po aumentaram com a idade das pastagens, enquanto os teores de P-resina, P-Ca e P-residual decresceram. Considerando a demanda de menor disponibilidade de P após a fase de estabelecimento e que o Po representa de 40 a 60 % do P total do solo (Novais & Smyth, 1999), espera-se que este contribua para manter a disponibilidade de P necessária à manutenção da produtividade das pastagens. No entanto, a importância do Po como fonte de P para as plantas depende de sua hidrólise enzimática (Tate & Newman, 1982; Oehl et al., 2001; Li et al., 2003; Yadav & Tarafdar, 2003), realizada pelas fosfatases (Hayes et al., 1999; Yun & Kaeppler, 2001; Yadav & Tarafdar, 2003). Assim, a disponibilidade do P seria controlada não apenas pelo equilíbrio entre a sua adsorção e dessorção, mas também pelos fatores que afetam a atividade das fosfatases.

A adaptação das forrageiras à baixa disponibilidade de P no solo é um fator que tem favorecido a sustentabilidade das pastagens. Para contornar a deficiência de P, as plantas desenvolveram estratégias, tais como: maior crescimento do sistema radicular (Wissuwa, 2003), exsudação de fosfatase ácida (APase), ribonuclease (RNase) e ácidos orgânicos para a rizosfera (Gaume et al., 2001; Yadav & Tarafdar, 2003; Dong et al., 2004) e, ainda, maior ciclagem interna do nutriente, ou remobilização, que consiste no transporte do nutriente para drenos preferenciais. As duas primeiras estratégias conferem maior eficiência na aquisição, enquanto a remobilização contribui para maior eficiência na utilização de P, facilitando a adaptação das plantas a condições nutricionais limitantes. A remobilização está associada à senescência natural das folhas e pode ser intensificada por algum tipo de estresse. Nanamori et al. (2004) observaram que plantas de arroz e de *Brachiaria* cultivadas em solução nutritiva sem P

apresentaram maior atividade de RNase e APase. A relação entre a elevada atividade dessas enzimas e a maior remobilização interna de P nas plantas também foi observada por Bosse & Köck (1998).

Apesar da baixa disponibilidade de P nos solos ser um dos principais fatores de degradação das pastagens, o teor de P disponível nas análises de solo usuais pode não ser um indicador sensível para diagnosticar o início deste processo. Nesse sentido, é possível que alterações nos teores de P_o , assim como nos processos envolvidos em suas transformações, sejam mais sensíveis para este diagnóstico. Adicionalmente, fatores relacionados com a taxa de remobilização de P na planta, como alterações na atividade de fosfatases, podem contribuir para um diagnóstico precoce do processo de degradação, o que possibilitaria a adoção de medidas preventivas. Este trabalho teve como objetivo geral avaliar se os teores de P_o e P_i de diferentes frações no solo e a atividade da APase e da RNase são potenciais indicadores para o diagnóstico precoce do processo de degradação das pastagens.

Capítulo 1 - Atividade de Fosfatases e Frações Orgânicas de Fósforo no Solo na Produtividade de Pastagens em Solos Deficientes neste Nutriente

Embora as gramíneas forrageiras tropicais sejam adaptadas a condições de baixa fertilidade do solo, uma grande proporção das pastagens brasileiras encontra-se degradada. Nos solos tropicais, a baixa disponibilidade de P é a principal limitante da produtividade, devido à grande capacidade de adsorção de P desses solos. As formas orgânicas de P nesses solos representam de 40 a 60 % do P total. A adaptação das plantas a solos com baixa disponibilidade de P pode estar relacionada com a maior capacidade de utilização de suas formas orgânicas por meio das fosfatases que hidrolisam estas formas de P. Outra estratégia adaptativa é uma maior remobilização de P, decorrente de maior atividade da fosfatase ácida (APase) e da ribonuclease (RNase). Dada a importância do P para a produção das gramíneas forrageiras este trabalho teve por objetivo avaliar a relação entre os teores de P no solo, em frações inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po), com o estado de degradação dos pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. Adicionalmente, objetivou-se avaliar a relação entre a remobilização de P nessa forrageira e a produtividade da pastagem sob elevada limitação de P. Para isso, em seis pastos de *B. brizantha* em vários estádios de degradação foram coletadas amostras de solo e planta. O estado de degradação dos pastos foi caracterizado pela altura da forrageira, área de solo exposta e pela frequência de plantas invasoras. As amostras de solo foram caracterizadas quimicamente e fisicamente e quantificado o P em frações inorgânicas e orgânicas, por meio de fracionamento sequencial. Nas amostras de plantas, foram caracterizados os teores de P e a atividade de APase e de RNase na folha, base do caule (coleto) e raiz. Os resultados indicaram que a maior produtividade dos pastos foi associada a maiores teores de Pi e Po extraídos pela resina de troca aniônica e pelo NaHCO_3 , $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, que se caracterizam por ser mais lábeis. Assim, os teores destas frações podem ser indicadores sensíveis do processo de degradação dos pastos. Os teores foliares de P relacionaram positivamente com os teores de Pi e Po das frações extraídas pela resina e pelo NaHCO_3 , e foram significativamente maiores na forrageira dos pastos mais produtivos. A atividade da APase e da RNase não correlacionou com os teores foliares de P e com os teores deste nutriente nas frações mais lábeis (P-resina e P- NaHCO_3), mas houve maior atividade dessas enzimas nos pastos mais produtivos.

Palavras-chave: fósforo orgânico, fracionamento de P, *Brachiaria brizantha*, enzima

Chapter 1 - Phosphatase Activity and Soil Organic P Fractions and the Pastures Productivity in Deficient Soil in this Nutrient

Although tropical grasses are adapted to the low fertility conditions of the soil, a great proportion of Brazilian pastures are currently degraded. In tropical soils, the low P availability is the main yield limiting factor, due to the great P adsorption capacity of these soils. The organic P forms (Po) in these soils represent from 40 to 60% of total P. The plants adaptation to soils with low P availability can be related with the in greater ability to use the Po through hydrolysis by phosphatases. Another adaptation strategy is the high P remobilization, resulting from the higher acid phosphatase (APase) and ribonuclease (RNase) activities. Given the importance of P for grasses production this work aimed at evaluating the relationship between P concentration in inorganic (Pi) and organic (Po) fractions on soil, with pasture degradation degree of *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. Additionally, it was also evaluated the relationship between P remobilização in this forrage and the pasture productivity under strong P limitation. To accomplish that, were collected soil and plant samples in six pastures of *B. brizantha* in several degradation degrees. The pasture degradation degree was characterized based on plant height, exposed soil area and weeds frequency. The soil samples were chemically and physically characterized and Pi and Po fractions were quantified through a sequential fractionation. In the plants samples, it was characterized the P concentrations, APase and RNase activities in the leaf, crown and roots. The results indicated that the more productive pastures were associated with soils that presented the biggest Pi and Po fractions extracted by the anion exchange resin and 0,5 mol L⁻¹ NaHCO₃, which are considered as being more labile. Thus, these fractions concentration can be sensitive indicator to diagnosis the pastures degradation process. The leaf P concentrations related positively with Pi and Po concentrations of P fractions extracted with anion exchange resin and NaHCO₃, and were significantly higher in the most productive pasture. The APase and RNase activities showed no relationship with leaf P concentration and P concentration in labile fractions, but greater activity of these enzymes were found in the most productive pastures.

Key words: organic phosphorus, P fractionation, *Brachiaria brizantha*, enzyme

Introdução

A baixa disponibilidade de P é considerada um dos principais limitantes da produtividade nos agroecossistemas tropicais. Nesses, predominam, de modo geral, solos altamente intemperizados, que têm como principal característica a elevada capacidade de adsorção de P (Saraiva et al., 1993; Correa & Reichardt, 1995). Embora as gramíneas forrageiras tropicais sejam, de modo geral, adaptadas a solos de baixa fertilidade, uma grande proporção das pastagens brasileiras encontra-se em estágio de média a elevada degradação, que se acentua entre o quinto e o décimo ano após o estabelecimento.

No Brasil, o estabelecimento das pastagens é muitas vezes precedido da queima dos restos vegetais, que contribui para o estabelecimento das forrageiras em decorrência da disponibilização de até 50 kg ha⁻¹ de P (Garcia-Montiel et al., 2000). Esta quantidade de P satisfaz, de maneira geral, a demanda inicial das forrageiras por elevados teores de P disponível (Santos et al., 2002). No entanto, em razão da grande capacidade de adsorção de P dos solos, os teores de P-disponível decrescem drasticamente nos três a cinco primeiros anos após a implantação das pastagens, o que em muitos casos contribui para o início do processo de degradação (Garcia-Montiel et al., 2000). Parte do P pode ser convertida em formas orgânicas (Po). Garcia-Montiel et al. (2000), trabalhando com pastagens na Amazônia brasileira, observaram que os teores de Po nos solos das pastagens bem estabelecidas, com mais de vinte anos, aumentaram em torno de 40 % em relação ao solo da mata nativa. Buehler et al. (2002) observaram que mais de 14 % do fósforo inorgânico (Pi) adicionado a um Latossolo como fertilizante mineral foi recuperado em formas orgânicas, extraídas com NaOH e NaHCO₃, depois de apenas 14 dias de incubação, mostrando a rápida transformação do Pi em formas orgânicas lábeis de P no solo.

O acúmulo de formas orgânicas de P no solo faz com ele corresponda de 40 a 60 % do P-total nos solos mais intemperizados (Novais & Smyth, 1999). Na solução do solo são encontradas concentrações de Po que, em muitos casos, são maiores do que as de Pi, comumente, menores que 5 µmol L⁻¹ (Richardson et al., 2005). Os teores de Po nas frações lábeis apresentam correlação negativa, de modo geral, com os valores de pH dos solos (Turner & Haygarth, 2005).

O Po do solo é representado principalmente pelos P-diésteres e P-monoésteres (Tate & Newman, 1982). Os P-monoésteres correspondem de 50 a 90 % do Po do solo (Nziguheba & Bünemann, 2005), dada a possibilidade de serem produtos de síntese e ressíntese microbiana (Salas et al., 2003) e também por serem menos lábeis, dada a elevada adsorção aos minerais do solo (Taranto et al., 2000; Turner et al., 2005). A desfosforilação das formas orgânicas de P é promovida pelas fosfatases (Hayes et al., 1999; Yun & Kaeppler, 2001; Yadav & Tarafdar, 2003).

A utilização do Po como fonte de P pelas plantas tem sido intensamente investigada. Chen et al. (2003), cultivando *Pinus radiata* e *Lolium perenne* em 15 solos de pastagens da Nova Zelândia verificaram que a maior capacidade de aquisição de P e a maior produção de matéria seca de *P. radiata* relacionaram com sua maior capacidade de utilizar formas orgânicas deste elemento, que foi atribuído à maior síntese de fosfatases, principalmente, nos solos pobres em P.

Richardson et al. (2000) avaliaram a capacidade do trigo (*Triticum aestivum* L.) cultivado em meio nutritivo estéril, em utilizar o P suprido na forma de hexafosfato de myo-inositol (HPI-ácido fítico), ácido fosfoglicérico, adenosina monofosfato, ácido ribonucléico, glucose 1-fosfato e de NaH_2PO_4 . Constataram que, com todas as fontes, exceto com o HPI, a produção de matéria seca foi equivalente àquela das plantas supridas com a fonte inorgânica, o que foi atribuído à elevada atividade de fosfomonoesterases nessas plantas. A ineficiência do HPI como fonte de P deveu-se ao fato do trigo não produzir fitase, fosfomonoesterase específica para a sua hidrólise. A limitada efetividade do fitato como fonte de P foi observada, também, por Richardson et al. (2001). Por outro lado, a utilização de P-monoésteres (fitatos) por gramíneas de clima temperado em solos com baixos teores de P foi verificada por Turner et al. (2005), e foi atribuída à hidrólise por fitases produzidas pelas plantas e por microrganismos. Esses autores também constataram correlação positiva e significativa entre os teores desta forma de Po com o Po extraído com NaHCO_3 . Toor et al. (2003), avaliando formas orgânicas de P lixiviadas de solos com pastagens de clima temperado, verificaram que até 21 % do P não-reativo (Po e formas condensadas de P) foi hidrolizado pela atividade de fosfatases nativas do solo. Quando foram adicionadas enzimas específicas, detectaram que 57 % do P não-reativo foi hidrolizado, sendo 23 % de formas mais facilmente hidrolizáveis de P-monoésteres, 20 % de HPI (P-monoéster mais recalcitrante) e 14 % de P-diésteres (fosfolipídios e ácidos nucleicos).

Assim, a importância do Po como fonte de P para as plantas é dependente de sua hidrólise enzimática (Carreira et al., 2000; Oehl et al., 2001; Turner et al., 2003; Li et al., 2004), que é afetada pelas condições climáticas, pela fertilidade do solo, pela microbiota e pelo tempo de contato da fonte orgânica com o solo (Taranto et al., 2000). Assim, a disponibilidade do P é controlada não apenas pelo equilíbrio entre Pi-solução (I) e Pi-fase sólida (Q), mas também pelos fatores que afetam a hidrólise do Po.

Considerando que após o estabelecimento, as forrageiras requerem menor disponibilidade de P, e que o teor de Po do solo tende a ser expressivo, espera-se que frações orgânicas de P contribuam para garantir a disponibilidade adequada deste nutriente para a manutenção da produtividade das pastagens. Os baixos teores de P disponível requeridos nessa fase devem-se a mecanismos de adaptação, dentre os quais se destaca a remobilização ou ciclagem bioquímica de P.

A remobilização do P na planta pode ser avaliada pela atividade da fosfatase ácida (APase) e da ribonuclease (RNase). Esta remobilização é mais importante em plantas cultivadas em ambiente deficiente em P (Bosse & Köck, 1998; Nanamori et al., 2004). Richardson et al. (2000) verificaram que a maior atividade de fitase em plantas de trigo estava associada à remobilização de P, e não à hidrólise de fitatos no meio de cultura. Assim, especula-se que as forrageiras adaptadas a solos com baixos teores de P apresentem maior atividade das enzimas RNases e APases.

Devido à importância do P para a produção das gramíneas forrageiras este trabalho teve por objetivo avaliar a relação entre os teores de P em frações inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po) com o estado de degradação dos pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú. Adicionalmente, avaliou-se a relação entre a remobilização de P nessa forrageira e a produtividade de pastos cultivados em condições de baixa disponibilidade de P.

Material e Métodos

Amostragem de solo e planta

Foram estudados seis pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú com idades entre dez e trinta anos e com diferentes produtividades (Quadro 1), localizados na região de Brasilândia de Minas, noroeste de Minas Gerais. O clima da região é o tropical, com temperatura média anual de 20,5 °C, sendo a média do mês mais frio de 17 °C e a do mês mais quente de 22,5 °C. A região situa-se a 900 m de altitude, com precipitação média anual de 1.000 mm. O período seco é de quatro a seis meses compreendido entre abril e setembro, com um déficit hídrico médio de 150 mm.

No mês de agosto de 2004, dentro do período mais seco do ano, áreas de 100 m² com características representativas dos pastos foram demarcadas e quatro amostras de solo foram coletadas em parcelas de 1 m², nas profundidades de 0-5, 5-10 e 10-20 cm, sendo consideradas quatro repetições. As amostras foram secadas ao ar, passadas em de peneira com malha de 2 mm e homogeneizadas. As amostras foram caracterizadas química (Defelipo e Ribeiro, 1997) e fisicamente (Ruiz, 2005) (Quadro 2).

Nessas mesmas áreas, em abril de 2005, no final da época chuvosa, foram coletadas quatro amostras da forrageira compostas por dois perfilhos, no mesmo estágio de desenvolvimento. Os perfilhos foram subdivididos obtendo-se amostras de aproximadamente 5 cm da porção central da lâmina foliar, 2 cm da base do caule (coleto) e de 0,5 g de raízes, que foram lavados e imediatamente congelados em N₂ líquido, para posterior caracterização das enzimas APase e RNase. Amostras da forrageira foram separadas em folha nova (verdes) e folha velha (folhas em senescência, amareladas), para a determinação dos teores de P e N.

Quadro 1. Categorias e características dos seis pastos de *Brachiaria brizantha* cv Marandú, em Brasilândia de Minas, Minas Gerais

Pasto	Categoria do pasto	Característica
1	Produtivo.	Estabelecido há 15 anos. Forrageira com excelente vigor vegetativo, com 30 a 40 cm de altura, cobrindo mais de 95 % do solo, sem ocorrência de plantas invasoras. Adubado em janeiro de 2003 com 50 kg ha ⁻¹ de N (uréia).
2	Produtivo.	Estabelecido há 20 anos. Forrageira com bom vigor vegetativo, com altura em torno de 20 cm, cobrindo cerca de 90 % do solo, sem ocorrência de plantas invasoras. Adubado em janeiro de 2003 com 50 kg ha ⁻¹ de N (uréia).
3	Estádio intermediário de degradação.	Estabelecido há 10 anos. Forrageira com vigor produtivo menor que o dos pastos 1 e 2, cobrindo cerca de 80 % do solo, com ocorrência esporádica de plantas invasoras.
4	Degradado.	Forrageira recém-semeada sobre pasto degradado, após roçagem mecânica e revolvimento do solo com grade, sem adubação. Baixa cobertura do solo em decorrência de falha na germinação, cobrindo menos de 60 % do solo.
5	Avançado estágio de degradação.	Estabelecido há 16 anos. Forrageira com altura inferior a 10 cm. Plantas com baixo vigor vegetativo, perfilhamento reduzido, cobrindo em torno de 60 % do solo. Elevada presença de plantas invasoras, predominando plantas de folhas largas.
6	Abandonado.	Pasto abandonado há 30 anos, com vegetação de cerrado em regeneração. Extrato arbóreo predominante e gramíneas forrageiras no sub bosque.

Quadro 2. Caracterização química e física de amostras dos solos com pastos de *Brachiaria brizantha* cv Marandú, em Brasilândia de Minas.

Pasto ¹	Profundidade	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	MO	Areia	Silte	Argila
	-----cm-----		--mg dm ⁻³ --		-----cmol _c dm ⁻³ -----			-----dag kg ⁻¹ -----			
1	0-5	6,60	28,9	70	2,45	2,44	0,00	2,64	81	8	11
	5-10	6,92	23,7	30	2,35	1,47	0,00	1,63	79	9	12
	10-20	7,03	8,9	16	2,26	1,29	0,00	1,51	76	9	15
2	0-5	5,77	2,1	36	0,99	1,00	0,10	2,26	77	8	15
	5-10	5,34	1,2	28	0,85	0,68	0,48	1,63	77	6	17
	10-20	5,17	0,4	21	0,49	0,41	0,86	1,26	72	9	19
3	0-5	6,00	6,2	100	2,16	1,62	0,00	2,76	71	6	23
	5-10	5,82	3,4	42	1,61	1,26	0,00	2,39	70	4	26
	10-20	5,42	0,3	22	0,50	0,56	0,86	1,51	64	5	31
4	0-5	5,97	1,6	121	1,86	1,51	0,00	2,89	60	15	25
	5-10	5,90	0,5	67	1,65	0,94	0,19	3,01	57	16	27
	10-20	5,12	0,0	30	0,83	0,51	1,06	1,76	51	18	31
5	0-5	6,28	1,4	56	2,48	2,55	0,00	2,89	61	13	26
	5-10	5,68	0,5	30	1,28	1,06	0,29	2,13	60	12	28
	10-20	5,28	0,2	20	0,52	0,53	1,15	1,51	55	14	31
6	0-5	5,18	0,4	131	0,17	0,44	1,34	3,26	55	12	33
	5-10	5,03	0,1	57	0,00	0,09	2,40	2,13	53	12	35
	10-20	5,07	0,2	89	0,00	0,17	2,02	2,76	48	14	38

¹ 1 e 2 pasto produtivo, 3 pasto com degradação intermediária, 4 pasto degradado, 5 pasto com degradação avançada e 6 pasto abandonado; pH em água – relação 1:2,5; P e K – Extrator Mehlich 1; Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ – Extrator KCl 1mol L⁻¹; Matéria Orgânica (MO) Walkley & Black; Argila – método da pipeta; Areia - peneiramento

Para o fracionamento do P no solo adotou-se o método descrito por Hedley et al. (1982), com modificações conforme Araújo et al., (1993). Na primeira fração o Pi e Po facilmente lábeis foram extraídos com resina de troca aniônica. Para isso, em um tubo de centrifuga adicionaram-se 2,5 g de solo, 30 mL de água deionizada e uma lâmina de resina de troca aniônica (tipo base forte, 204U2ARA, Ionics, Inc., USA). Após 16 h de agitação a 150 rpm, a 4 °C para minimizar a mineralização do Po, o sobrenadante foi descartado após a centrifugação a 2.600 g por 10 min a 4 °C e o P adsorvido à resina foi extraído pela sua agitação a 150 rpm por 1 h, em 10 mL de HCL 0,5 mol L⁻¹.

Na sequência extraiu-se o Pi e o Po, inicialmente com 30 mL de NaHCO₃ 0,5 mol L⁻¹, depois com 30 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e, em seguida, Pi com 30 mL de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, todos extratos foram obtidos após 16 h de agitação a 150 rpm, a 4 °C, e centrifugação a 2600 g por 10 min a 4 °C. Tanto o Pi como o Po-NaHCO₃ são

considerados frações lábeis; o Pi e o Po extraídos com NaOH e o Pi (P-Ca) extraído com H₂SO₄ são consideradas frações pouco lábeis (Tiessen et al., 1984).

Uma alíquota do extrato de cada etapa foi submetida à digestão com K₂S₂O₈ em meio alcalino. Para isso, empregou-se do método proposto Cabrera & Beare (1993), com modificação que consistiu na digestão do extrato a 80 °C por 12 h, para determinação do P total (Pt). Foi ajustado o pH em todos os extratos utilizando p-nitrofenol como indicador e os teores de Pi e Pt foram determinados por espectrofotometria, com base na formação do complexo fosfo-molibdídico usando ácido ascórbico como redutor. Estimaram-se os teores de Po pela diferença entre os teores de Pt e Pi.

Os teores totais de P no solo foram determinados após digestão nítrico-perclórica (4:1 v/v) de 0,5 g de solo a 110 °C. No extrato, o teor P foi determinado por espectrofotometria conforme já citado.

Atividades enzimáticas

As enzimas RNase e APase no material vegetal foram extraídas macerando, aproximadamente, 0,5 g das amostras congeladas em almofariz resfriado, com 2 mL do tampão de acetato de sódio 100 mmol L⁻¹, pH 5,6. O extrato foi centrifugado a 17.000 g a 4 °C por 20 min e o sobrenadante foi congelado a - 80 °C. Nesse sobrenadante foi determinado o conteúdo de proteína, tomando como padrão a albumina de soro bovino, conforme Lowry et al. (1951).

A atividade da RNase foi determinada conforme Abel & Glund (1986). Para isso, uma alíquota de 100 µL do extrato foi adicionada a 50 µL do tampão de acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ (pH 5,6), na presença de 250 µg de RNA como substrato. Após incubação por 10 min a 37 °C, foi adicionado 1,35 mL de solução contendo 500 mL L⁻¹ de etanol, 48 mmol L⁻¹ de acetato de sódio (pH 5,6), 12,5 mmol L⁻¹ de acetato de magnésio e 0,85 mmol de nitrato de lantânio para precipitar o RNA remanescente. Depois da precipitação do RNA por 45 min a -20 °C e centrifugação a 23.000 g por 5 min, determinou-se a absorvância do sobrenadante a 260 nm (Espectrofotometro Smart Spe 3000, Bio Rad, Inc., USA). Definiu-se uma unidade enzimática como a quantidade de enzima no extrato que promoveu o aumento de uma unidade na absorbância a 260 nm por minuto por centímetro (Wilson, 1975).

A atividade da fosfatase ácida foi determinada pela incubação de 500 µL do extrato, por 5 min a 37 °C, com 200 µL do substrato constituído por p-nitrofenolfosfato disódio 2 mmol L⁻¹ e de acetato de sódio 150 mmol L⁻¹ (pH 5,6). Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 300 µL de solução saturada de carbonato de sódio. A quantidade de p-nitrofenol produzido foi mensurada por espectrofotometria de absorção molecular a 400 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima no extrato capaz de hidrolizar 1 mmol de p-nitrofenolfosfato por minuto (Ozawa et al., 1995).

Os resultados para ambas as enzimas foram expressos em unidade enzimática por massa de proteína.

Determinação de fósforo e nitrogênio nos tecidos vegetais.

No material vegetal seco e moído foram determinados os teores de N por destilação Kjeldahl, após digestão sulfúrica. Após digestão nítrico-perclórica (4:1 v/v) do material vegetal seco, o P foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular, com base na formação do complexo fosfo-molibídico usando ácido ascórbico como redutor.

Análise estatística

Os dados foram analisados de acordo com delineamento inteiramente casualizado. Os teores de P nas diferentes frações apresentaram a mesma tendência de variação com a profundidade, de modo que se optou por trabalhar com os teores médios ponderados para a camada de 0-20 cm de profundidade. Os efeitos das variáveis controle foram avaliados estatisticamente por meio de contrastes ortogonais, aceitando significância até a 10 %.

Resultados e Discussão

As características relacionadas com a fertilidade dos solos, aparentemente, não foram responsáveis pelos diferentes níveis de degradação dos pastos (Quadro 2). O solo do pasto 6 (Abandonado) apresentou os menores valores de pH (pH 5,09) na camada 0-20 cm, e teores elevados de Al^{3+} . Nos demais pastos os solos não apresentaram grandes variações de pH. Apesar do aumento do pH do solo poder reduzir a adsorção do P pelos oxi-hidróxidos de Fe e Al, o que resultaria em maior disponibilidade deste elemento (Lindsay, 1979; Novais & Smyth, 1999), verifica-se que não houve relação entre o pH do solo e a produtividade dos pastos.

Não houve relação evidente da disponibilidade de P, K, Ca e Mg e dos teores de MO com o estado de degradação dos pastos, visto que os solos dos pastos mais produtivos (1 e 2) apresentaram os menores teores de K e de MO, e teores de P (exceto o pasto 1), Ca e Mg equivalentes aos dos pastos degradados (pastos 4 e 5) (Quadro 2). O maior teor de P pelo Mehlich-1 na camada de 0 a 20 cm ($17,6 \text{ mg dm}^{-3}$) no pasto 1 pode ser atribuído à contribuição de formas de P ligado a Ca (P-Ca), decorrente do provável uso de fosfato natural no passado, dado o baixo teor de P_i extraído pela resina de troca aniônica ($3,8 \text{ mg dm}^{-3}$) (Quadro 3). Essa possibilidade é suportada, também, pelo maior teor de P extraído com H_2SO_4 , indicando maior presença de P-Ca. Esses resultados sugerem que as análises químicas de rotina de solos no Brasil podem não ser eficazes na previsão do estado produtivo das pastagens, evidenciando a necessidade de outros indicadores de maior sensibilidade para detectar o processo de degradação.

Os teores de P das diferentes frações inorgânicas e orgânicas decresceram com a profundidade do solo (Quadro 3), o que era esperado e ratifica a tendência constatada por Garcia-Montiel (2000) e Oberson et al. (1999). Considerando que o teor de P das frações inorgânicas e orgânicas apresentaram a mesma tendência de redução com a profundidade, utilizaram-se os teores médios ponderados na camada de 0-20 cm.

Quadro 3. Teor de fósforo das frações inorgânicas (Pi) e orgânicas (Po) extraídas pela resina de troca aniônica, NaHCO₃, NaOH e H₂SO₄ em amostras de solos com pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú, em Brasilândia de Minas.

Pasto ¹	Prof.	Resina		NaHCO ₃		NaOH		H ₂ SO ₄
		Pi	Po	Pi	Po	Pi	Po	Pi
	-cm-	-----mg kg ⁻¹ -----						
1	0-5	8,80 (0,24)	3,65 (0,52)	2,69 (0,15)	2,83 (0,12)	12,48 (1,07)	20,39 (1,42)	92,75 (2,69)
	5-10	3,71 (0,24)	0,92 (0,14)	1,07 (0,10)	2,39 (0,11)	8,96 (0,19)	14,63 (1,38)	107,79 (4,88)
	10-20	1,46 (0,17)	0,40 (0,02)	0,58 (0,3)	1,78 (0,09)	6,10 (0,53)	11,72 (0,23)	46,72 (7,97)
	0-20	3,85 (0,15)	1,34 (0,17)	1,23 (0,09)	2,20 (0,08)	8,41 (0,17)	14,61 (0,89)	73,50 (4,78)
2	0-5	4,95 (0,21)	1,26 (0,08)	1,13 (0,10)	3,34 (0,19)	4,42 (0,26)	17,96 (1,31)	16,49 (2,87)
	5-10	4,04 (0,21)	0,84 (0,05)	0,63 (0,05)	2,84 (0,22)	4,43 (0,60)	15,19 (0,87)	10,15 (1,12)
	10-20	3,90 (0,17)	0,21 (0,10)	0,35 (0,04)	5,03 (0,79)	3,98 (0,47)	11,26 (0,38)	6,76 (0,48)
	0-20	4,20 (0,19)	0,63 (0,04)	0,51 (0,06)	4,06 (0,37)	4,20 (0,40)	13,91 (0,73)	10,64 (1,06)
3	0-5	4,55 (0,70)	0,93 (0,18)	1,01 (0,08)	2,81 (0,20)	6,85 (0,32)	19,34 (0,53)	35,76 (2,31)
	5-10	2,85 (0,21)	0,25 (0,09)	0,62 (0,05)	2,56 (0,25)	4,48 (0,28)	16,95 (0,29)	31,72 (5,76)
	10-20	2,35 (0,14)	0,34 (0,03)	0,33 (0,03)	2,33 (0,21)	3,30 (0,15)	8,99 (1,20)	17,37 (1,93)
	0-20	3,03 (0,20)	0,47 (0,04)	0,57 (0,05)	2,51 (0,19)	4,48 (0,17)	13,56 (0,22)	25,56 (1,94)
4	0-5	2,46 (0,17)	0,62 (0,11)	0,58 (0,03)	2,92 (0,33)	7,67 (0,87)	15,83 (0,50)	20,95 (1,02)
	5-10	2,21 (0,10)	0,53 (0,17)	0,38 (0,05)	2,59 (0,14)	4,33 (0,26)	15,31 (0,84)	16,71 (1,67)
	10-20	1,27 (0,08)	0,39 (0,07)	0,16 (0,03)	1,70 (0,26)	3,53 (0,39)	10,43 (0,87)	12,29 (0,98)
	0-20	1,80 (0,06)	0,48 (0,11)	0,32 (0,02)	2,23 (0,24)	4,77 (0,31)	13,00 (0,51)	15,56 (1,07)
5	0-5	3,22 (0,19)	1,33 (0,11)	1,14 (0,04)	2,70 (0,16)	7,36 (0,27)	21,14 (1,05)	19,79 (4,17)
	5-10	2,64 (0,11)	1,21 (0,07)	0,38 (0,06)	2,73 (0,07)	3,65 (0,17)	15,55 (0,77)	6,18 (1,03)
	10-20	1,87 (0,12)	1,22 (0,14)	0,26 (0,01)	2,68 (0,20)	4,39 (0,30)	10,84 (0,83)	14,58 (0,77)
	0-20	2,40 (0,13)	1,25 (0,05)	0,51 (0,03)	2,70 (0,1)	4,95 (0,07)	14,59 (0,88)	13,78 (1,39)
6	0-5	3,31 (0,16)	1,20 (0,04)	0,53 (0,03)	4,37 (0,27)	6,19 (0,33)	24,86 (1,56)	20,42 (2,19)
	5-10	3,18 (0,09)	1,37 (0,08)	0,34 (0,03)	3,56 (0,18)	5,72 (0,06)	19,81 (0,99)	25,32 (0,48)
	10-20	1,77 (0,05)	1,23 (0,17)	0,10 (0,01)	2,57 (0,18)	3,45 (0,26)	14,60 (0,75)	16,77 (2,85)
	0-20	2,51 (0,09)	1,25 (0,05)	0,27 (0,02)	3,26 (0,20)	4,70 (0,17)	18,47 (1,05)	19,82 (1,70)

¹ 1 e 2 pasto produtivo, 3 pasto com degradação intermediária, 4 pasto degradado 5 pasto com degradação avançada e 6 pasto abandonado.

São apresentadas médias de quatro repetições com os respectivos erros padrão entre parênteses.

Os teores de P nas frações menos lábeis (Pi e Po-NaOH, e Pi-H₂SO₄) nos 20 cm superficiais, não apresentaram relação com as características de produtividade dos pastos (Quadro 3). No entanto, os teores de Po extraídos com NaOH e os de Po-resina e Po-NaHCO₃ (Quadro 3) foram significativamente maiores ($p < 0,01$) no pasto 6 (abandonado) do que nos pastos 4 e 5, estes com maior degradação (Quadro 4). O maior teor de Po no solo do pasto seis deve-se, provavelmente, a maior diversidade de espécies, sobretudo de leguminosas decorrente da regeneração do cerrado, desde que o pasto foi abandonado, há 30 anos. Segundo Oberson et al. (1999), a presença de leguminosas em pastagens de gramíneas tropicais favorece o acúmulo do Po (principalmente o Po-NaHCO₃), e também maiores teores de Pi do que em pastagens não-consorciadas. Isso foi atribuído ao fato de a presença da leguminosa aumentar a ciclagem geoquímica de P. No presente trabalho, o Pi-resina e o Pi-NaHCO₃ no pasto 6 (pasto abandonado), porém, não foram maiores do que nos pastos degradados (Pastos 4 e 5) (Quadro 4). Neste caso, as frações mais lábeis de Pi não foram significativamente aumentadas, possivelmente, pelo fato de a maior parte do Po do solo do pasto 6 ter ocorrido na fração NaOH, menos sensível à ação das fosfatases, como observado por Oberson et al. (1999) e Taranto et al. (2000).

Quadro 4 – Valores dos contrastes médios relativos aos teores de P inorgânico (Pi) e orgânico (Po) das frações extraídas com resina de troca aniônica, NaHCO₃, NaOH e H₂SO₄ de solos com pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú com diferentes produtividades, coletados em Brasilândia de Minas.

	Resina	NaHCO ₃	NaOH	H ₂ SO ₄	Resina	NaHCO ₃	NaOH
Contraste	Pi-----				Po-----		
C1	- 11,25 **	- 3,22 **	- 9,99 **	- 163,7 **	- 2,53 *	- 2,86 °	- 1,06 ^{ns}
C2	- 1,94 **	- 0,34 ^{ns}	+ 0,55 ^{ns}	- 26,4 *	+ 0,47 ^{ns}	- 0,03 ^{ns}	- 1,73 ^{ns}
C3	- 0,36 ^{ns}	- 0,74 **	- 4,90 **	- 71,3 **	- 0,86 **	+ 1,41 **	- 0,78 ^{ns}
C4	+ 0,60 °	+ 0,22 ^{ns}	- 0,04 ^{ns}	- 3,1 ^{ns}	+ 0,73 *	+ 0,30 ^{ns}	+ 2,24 °
C5	+ 0,95 ^{ns}	- 0,32 ^{ns}	+ 0,07 ^{ns}	+ 11,5 ^{ns}	+ 0,77 ^{ns}	+ 1,90 **	+ 11,51 **

^{ns}, **, *, ° Não significativo e significativo a 1, 5 e 10 % pelo teste F.

C1 – -3 (Pasto 1 + Pasto 2) + 2 (Pasto 3 + Pasto 4 + Pasto 5)

C2 – -2 (Pasto 3) + (Pasto 4 + Pasto 5)

C3 – (-Pasto 1) + (Pasto 2)

C4 – (-Pasto 4) + (Pasto 5)

C5 – (- Pasto 4 - Pasto 5) + 2 (Pasto 6)

Em que 1 e 2 pasto produtivo, 3 pasto com degradação intermediária, 4 pasto degradado 5 pasto com degradação avançada e 6 pasto abandonado.

Como esperado, a hidrólise enzimática das frações mais lábeis de Po contribui com a produtividade dos pastos. Os maiores teores de Po-resina e Po-NaHCO₃ nos pastos mais produtivos (1 e 2) (Quadro 4) podem ser responsáveis pelos maiores teores de Pi-resina e Pi-NaHCO₃ ($p < 0,001$), indicando que uma maior ciclagen biogeoquímica de P pode contribuir para manutenção de maior teor de Pi lábil no solo. A hidrólise enzimática das frações mais lábeis de Po, seja mediada por fosfatases produzidas pelas plantas ou pela microbiota do solo, contribui, de fato, para o aumento dos teores das frações mais lábeis de Pi (Oehl et al., 2001; McCallister et al., 2002; Chen et al., 2003) e assim, de maneira expressiva, para a produção vegetal (Richardson et al., 2005). Assim, os maiores teores de Pi e Po lábeis nos pastos mais produtivos (pastos 1 e 2) contribuíram, possivelmente, para a sua sustentabilidade, retardando o início do processo de degradação.

Após quatro e oito meses de cultivo com gramíneas forrageiras de clima temperado, que receberam RNA como fonte de P (P-diéster), Taranto et al. (2000) observaram que o solo apresentava 30 e 40 mg kg⁻¹ de P-monoésteres após quatro e oito meses de cultivo, respectivamente, sendo estas as formas predominantes de Po. O predomínio de P-monoésteres nos solos tem sido evidenciado em diversas situações (Toor et al., 2003; Turner et al., 2003, Tuner et al., 2005). Estas observações sugerem que a manutenção da produtividade das pastagens com o tempo está relacionada à maior disponibilidade de Po, caracterizada pelas frações Po-resina e Po-NaHCO₃, do que com a menor recalcitrância das formas de Po destas frações, embora tenha sido mostrado que os microrganismos do solo utilizam mais eficientemente P-diésteres (menos recalcitrantes) como fonte de P, por também serem fonte de N (Pant & Reddy 2001). A importância dos P-monoésteres na nutrição de plantas é suportada pela sua predominância nas frações extraídas com resina, NaHCO₃ e NaOH. Além disso, no pasto abandonado (pasto 6) o maior teor de Po-NaOH (Quadro 3) não contribuiu para maior teor de P na forrageira, em relação aos pastos mais degradados (4 e 5) (Figura 1 A).

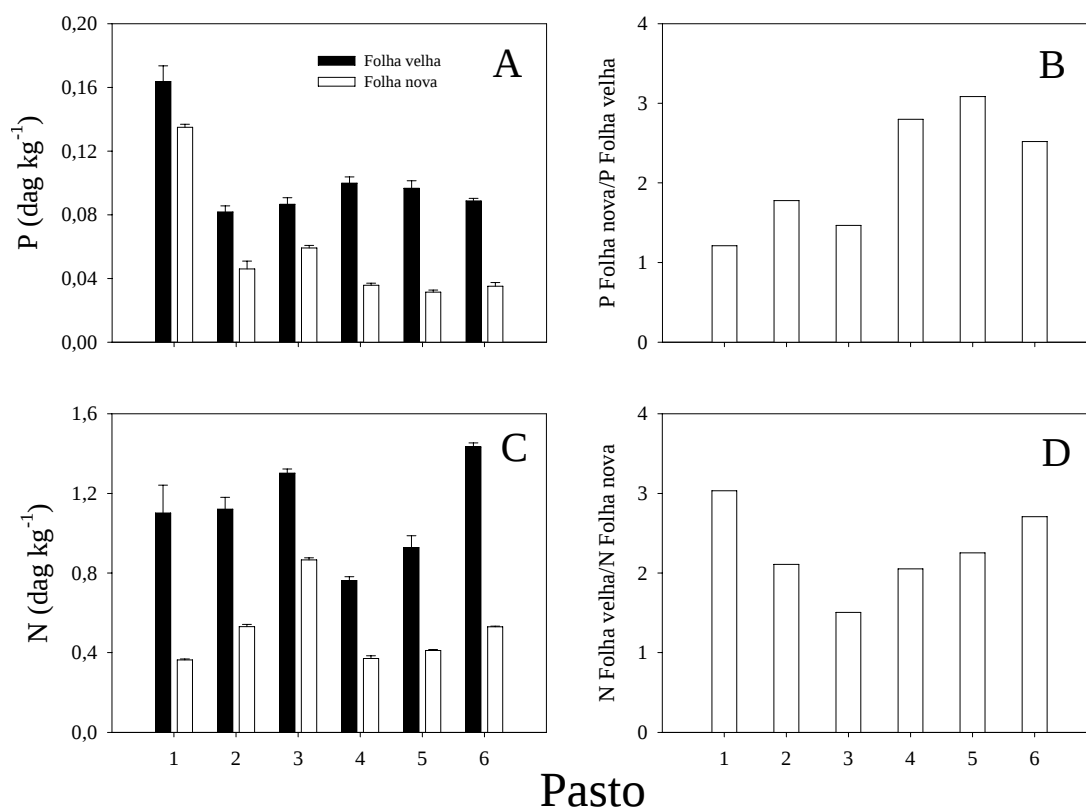


Figura 1. Teor de fósforo (A) e de nitrogênio (C) nas folhas novas e nas velhas (senescentes), e a relação dos teores nesses compartimentos (B, D) em plantas de *Brachiaria brizantha* cv Marandú coletadas em pastos produtivos (1 e 2), pasto com degradação intermediária (3), pasto degradado (4), pasto com degradação avançada (5) e pasto abandonado (6), em Brasilândia de Minas. Cada barra representa médias de quatro repetições com o respectivo erro padrão.

A importância de formas orgânicas para o suprimento de P para as plantas, principalmente para aquelas cultivadas em condições em que o P é limitante, como também foi observado por Richardson et al. (2005) parece ser comprovada neste trabalho. Desta forma, a utilização do Po como fonte de P na manutenção da produtividade das pastagens parece evidente, principalmente considerando-se a menor exigência das gramíneas forrageiras em relação a maioria das culturas. É pouco provável, no entanto, que o Po do solo tenha importância no cultivo de espécies anuais, devido a aplicação de doses elevadas de fertilizantes fosfatados (Novais & Smyth, 1999; Oberson et al., 2001).

A importância das frações mais lábeis de Pi e Po para a produtividade dos pastos foi comprovada por todos os contrastes (Quadro 4), exceto o contraste quatro, que confronta os pastos mais degradados. No pasto com avançado estágio de degradação

(pasto 5), os teores de Pi e Po-resina foram maiores do que no pasto degradado (pasto 4). Isso se explica, provavelmente, pelo fato de o solo do pasto quatro ter sido revolvido, pouco antes da coleta das amostras, favorecendo a exposição de formas orgânicas e inorgânicas de P a novos sítios de adsorção, refletindo em menores teores das frações mais lábeis no solo.

Constatou-se maior atividade da APase nas folhas e no caule (região do coleto) e da RNase nas folhas e nas raízes das plantas dos pastos produtivos (Pastos 1 e 2) ($p < 0,01$), do que dos pastos mais degradados (Pastos 4 e 5) (Figura 2). Isso indicaria maior remobilização de P na planta confirmando a hipótese proposta e, também, constatada em outros estudos (Bosse & Köck, 1998; Nanamori et al., 2004). Houve, no entanto, maior relação entre os teores de P nas folhas novas e velhas nos pastos mais degradados (Pastos 4 e 5) (Figura 1 B), sugerindo, também, maior remobilização de P nestas condições.

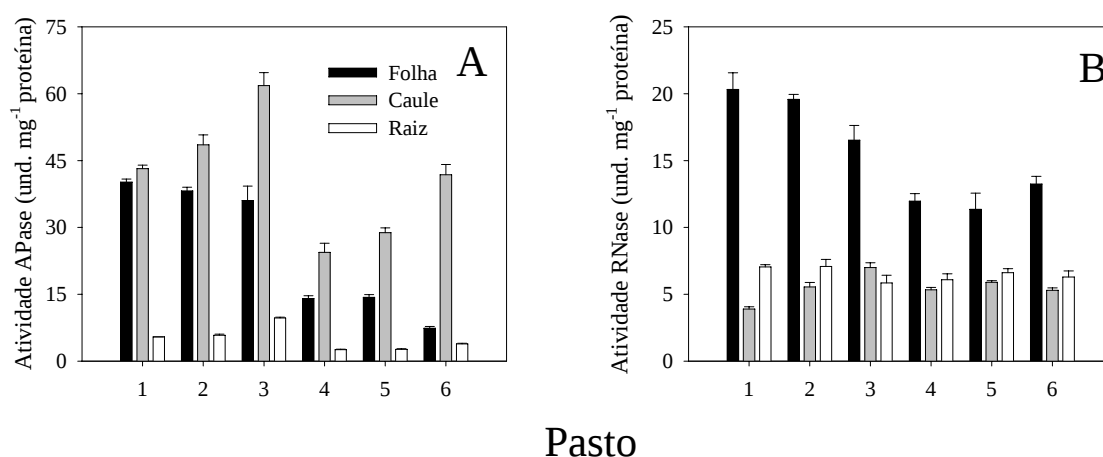


Figura 2. Atividade da APase (A) e da RNase (B) na folha, caule e raiz de *Brachiaria brizantha* cv Marandú coletadas em pastos produtivos (1 e 2), pasto com degradação intermediária (3), pasto degradado (4) pasto com degradação avançada (5) e pasto abandonado (6), em Brasilândia de Minas. Cada barra representa médias de quatro repetições com respectivo erro padrão

No presente trabalho foi constatada maior atividade de APase e de RNase nas plantas que apresentaram maiores teores foliares de P (Figuras 1A e 2). Isso contraria a expectativa de maiores atividades destas enzimas em condições limitantes de P (Baldwin et al., 2001; Li et al., 2004; Tomscha et al., 2004). A atividade destas fosfatases, principalmente, da APase, correlacionou, embora, não significativamente ($p > 0,1$) com teores de N nas folhas novas e velhas, sugerindo a importância deste nutriente para a síntese destas enzimas (Taiz & Zeiger, 2002).

Os maiores teores de Pi e Po das frações mais lábeis (P-resina e P-NaHCO₃) refletiram em maiores teores foliares de P e, também, de N nos pastos mais produtivos ($p < 0,01$) (Figura 1 A e 1 C). Isso ocorreu juntamente com maiores atividades de ambas as fosfatases, sugerindo que a maior produtividade dos pastos relaciona-se com uma maior eficiência de utilização de P. Além disso, os maiores teores foliares de P podem estar relacionados a uma maior eficiência na aquisição de P, em razão do maior crescimento radicular, do maior número de pelos radiculares (Vance et al 2003), da redução da relação parte aérea/raiz (Narang et al., 2000), da maior exsudação de ácidos orgânicos (Dong et al., 2004) ou da maior atividade de fosfatases na região rizosférica (Yun & Kaeppler, 2001). O maior teor de P na forrageira dos pastos mais produtivos, do que nos pastos mais degradados, indica a importância das frações mais lábeis de Pi e Po e da ciclagem biogeoquímica na manutenção da produtividade dos pastos

Conclusões

- Os resultados das análises químicas de rotina de solo não se relacionam com estado de degradação dos pastos.
- Os teores de Pi e Po extraídos pela resina e NaHCO_3 , caracterizando frações mais lábeis, relacionam-se significativamente com a produtividade dos pastos, sendo considerados, indicadores sensíveis do processo de degradação dos pastos.
- A atividade da APase e da RNase não se relaciona com os teores foliares de P ou com os teores de P das frações mais lábeis de Pi e Po no solo.
- Os pastos mais produtivos apresentam maior atividade da APase e RNase.

Capítulo 2 - Atividade de Fosfatases em Gramíneas Forrageiras como Variável da Disponibilidade de Fósforo no Solo e da Altura de Corte das Plantas

A eficiência de utilização de um nutriente, expressa pela relação entre a biomassa produzida e a quantidade absorvida, é uma importante característica adaptativa das plantas, particularmente para aquelas cultivadas em solos de baixa fertilidade. Uma maior eficiência de utilização de P (EUP) é conferida pela maior taxa de remobilização de P, que consiste na retranslocação deste nutriente para regiões de maior demanda metabólica na planta. Maiores taxas de remobilização têm sido associadas a maiores atividades das enzimas: fosfatase ácida (APase) e ribonuclease (RNase). Neste trabalho, avaliou-se a atividade destas enzimas em plantas de *Brachiaria decumbens*, pouco exigente, e de *Panicum maximum* cv Tanzânia mais exigente em P, cultivadas em solos que receberam diferentes doses deste nutriente e submetidas a diferentes alturas de corte. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, utilizando amostra do horizonte B de um Latossolo Vermelho-Amarelo argiloso. Os tratamentos resultaram da combinação fatorial entre as duas gramíneas, as doses de 100, 200 e 500 mg dm⁻³ de P e as três alturas de corte: sem corte e a 15 e 30 cm a partir da superfície do solo, para a *Brachiaria*, e sem corte e a 20 e 40 cm para o *Panicum*. As unidades experimentais consistiram de vasos com capacidade para 10 dm³ de solo, com 10 plantas. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre a produção de biomassa das duas gramíneas, mas a adição de P propiciou maior produção e maior teor desse nutriente na parte aérea de ambas. As plantas submetidas a cortes mais severos apresentaram menor produção e maiores teores de P na parte aérea. Ocorreu efeito negativo significativo das doses de P sobre a atividade da APase e da RNase nas duas forrageiras. As plantas cultivadas com a menor dose de P apresentaram as maiores atividades dessas enzimas e menor EUP. A atividade de ambas fosfatases decresceu com a idade das plantas. No tratamento com o corte mais intenso, independentemente da dose de P, tanto a *Brachiaria* quanto o *Panicum* apresentaram menor EUP. Isso ocorreu associado à maior atividade das enzimas APase e RNase, indicando que outros mecanismos relacionados com a adaptação das plantas a baixas disponibilidades de P, podem estar envolvidos.

Palavras-chave: fosfohidrolases, ciclagem interna, *Brachiaria decumbens*, *Panicum maximum*, eficiência de utilização, eficiência de aquisição

Chapter 2 –Phosphatases Activity in Forrage Grasses as Influenced by Soil Phosphorus Availability and Plant Cutting Height

The nutrient use efficiency, expressed by the ratio between the produced biomass and nutrient content, is an important adaptative characteristic of plants, particularly for those cultivated in low fertility soils. A high P-use efficiency (PUE) is conferred by large P remobilization rates, which consists of the transport of this nutrient for regions of greater metabolic demand in the plant. Higher P remobilization rates have been associated with high acid phosphatase (APase) and ribonuclease (RNase) enzyme activities. In the present work, we evaluated the activity of these enzymes in *Brachiaria decumbens* plants, which has small demand for P, and *Panicum maximum* cv Tanzânia, a species that has a high demand for P, cultivated in soil that had received different rates of this element and were submitted to different cutting heights. The experiment was carried out in a greenhouse, using samples of B horizon of a clayey Yellow Red Latosol. The treatments consisted of the factorial combination between the two grasses, three P rates (100, 200 and 500 mg dm⁻³) and the three cutting heights: without cutting and 15 and 30 cm above the soil surface for *Brachiaria*, and without cutting and 20 and 40 cm for the *Panicum*. The experimental units consisted of pots with 10 dm³ of soil, planted with 10 plants each. The results indicated that there was no significant difference between biomass production between two grasses, but the P addition led to greater biomass production and greater shoot concentration of this nutrient. The plants under smaller cutting height presented smaller biomass production and greater P concentrations in shoot. It was observed a significant effect of the P rates on the APase and the RNase activities in the two forrages. The plants grown with the smaller P rate presented the highest activities of these enzymes and smaller PUE. The activity of both fosfatases decreased with the aging of the plants. In the treatment with smaller cutting height, independently of the P rate, both the *Brachiaria* and the *Panicum* plants presented smaller PUE. This occurred associated to the biggest activity of APase and RNase enzymes, indicating that other mechanisms may be involved in the plant adaptation to the low P availability.

Key-words: phosfohydrolases, remobilization, *Brachiaria decumbens*, *Panicum maximum*, use efficiency, acquisition efficiency

Introdução

Embora o teor de P total nos solos tropicais seja relativamente alto, sua concentração na solução é baixa, geralmente menor que $2 \mu\text{mol L}^{-1}$, em razão da grande afinidade deste elemento com os oxi-hidróxidos de Fe e Al, principais constituintes da fração argila desses solos. A baixa disponibilidade de P é um dos fatores limitantes ao crescimento e desenvolvimento das plantas, dada a sua participação na estrutura de ácidos nucleicos, nucleotídeos, fosfolipídios, açúcares fosfatados, ésteres e outras biomoléculas, além de participar de reações importantes, como biossíntese de amido, fosforilação de proteínas e processos de transferência de energia.

A adaptação das plantas à baixa disponibilidade de P no solo é favorecida por mecanismos que aumentam a eficiência de sua aquisição e utilização. Estudos recentes sobre mecanismos de aquisição de P indicam que plantas cultivadas em condições de baixa disponibilidade deste elemento apresentaram maior síntese de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (Narang et al., 2000; Vance et al., 2003; Dong et al., 2004; Franco-Zorrilla et al., 2004). Shen et al. (2002) verificaram maior exsudação de citrato, fumarato e acetato por plantas de feijão, submetidas à deficiência de P. Esses autores constataram que a exsudação de ácidos orgânicos favoreceu a disponibilização e a aquisição de P por plantas cultivadas em areia enriquecida com P-Al e P-Fe.

O fluxo difusivo é o mecanismo de transporte predominante para o P no solo, sendo que este se relaciona positivamente com a superfície do sistema radicular. Assim, mudanças na arquitetura do sistema radicular decorrentes de maior comprimento, maior número de pelos radiculares e de associações micorrízicas (Vance et al., 2003) contribuem para maior aquisição de P. A maior relação entre a biomassa da raiz e da parte aérea é uma resposta da planta à baixa disponibilidade de P. Isto proporciona maior superfície de absorção em relação à biomassa total, favorecendo a aquisição do P (Narang et al., 2000; Gahoonia & Nielsen, 2003; Watt & Evans, 2003; Wissuwa, 2003).

Alterações bioquímicas nas plantas em resposta a limitações por baixa disponibilidade de P, tais como a indução da fosfatase ácida (APase) e da ribonuclease (RNase), também têm sido constatadas (Bosse & Köck, 1998; Yadav & Tarafdar, 2001; Yun & Kaeppler, 2001). As fosfatases estão associadas à remobilização de P nas plantas; assim, uma maior atividade dessas enzimas tem sido associada a baixos teores

celulares de Pi (Richardson et al., 2000; Baldwin, et al., 2001; Yan et al., 2001). Além disso, os teores de ATP e de ácidos nucleicos são significativamente reduzidos em plantas deficientes em P, como estratégia para manter elevado teor de Pi citoplasmático adequado à manutenção do metabolismo (Raghothama, 1999).

Em algumas espécies de plantas tem sido observado aumento na atividade de fosfatases nas raízes e sua exsudação em resposta a deficiência de P, evidenciando sua importância para a nutrição das plantas (Gaume et al., 2001; Chen et al., 2003; Richardson et al., 2005). Richardson et al. (2000) observaram que plantas de trigo cultivadas em meio nutritivo estéril foram capazes de utilizar P de fontes orgânicas, tais como: ácido fosfoglicérico, adenosina monofosfato, ácido ribonucleico e glucose 1-fosfato. Observaram, ainda, que a liberação de P dessas fontes orgânicas por fosfatases foi maior do que o requerimento de P das plantas. A elevada atividade extracelular de fosfatases em relação à atividade intracelular sugere que a membrana plasmática é permeável a elas (Yadav & Tarafdar, 2003), ou que existem transportadores específicos para estas enzimas (Raghothama, 1999). As fosfatases intracelulares geralmente são encontradas nos vacúolos e no citoplasma, enquanto que as fosfatases extracelulares são encontradas na parede celular e na superfície de células epidérmicas (Vance et al., 2003).

A elevada atividade das fosfatases nos tecidos vegetais tem sido utilizada como indicadora da deficiência de P nas plantas (Duff et al., 1994). Contrário ao esperado, Yan et al. (2001) observaram maior atividade da APase em um cultivar de feijão com menor eficiência de utilização de P (EUP), indicando que maior atividade desta enzima pode não estar relacionada com a adaptação das plantas a baixa disponibilidade de P. Outros autores (Bosse & Köck, 1998; Nanamori et al., 2004), no entanto, observaram correlação negativa entre a atividade das fosfatases com os teores foliares de P, o que possibilita associar sua maior atividade a condições de baixa disponibilidade de P. Desta forma, ainda há controvérsias a respeito do papel das fosfatases, sugerindo que elas podem servir como indicadoras da deficiência de P, ou que elas realmente desempenhem importante papel para maior EUP (Yan et al., 2001).

Bosse & Köck (1998) cultivaram plântulas de tomate em solução sem P e observaram que as atividades da APase e da RNase foram substancialmente reduzidas nas plântulas transferidas para a solução com P, comparadas àquelas que continuaram na sua ausência, indicando que há uma degradação ou desativação das fosfatases

quando o teor de P na planta retorna a níveis satisfatórios. Confirmando tal relação, Baldwin et al. (2001) verificaram que o gene *LePS2*, que controla a síntese de APase, expressou-se rapidamente em plantas de tomate e em células cultivadas em meio de cultura sem P, e sua repressão foi induzida pela presença de P. Isso indica que os teores de P na planta sinalizam o controle genético da síntese ou degradação (desativação) das fosfatases.

A EUP corresponde à capacidade das plantas de converter P em biomassa. Para aumentar a EUP, as plantas desenvolveram mecanismos que estão associados à redução do requerimento de P (Halsted & Lynch, 1996), conferida por uma remobilização mais eficiente, contribuindo, assim, para adaptação as condições nutricionais limitantes (Yan et al., 2001). Assim, é razoável assumir que as fosfatases estão envolvidas na remobilização de P dos tecidos velhos para os jovens. Estudando a ciclagem interna de P, Nanamori et al. (2004) observaram que plantas de arroz e, principalmente, de *Brachiaria* cultivadas em solução nutritiva sem P apresentaram maior atividade das enzimas APase e RNase do que plantas cultivadas em solução sem restrição no suprimento de P. Concluíram, ainda, que a atividade destas enzimas estava associada à remobilização de P nas plantas. Semelhantemente, Bosse & Köck (1998) já haviam observado que a elevada atividade de fosfatases na raiz, e não no meio de crescimento, estava associada à remobilização e não à aquisição de formas orgânicas de P. Desta forma, especula-se que a adaptação das forrageiras tropicais à baixa disponibilidade de P deve-se à elevada ciclagem interna deste elemento e, conseqüentemente, à maior atividade da APase e RNase na planta.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da disponibilidade de P no solo e de alturas de corte das plantas sobre a atividade da APase e da RNase em *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* cv. Tanzânia.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação utilizando-se amostra do horizonte B de um Latossolo Vermelho-Amarelo distroférico típico argiloso (67 % de argila), cuja análise química indicou: pH em água de 4,48 e teores de P e K pelo Mehlich-1 iguais a 0,4 e 8 mg dm⁻³, respectivamente, e saturação por bases de 4 %. As espécies forrageiras utilizadas foram a *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* cv Tanzânia, consideradas espécies de menor e maior requerimento em P, respectivamente.

Os tratamentos resultaram da combinação fatorial entre as duas espécies de gramíneas, as doses de 100, 200 e 500 mg dm⁻³ de P e três alturas de corte das forrageiras: sem corte e cortes a 15 e 30 cm de altura apartir da superfície do solo, para a *Brachiaria* e sem corte e cortes a 20 e 40 cm para o *Panicum*. As forrageiras foram mantidas nas respectivas alturas de corte por meio de podas a cada cinco dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As unidades experimentais consistiram de vasos com 10 dm³ de solo passado em peneira com 4 mm de malha, cultivados com 10 plantas. Sessenta dias antes do plantio solo de cada unidade experimental recebeu calagem para neutralizar o Al³⁺ e elevar os teores de Ca²⁺ + Mg²⁺ a 2 cmol_c dm⁻³, utilizando-se uma mistura de CaCO₃ e MgCO₃, na relação molar de 4:1. Após a aplicação do corretivo, a umidade do solo foi elevada a 80 % da capacidade de campo e mantida durante 30 dias por meio de irrigações com água deionizada. Ao final desse período o solo foi seco e passado novamente através de peneira de 4 mm. Em seguida, foram aplicadas as doses de P (KH₂PO₄), juntamente com doses de KCl suficientes para igualar as doses de K a 630 mg dm⁻³. Os fertilizantes foram homogeneizados com todo o volume de solo de cada unidade experimental e a umidade mantida em 80 % da capacidade de campo durante 30 dias. A análise de amostras do solo coletadas aos trinta dias após a aplicação das doses de P revelaram teores de 9,4, 31,3 e 329,0 mg dm⁻³. Ao fim desse período, efetuou-se o transplântio de plântulas crescidas em areia. Uma semana após, aplicaram-se 50 mL de uma solução que supriu 25 mg dm⁻³ de N ((NH₄)₂SO₄) e 4,0; 1,4; 1,6; 3,7; 0,95 e 0,15 mg dm⁻³ de Zn, Cu, Fe, Mn (sulfatos), B (H₃BO₃) e Mo (Na₂MoO₄), respectivamente. Até 60 dias após o transplântio foram aplicados, semanalmente, 25 mg dm⁻³ de N ((NH₄)₂SO₄).

Posteriormente, foram aplicadas seis doses semanais de 50 mg dm^{-3} de N (solução de NH_4NO_3).

Aos 60 dias após o transplântio, fez-se o primeiro corte das forragieras. Nessa ocasião, foram selecionados e identificados 10 perfilhos (um por planta) no mesmo estágio de desenvolvimento em cada vaso. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas mantidas sem corte. Nesse momento, foram removidas duas plantas e coletados os perfilhos selecionados. De cada perfilho obteve-se um segmento de 10 cm do centro da lâmina foliar, um segmento de dois centímetros da base do caule (coleto) e, aproximadamente, 0,5 g de raízes. Os materiais dos dois perfilhos foram devidamente lavados, reunidos em uma amostra composta e imediatamente congelados (-80°C) para posterior dosagem da atividade da APase e RNase. Posteriormente, seguindo este procedimento, duas plantas foram coletadas aos sete, 15, 30 e 45 dias. O material das plantas coletadas foi seco (70°C por 72 h), pesado e juntado ao material vegetal das podas para manutenção da altura, para posterior análise.

As enzimas RNase e APase foram extraídas macerando-se aproximadamente 0,5 g do material vegetal em um almofariz previamente resfriado, com 2 mL de acetato de sódio 100 mmol L^{-1} (pH 5,6). O extrato foi centrifugado a $17.000 g$ a 4°C , por 20 min, e o sobrenadante foi congelado a -80°C . No sobrenadante foi determinado o conteúdo de proteína total, tomando como padrão a albumina de soro bovino (Lowry et al., 1951).

A atividade da RNase foi determinada conforme método sugerido por Abel & Glund (1986). Para isso, a uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foram adicionados 50 μL de acetato de sódio 50 mmol L^{-1} (pH 5,6), contendo 250 μg de RNA como substrato, incubando-se por 10 min a 37°C . Em seguida adicionou-se 1,35 mL de uma solução com 500 mL L^{-1} de etanol, 48 mmol L^{-1} de acetato de sódio (pH 5,6), 12,5 mmol L^{-1} de acetato de magnésio, e 0,85 mmol de nitrato de lantânio para precipitar o RNA remanescente. O tempo de reação foi de 45 min a -20°C . A mistura foi centrifugada a $23.000 g$ por 5 min e mediu-se a absorbância do sobrenadante a 260 nm (Espectrofotômetro Smart Spec 3000, Bio Rad, Inc., USA). Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima no extrato que promoveu acréscimo de uma unidade na absorbância por minuto por centímetro (Wilson, 1975).

A atividade da APase foi determinada pela incubação de 500 μL do sobrenadante com 200 μL do substrato (2 mmol L^{-1} de p-nitrofenilfosfato disódio e 150

mmol L⁻¹ de acetato de sódio pH 5,6) por 5 min a 37 °C. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 300 µL de solução saturada de Na₂CO₃ e mediu-se a absorbância a 400 nm, que é proporcional à quantidade de p-nitrophenol hidrolizada. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima no extrato capaz de hidrolizar 1 mmol de p-nitrofenilfosfato por minuto (Ozawa et al., 1995). Os resultados para ambas as enzimas foram expressos em unidade enzimática por miligrama de proteína.

No material vegetal seco moído foram determinados os teores de N por meio da destilação Kjeldahl e os de P, após digestão nítrico-perclórica (4:1 v/v), por colorimetria (Muphy & Riley, 1962). A partir da massa e do teor de P foi estimado o conteúdo de P na biomassa vegetal, e calculou-se a EUP conforme Siddiqi & Glass (1981):

$$EUP = \text{massa de matéria seca}^2 / \text{conteúdo de P}$$

Os dados de massa de matéria seca, teores foliares de N e P, relação N/P, EUP e as quantidades de P e N absorvidas por vaso foram submetidos à análise de variância e teste de médias. A atividade da APase e da RNase foi interpretada por meio das estatísticas descritivas: média e erro padrão. O efeito das doses de P sobre as atividades das fosfatases foi avaliado utilizando-se o material vegetal coletado 60 dias após o transplântio (tempo zero).

Resultados e Discussão

Houve efeito positivo das maiores doses de P sobre a produção das forrageiras independentemente da altura de corte (Quadro 1). Os incrementos na produção de matéria seca entre a menor e maior dose de P foram, em média, de 120 e 64 % para a *Brachiaria* e o *Panicum*, respectivamente, porém a resposta do *Panicum* foi até a dose de 200 mg dm⁻³ de P, enquanto a da *Brachiaria* foi até a dose de 500 mg dm⁻³. As alturas de corte promoveram diferença significativa na produção de biomassa das duas forrageiras, sendo que no tratamento sem corte, de modo geral, a *Brachiaria* e o *Panicum* produziram 67 e 64 % mais biomassa do que as plantas submetidas à menor altura de corte. O *Panicum* apresentou, em média, produção maior do que a *Brachiaria*, exceto na maior dose de P (não significativo, $p > 0,05$). Com comportamento semelhante, a eficiência de utilização de P (EUP) do *Panicum* foi significativamente maior ($p < 0,001$), exceto na maior dose de P. A maior EUP para o *Panicum* não era esperada, pois tem sido indicado que as *Brachiarias* apresentam menor requerimento desse elemento e elevada EUP (Rao et al., 1995).

Nas plantas submetidas ao corte mais intenso, os teores de P foram maiores do que nas plantas que não foram cortadas ($p < 0,001$; Quadro 1). No caso dos tratamentos sem corte das plantas, os teores de P foram 1,51 vezes menor para *Brachiaria* e 1,84 para *Panicum*, que os teores das plantas submetidas ao corte mais severo. Isso pode estar relacionado com a significativa redução na EUP destas gramíneas com a intensificação do corte. Os maiores teores de P nas plantas sob menor altura de corte devem-se, em parte, à contribuição de tecidos mais jovens, ricos em P, coletados a cada poda e a possibilidade da remoção parcial da parte aérea promover uma menor relação parte aérea/raiz. Uma menor relação parte aérea/raiz tem sido apontada como mecanismo importante para maior eficiência de aquisição de P (Raghothama, 1999; Narang et al., 2000; Watt & Evans, 2003), dada à importância do tamanho do sistema radicular na aquisição deste elemento, que é de baixa mobilidade no solo (Barber, 1995; Novais & Smyth, 1999).

Quadro 1. Produção de biomassa (matéria seca - MS), teores de N e P, eficiência de utilização de P (EUP), relação entre os teores de N e P (N/P) na matéria seca e N e P absorvido e acumulado na parte aérea (Nab e Pab) por *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* de acordo com doses de P e as alturas de corte

Dose P	Altura de corte	MS	N	P	EUP	N/P	Nab	Pab
mg dm ⁻³	---cm---	---g/vaso---	-----dag kg ⁻¹ -----		---g ² mg ⁻¹ ---		-----mg/vaso-----	
<i>Brachiaria decumbens</i>								
100	0 ¹	128,53 Ac	1,67 Bb	0,147 Ca	87,6 Ab	11,37 Ba	2140 Ab	189 Abc
	30	78,15 Bc	2,77 Aa	0,196 Aab	39,9 Bc	14,18 Aa	2159 Ab	153 Ac
	15	69,25 Bc	2,67 Aa	0,176 Bb	39,5 Bc	15,20 Aa	1840 Ab	122 Bc
Média		91,98	2,37	0,173	55,7	13,58	2047	155
200	0	195,52 Aa	1,26 Bbc	0,108 Bb	184,6 Aa	11,68 Aa	2441 Aa	209 Ab
	30	151,36 ABb	1,79 Ab	0,166 Ab	92,8 Bb	10,85 Ab	2701 Aa	250 Ab
	15	122,32 Bb	1,95 Ab	0,176 Ab	69,8 Cc	11,07 Ab	2364 Ab	215 Ab
Média		156,40	1,67	0,150	115,7	11,20	2502	225
500	0	239,87 Aa	0,99 Bbc	0,135 Bab	179,4 Aa	7,44 Ac	2376 Ba	323 Ba
	30	182,77 Ba	1,64 Ab	0,219 Aa	83,5 Bb	7,48 Ac	2990 Aa	401 Aa
	15	183,25 Ba	1,78 Ab	0,235 Aa	79,0 Bbc	7,62 Ac	3255 Aa	431 Aa
Média		201,96	1,47	0,197	114,0	7,51	2874	385
<i>Panicum maximum</i> cv Tanzânia								
100	0	120,01 Ab	1,73 Ba	0,066 Bc	181,9 Aa	26,39 Aa	2072 ABa	79,4 Cc
	40	101,23 Ab	2,18 Aa	0,143 Ab	71,2 Bc	15,43 Ba	2204 Aa	144,7 Abc
	20	82,94 Bb	2,06 Aa	0,125 Ab	66,6 Bc	16,72 Ba	1715 Bb	104,8 Bc
Média		101,39	1,99	0,111	106,6	19,51	1997	109,7
200	0	199,76 Aa	1,15 Bb	0,078 Cc	255,9 Aa	14,70 Aa	2281 ABa	156,2 Ab
	40	166,96 Ba	1,54 Ab	0,119 Bb	143,0 Bab	13,02 Ab	2563 Aa	197,9 Ab
	20	122,62 Cb	1,69 Ab	0,167 Ab	73,6 Cbc	10,16 Bb	2066 Bab	205,6 Ab
Média		163,11	1,46	0,121	157,5	12,63	2303	186,6
500	0	207,01 Aa	1,00 Bb	0,200 Ca	103,3 Ab	5,01Ac	2069 Ca	415,4 Aa
	40	160,54 Ba	1,74 Ab	0,287 Ba	56,2 Bc	6,09 Ac	2792 Aa	459,7 Aa
	20	130,45 Ca	1,74 Ab	0,335 Aa	39,0 Cc	5,21 Ac	2273 Ba	436,6 Aa
Média		166,00	1,49	0,274	62,2	5,43	2378	437,2

¹ Plantas mantidas com crescimento contínuo, sem corte .

Para cada dose de P (efeito das alturas de corte), médias seguidas pela mesma letra maiúscula, e para cada corte (efeito das doses de P), médias seguidas pela mesma letra minúscula, não diferiram pelo teste de Tukey a 5%.

O teor de N na parte aérea (Quadro 1) foi, de modo geral, menor para a maior dose de P e para o corte menos agressivo ($p < 0,001$), o que se justifica pela diluição do N com a maior produção de biomassa. Contrário ao teor de N, observou-se maior quantidade de N absorvido para as maiores doses de P, sugerindo que quanto menor a limitação por P maior é a absorção de N.

Para as duas gramíneas, houve efeito negativo das doses de P sobre a atividade das enzimas APase e RNase (Figura 1). A atividade da APase foi, em média, 2,78 e 2,54 vezes maior nas plantas com a menor dose de P, para *Brachiaria* e *Panicum*, respectivamente (Figura 1). Para a atividade da RNase esta mesma relação foi de 2,82 e 2,74 vezes. A maior atividade destas enzimas tem sido associada a uma maior remobilização de P, conferindo às plantas uma maior EUP quando cultivadas em condições de limitada disponibilidade deste nutriente. No entanto, foi constatada maior atividade dessas fosfatases e menor EUP para a menor dose de P (Quadro 1). Segundo Nanamori et al. (2004), em condições de baixa disponibilidade de P, plantas de *Brachiaria* e arroz apresentaram maior atividade destas fosfohidrolases, que provavelmente estão associadas a maiores taxas de remobilização e utilização mais eficiente desse nutriente. Assim, em condições de deficiência, as plantas utilizam mecanismos que ativam a desfosforilação de compostos orgânicos, de forma que o Pi disponibilizado seja utilizado na manutenção do metabolismo celular de regiões meristemáticas (Raghothama, 1999; Nanamori et al., 2004). A maior atividade de fosfatases como resposta adaptativa à baixa disponibilidade de P tem sido observada, também, para outras espécies de plantas (Ozawa et al., 1995; Bosse & Köck, 1998; Yun & Kaeppler, 2001).

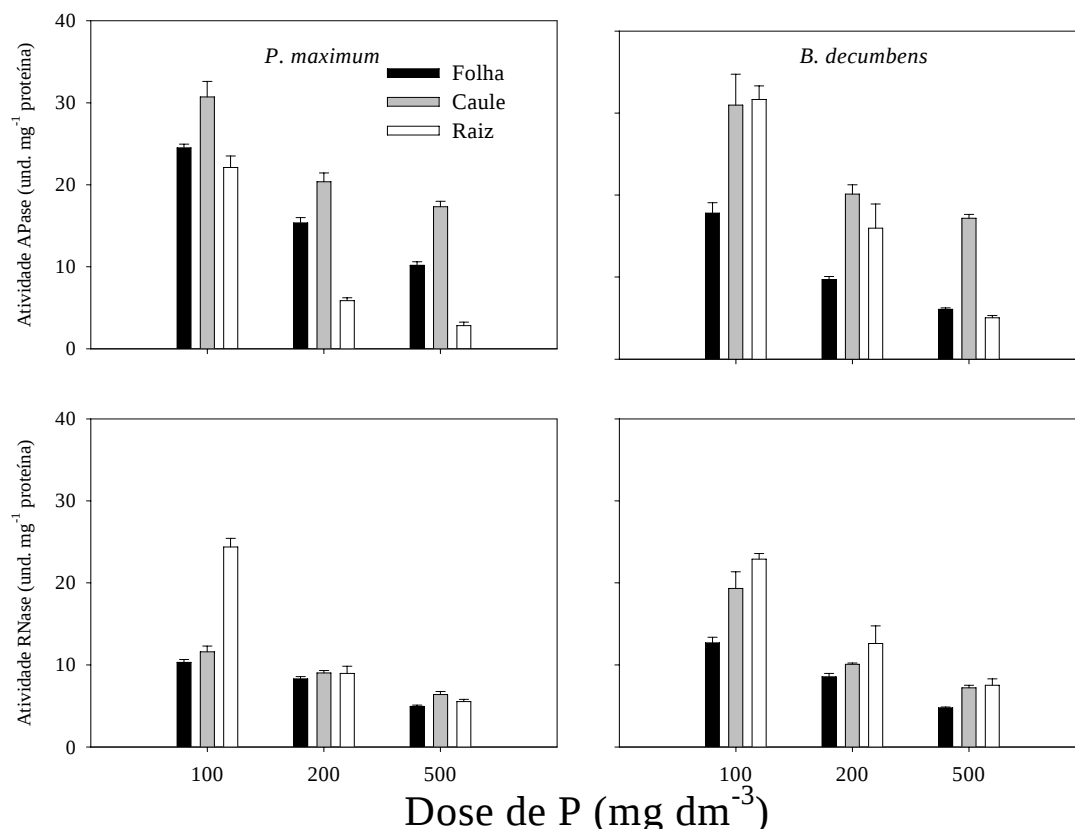


Figura 1. Atividade de fosfatase ácida (APase) e ribonuclease (RNase) na folha, caule e raiz de plantas de *Panicum maximum* e *Brachiaria decumbens* coletadas aos 60 dias após o transplante, de acordo com as doses de 100, 200 e 500 mg dm⁻³ de P. As linhas sobre as barras correspondem ao erro padrão.

A biomassa da *Brachiaria* apresentou maior teor e conteúdo de P na menor dose desse elemento (Quadro 1), sugerindo que maior eficiência de aquisição de P, quando esse nutriente se encontra em baixa disponibilidade no solo. Isso é suportado pela maior atividade da APase na raiz da *Brachiaria* cultivada com a menor dose de P (Figura 1). A maior atividade das fosfatases nas raízes das plantas juntamente com a sua exsudação para a rizosfera têm sido apontadas com importantes estratégias de aquisição de P (Raghothama, 1999; Gaume et al., 2001; Vance et al., 2003). Chen et al. (2003) cultivaram *Pinus radiata* em solos com diferentes teores de Po, e verificaram que seu maior crescimento estava associado à maior capacidade em utilizar formas de Po, devido à maior síntese de fosfatases, principalmente em solos com baixo teor de P disponível.

A expressão das atividades da APase e da RNase com base no peso de matéria fresca (dados não-mostrados) ou nos teores de proteína apresentaram a mesma tendência. Quando expressa com base na matéria fresca, no entanto, as atividades destas

enzimas nas raízes apresentaram além de baixos valores pouca variação, dificultando a percepção dos efeitos das doses de P. A atividade expressa com base no teor de proteína pareceu, portanto, mais adequada, concordando com Yun & Kaeppler (2001), que sugerem, preferencialmente, essa forma de expressão.

A atividade da APase e principalmente da RNase nas folhas da *Brachiaria* e do *Panicum* decresceu com a idade das plantas (Figura 2), ratificando a tendência observada por Bosse & Köck (1998). Esse comportamento relaciona-se, possivelmente, com a redução da demanda de P com a idade das plantas. Santos et al. (2002), trabalhando com essas mesmas espécies forrageiras, observaram que os níveis críticos de P, tanto na parte aérea da planta, quanto no solo, reduziram exponencialmente com a idade das plantas. A maior variação na atividade da RNase com o tempo sugere que ela foi mais sensível do que a APase às mudanças na demanda das gramíneas por P.

A maior EUP verificada para o *Panicum* pode estar relacionada com a maior atividade da APase na folha, no caule e na raiz (Figuras 1 e 2 A e B). A maior atividade da APase nas folhas do *Panicum* (Figura 2 A), que provavelmente contribuiu para maior EUP pode estar indicando que a aquisição de P não foi tão eficiente quanto na *Brachiaria*, quando houve menor disponibilidade de P no solo. Isso é suportado pela menor atividade da APase nas folhas da *Brachiaria* quando cultivada com menor disponibilidade de P (Figura 2 B). Desta forma, a menor EUP apresentada pela *Brachiaria* no tratamento com a menor dose de P foi devida à sua maior eficiência de aquisição de P do que à sua remobilização, visto que esta apresentou maior P absorvido. Segundo Bosse & Köck (1998), maiores atividades destas fosfatases em plantas de tomate relacionaram-se com maior remobilização de P e maior EUP. A maior atividade da APase, associada a uma remobilização de P mais elevada, também foi constatada por Duff et al. (1994).

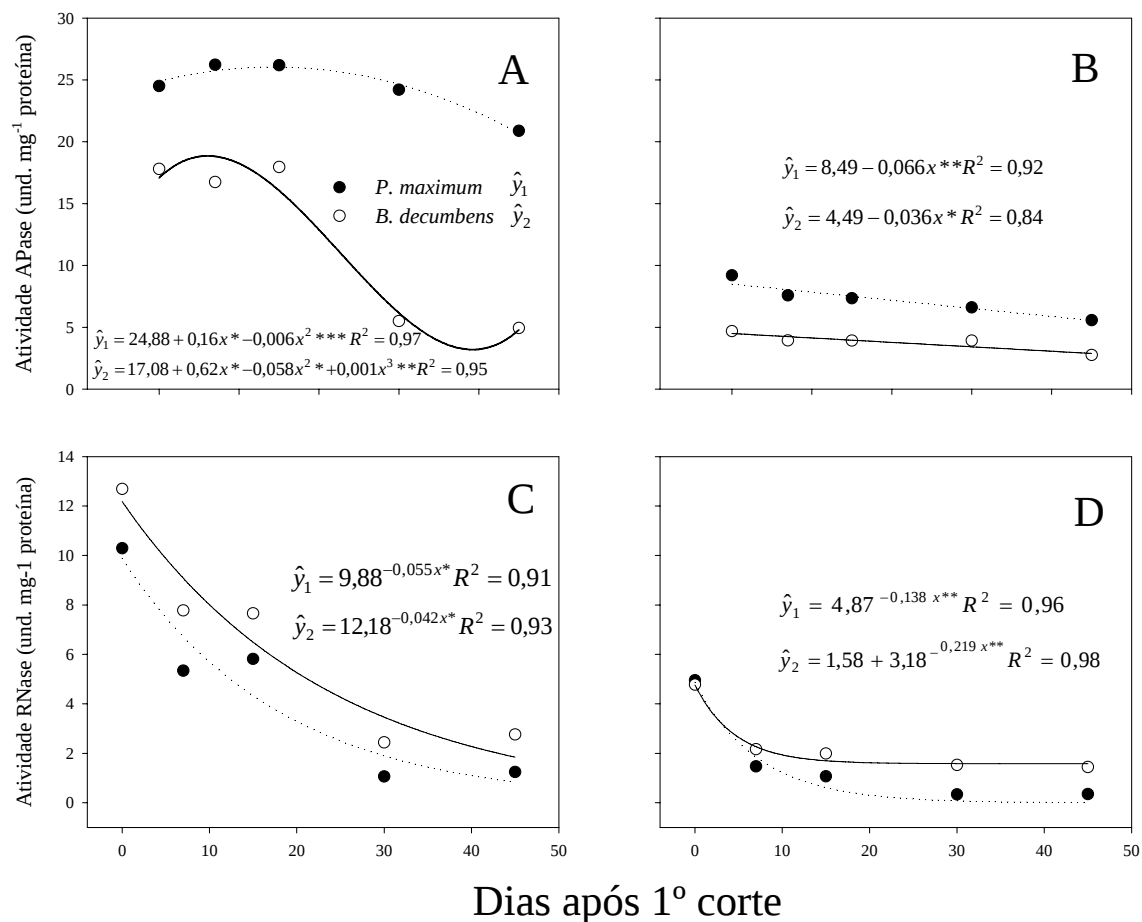


Figura 2. Atividade da fosfatase ácida - APase (A, B) e da Ribonuclease – RNase (C, D) na folha de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum* para as doses de 100 (A, C) e 500 mg dm⁻³ (B, D) por ocasião do primeiro corte (tempo zero), e até 45 dias após.

***, **, * significativo a 0,1, 1 e 5 % pelo teste f.

Independente da altura de corte houve menor atividade da APase e RNase no caule e na raiz das duas gramíneas nas maiores doses de P (Figuras 3 e 4). Houve, com o tempo, redução na atividade dessas fosfatases nas folhas, caule e raízes, em todas as doses de P (Figuras 2, 3 e 4), possivelmente, por causa da redução na demanda de P com avanço da idade das plantas. Até o décimo quinto dia a partir do início dos cortes, houve acentuada redução na atividade de ambas fosfatases nas plantas submetidas à menor altura de corte (Figuras 3 e 4). Isto se deve, possivelmente, aos maiores teores de P na parte aérea dessas plantas (Quadro 1).

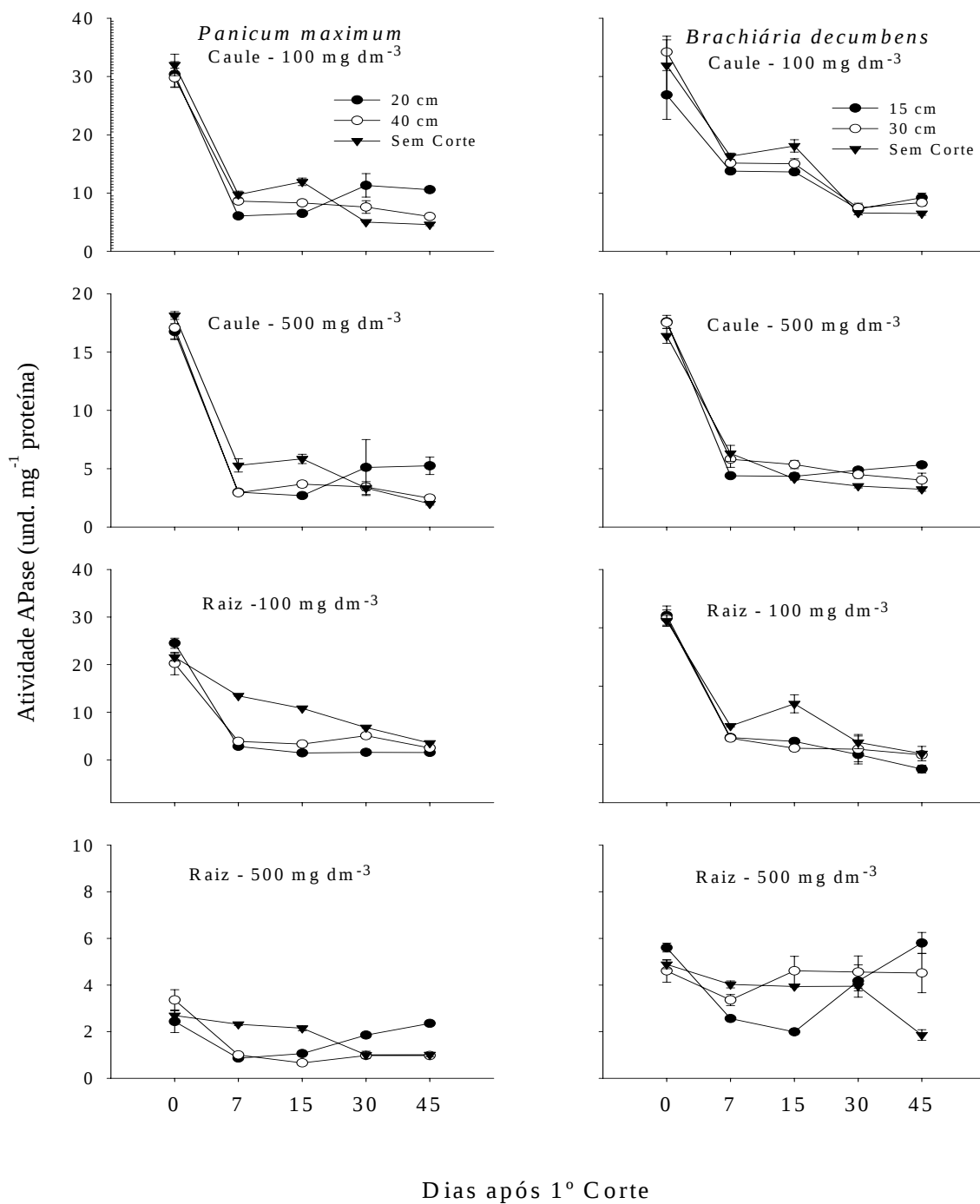


Figura 3. Atividade da fosfatase ácida (APase) no caule e raiz das forrageiras *Panicum maximum* e *Brachiaria decumbens* fertilizadas com 100 e 500 mg dm⁻³ de P e mantidas sem corte e com duas alturas de corte, em amostras coletadas aos 60 dias após o transplântio das plântulas, quando se realizou o 1º corte (tempo zero) e depois aos, sete, 15, 30 e 45 dias. As linhas verticais representam os erros padrão.

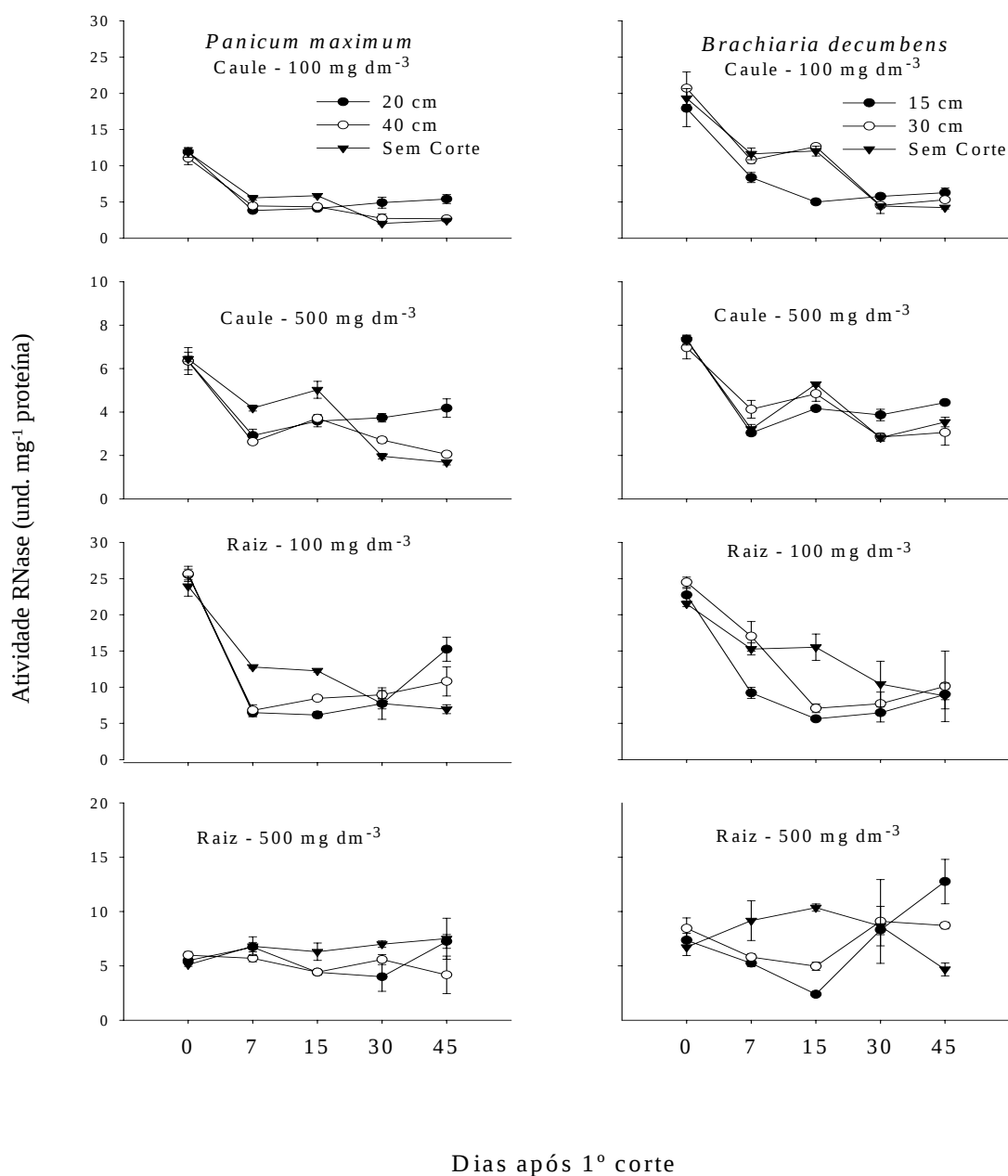


Figura 4. Figura 3. Atividade da ribonuclease (RNase) no caule e raiz das forrageiras *Panicum maximum* e *Brachiaria decumbens* fertilizadas com 100 e 500 mg dm⁻³ de P e mantidas sem corte e com duas alturas de corte, em amostras coletadas aos 60 dias após o transplântio das plântulas, quando se realizou o 1º corte (tempo zero) e depois aos, sete, 15, 30 e 45 dias. As linhas verticais representam os erros padrão.

Observou-se que nas plantas sem corte, a atividade da APase e da RNase decresceu até os 45 dias, acompanhando, possivelmente, a redução na demanda por P com a idade da planta. Por outro lado, nas plantas submetidas à menor altura de corte constatou-se a tendência de elevação na atividade de ambas as fosfatases a partir dos 30 dias após o início dos cortes. Isso sugere aumento na remobilização de P nas plantas com o estresse causado pelos cortes, mesmo tendo apresentado maior capacidade de aquisição de P, conforme já discutido. Essa maior remobilização de P, no entanto, não contribuiu para maior EUP, possivelmente em razão da menor relação parte aérea/raiz para as plantas que foram submetidas à menor altura de corte, o que teria contribuído para os maiores teores de P na biomassa da parte aérea nas duas forrageiras.

As plantas submetidas ao corte mais intenso apresentaram menor eficiência de utilização de P, mesmo havendo maior atividade de fosfatases, o que sugere maior remobilização. Adicionalmente, há indícios de que genótipos tolerantes a baixa disponibilidade de P apresentam uma maior atividade de APases nos seus tecidos (Gaume et al 2001). Visto isso, investigações adicionais sobre o papel destas enzimas no metabolismo vegetal merecem maior atenção, pois algumas observações indicam que a atividade destas enzimas pode não conferir às plantas uma maior tolerância a condições limitantes de P (Yan et al., 2001). Sugere-se que outros mecanismos de adaptação a condições limitantes de P podem estar envolvidos como, por exemplo, maior exsudação de ácidos orgânicos e fosfatases, e maior crescimento do sistema radicular.

Conclusões

- As maiores doses de P promovem maiores produções de biomassa e maiores teores deste nutriente nas plantas, sendo a *Brachiaria decumbens* mais responsiva ao P do que o *Panicum maximum* cv. Tanzânia.
- Plantas submetidas a cortes mais intensos apresentam menor produção de biomassa e maiores teores de P na parte aérea.
- As plantas cultivadas com baixa disponibilidade de P apresentam menor eficiência de utilização de P e maior atividade da APase e da RNase na folha, no caule e na raiz.
- A atividade das fosfatases decresce com a idade das forrageiras.
- Com menor altura de corte, tanto a *Brachiaria decumbens* quanto o *Panicum maximum* cv. Tanzânia apresentam menor eficiência de utilização de P, mesmo apresentando elevação nas atividades da APase e RNase 30 dias após o início dos cortes.

Referências Bibliográficas

- ABEL, S. & GLUND, K. Localization of RNA-degrading enzyme activity within vacuoles of tomato cells. *Physiol. Plant.*, 66:79-86, 1986.
- ARAÚJO, M. S. B.; SALCEDO, I. H. & SAMPAIO, E. V. S. B. Efeito de fertilizações fosfatadas anuais em solos cultivados com cana-de-açúcar: I. Intensidade e formas de acumulação. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 17:397-403, 1993.
- BALDWIN, J. C.; KARTHIKEYAN, A. S. & RAGHOTHAMA, G. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol.*, 125:728-737, 2001.
- BARBER, S. A. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. 2.ed. New York, Jon Wiley, 1995.
- BOSSE, D. & KÖCK, M. Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell Environ.*, 21:325-332, 1998.
- BUEHLER, S. A.; OBERSON, A.; RAO, I. M.; FRIESEN, D. K. & FROSSARD, E. Sequential phosphorus extraction of a ³³P-labeled Oxisol under contrasting agricultural systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 66:868-877, 2002.
- CABRERA, M. L. & BEARE, M. H. Alkaline persulfate oxidation for determining total nitrogen in microbial biomass extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 37:1007-1012, 1993.
- CARREIRA, J. A.; GARCIA-RUIZ, R.; LIÉTOR, J. & HARRISON, A. F. Changes in soil phosphatase activity and P transformation rates induced by application of N- and S-containing acid-mist to a forest canopy. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1857-1865, 2000.
- CHEN, C. R.; CONDRON, L. M.; SINAJ, S.; DAVIS, M. R.; SHERLOCK, R. R. & FROSSARD, E. Effects of plant species on phosphorus availability in a range of grassland soils. *Plant Soil*, 256:115-130, 2003.
- CORREA, J. C. & REICHARDT, K. Efeito do tempo de uso das pastagens sobre as propriedades de um Latossolo Amarelo da Amazônia central. *Pesq. Agropec. Bras.*, 30:107-114, 1995.
- DEFELIPO, B. V. & RIBEIRO, A. C. Análise Química do solo. 2ª ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1997. 26p.
- DIAS FILHO, M. B.; SERRÃO, E. A. S. Limitações de fertilidade do solo na recuperação de pastagem degradada de capim colônia (*Panicum maximum*) em Paragominas, Amazônia oriental. Belém. EMBRAPA / CPATU. 19p., 1987, (Boletim de Pesquisa 87)
- DONG, D.; PENG, X. & YAN, X. Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminum toxicity in two contrasting soybean genotypes. *Physiol. Plant.*, 122:190-199, 2004.
- DUFF SMG, SARATH G. & PLAXTON W. C. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol. Plant.*, 90: 791-800, 1994.

- FRANCO-ZORRILLA, J. M.; GONZÁLES, E.; BUSTOS, R.; LINHARES, F.; LEYVA, A. & ARES, J. P. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.*, 55:285-293.
- GAHOONIA, T. S. & NIELSEN, N. E. Phosphorus (P) uptake and growth of a root hairless barley mutant (bald root barley, brb) and wild type in low and high-P soils. *Plant Cell Environ.*, 26:1759-1766, 2003.
- GARCIA-MONTIEL, D. G.; NEILL, C.; MELILO, J.; THOMAS, S.; STEUDLER, P. A. & CERRI, C. C. Soil phosphorus transformations following forest clearing for pasture in the Brazilian Amazon. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64:1792-1804, 2000.
- GAUME, A.; MÄCHLER, F.; DE LEON, C.; NARRO, L. & FROSSARD, E. Low P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. *Plant Soil*, 228:253-264, 2001.
- HALSTED, M. & LYNCH, J. P. Phosphorus responses of C3 and C4 species. *J. Exp. Bot.*, 47:497-505, 1996.
- HEDLEY, M. J.; STEWART, J.W.B. & CHAUHAN, B.S. Changes in inorganic and organic soil P fraction induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46:970-976, 1982.
- HAYES, J. E.; RICHARDSON, A. E. & SIMPSON, R. J. Phytase and acid phosphatase activities in extracts from roots of temperate pasture grass and legume species. *Australian J. Plant Physiol.*, 26:801-809, 1999.
- LI, L.; TANG, C.; RENGEL, Z. & ZHANG, F. Chickpea facilitates phosphorus uptake by intercropped wheat from an organic source. *Plant Soil*, 248:297-303, 2003.
- LI, S. M.; LI, L.; ZHANG, F. S. & TANG, C. Acid phosphatase role chickpea/maize intercropping. *Ann. Bot.*, 94:297-303, 2004.
- LINDSAY, W. L. Chemical equilibria in soil. New York, Jon Wiley & Sons, 1979. 449p.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 2.ed. New York, Academic Press, 1995. 874p.
- McCALLISTER, D. L.; BAHADIR, M. A. & BLUMENTHAL, J. M. Phosphorus partitioning and phosphatase activity in semi-arid region soils under increasing crop growth intensity. *Soil Sci.*, 167:616-624, 2002.
- MURPHY, J. & RILEY, J. P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27:31-36, 1962.
- NANAMORI, M.; SHIMANO, T.; WASAKI, J.; YAMAMURA, T.; RAO, I. M. & OSAKI, M. Low phosphorus tolerance mechanisms: phosphorus recycling and photosynthate partitioning in tropical forage grass, *Brachiaria* hybrid cultivar mulato compared with rice. *Plant Cell Physiol.*, 45:460-469, 2004.
- NARANG, R. A.; BRUENE, A. & ALTMANN, T. Analysis of phosphate acquisition efficiency in different arabidopsis accessions. *Plant Physiol.*, 124:1786-1799, 2000.

- NOVAIS, R.F. & SMYTH, T.J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399p.
- NZIGUHEBA, G. & BÜNEMANN E. K. Organic phosphorus dynamics in tropical agroecosystems. In: TURNER, B. L.; FROSSARD, E. & BALDWIN, D. S. eds., Organic phosphorus in the environment. CAB International, Wallingford, 2005, p. 243-268.
- OBERSON, A.; FRIESEN, D. K.; RAO, I. M.; BUHLER, S. & FROSSARD, E. Phosphorus transformation in an Oxisol under contrasting land-use systems: The role of the soil microbial biomass. *Plant Soil*, 237:197-210, 2001.
- OBERSON, A.; FRIESEN, D. K.; TIESSEN, H.; MOREL, C. & STAHEL, W. Phosphorus status and cycling in native savanna and improved pastures on an acid low-P Colombian Oxisol. *Nutrient Cycling Agroec.*, 55:77-88, 1999.
- OEHL, F.; OBERSON, A.; SINAJ, S.; & FROSSARD, E. Organic phosphorus mineralization studies using isotopic dilution techniques. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65:780-787, 2001.
- OZAWA, K.; OSAKI, M.; MATISUI, H.; HONMA, M. & TADANO, T. Purification and properties of acid phosphatase secreted from lupin roots under phosphorus-deficiency conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 41:461-469, 1995.
- PANT, H. K. & REDDY, K. R. Hydrologic influence on stability of organic phosphorus in wetland detritus. *J. Environ. Qual.* 30:688-674, 2001.
- POTTER, R. L.; JORDAN, C. F.; GUEDES, R. M.; & HAN, X. G. Assessment of a P fraction method for soil: problems for further investigation. *Agricult. Ecos. Envir.*, 34:453-463, 1991.
- RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50:665-693, 1999.
- RAO, I. M.; AYARZA, M. A. & GARCIA, R. Adaptive attributes of tropical forage species to acids soils. I. Differences in plant growth, nutrient acquisition and nutrient utilization among C4 grasses and C3 legumes. *J. Plant Nutr.*, 18:2135-2155, 1995.
- RICHARDSON, A. E.; GEORGE, T. S.; HENS, M. & SIMPSON, R. J. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: TURNER, B. L.; FROSSARD, E. & BALDWIN, D. S. (eds), Organic phosphorus in the environment. CAB International, Wallingford, 2005, p. 165-184.
- RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A. & HAYES, J. E. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant Cell Environ.*, 23:397-405, 2000.
- 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 Soil*, 229:47-56, 2001.
- RUIZ, H. A. Incremento da exatidão da análise granulométrica do solo por meio da coleta da suspensão. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:297-300, 2005.
- SALAS, A. M.; ELLIOTT, E.T.; WESTFALL, D. G.; COLE, C. V. & SIX, J. The role of particulate organic matter in phosphorus cycling. *Soil Sci. Am. J.*, 67:181-189, 2003.

- SANTOS, H. Q.; FONSECA, D. M.; CANTARUTTI, R. B.; ALVAREZ V., V. H. & NASCIMENTO JÚNIOR, D. Níveis críticos de fósforo no solo e na planta para gramíneas forrageiras tropicais em diferentes idades. R. Bras. Ci. Solo, 26:173-182, 2002.
- SARAIVA, O. F.; CARVALHO, M. M. & OLIVEIRA, F. T. T. Nutrientes limitantes ao crescimento de capim-gordura em Latossolo Vermelho Amarelo álico. Pesq. Agropec. Bras., 28:963-968, 1993.
- SHEN, H.; YAN, X.; ZHAO, M.; ZHENG, S. & WANG, X. Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum and iron-bond phosphates. Environ. Exp. Bot., 48:1-9, 2002.
- SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. J. Plant Nutr., 4:289-302, 1981.
- TAIZ, L. & ZEIGER E. Plant Physiology. 3.ed. Massachusetts, Sinauer Associates, 2002. 690p.
- TARANTO, M. T.; ADAMS, M. A. & POLGLASE, P. J. Sequential fractionation and characterization (³¹P-NMR) of phosphorus-amended in *Banksia intergrifolia* (L.F.) woodland and adjacent pasture. Soil Biol. Biochem., 32:169-177, 2000.
- TATE, K. R. & NEWMAN, R. H. Phosphorus fractions of a climosequence of soils in New Zealand tussock grassland. Soil Biol. Biochem., 14:191-196, 1982.
- TIESSEN, H.; STEWART, J. W. B. & COLE, C. V. Pathways of P transformation in soils of differing pedogenesis. Soil Sci. Soc. Am. J., 48:854-858, 1984.
- TOMSCHA, J. L.; TRULL, M. C.; DEIKMAN, J.; LYNCH, J. P. & GUILTINAN, M. J. Phosphatase under-producer mutants have altered phosphorus relations. Plant Physiol. 135:334-345, 2004.
- TOOR, G. S.; CONDRON, L. M.; DI, H. J.; CAMERON, K. C.; & CADE-MENUN, B. J. Characterization of organic phosphorus in leachate from a grassland soil. Soil Biol. Biochem., 35:1317-1323, 2003.
- TURNER, B. L.; CADE-MENUN, B. J. & WESTERMANN, D. T. Organic phosphorus composition in semi-arid arable soils of the Western United States. Soil Sci. Soc. Am. J., 67:1168-1179, 2003.
- TUNER, B. L. & HAYGARTH, P. M. Phosphatase activity in temperate pastures soils: Potential regulation of organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. Sci. Total Environ., 344:27-36, 2005.
- TUNER, B. L.; MAHIEU, N.; CONDRON, L. M. & CHEN, C. R. Quantification and bioavailability of scyllo-inositol hexakisphosphate in pasture soils. Soil Biol. Biochem. 37:1-4, 2005.
- VANCE, C. P; UHDE-STONE, C. & ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytologist, 157:423-447, 2003.
- 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 Soil, 248:271-283, 2003.

- WILSON, C. M. Plant nucleases. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26:187-208, 1975.
- WISSUWA, M. How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency: Small causes with big effects. *Plant Physiol.*, 133:1947-1958, 2003.
- YADAV, R. S. & TARAFDAR, J. C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. *Soil Biol. Biochem.*, 35:1-7, 2003
- YADAV, R. S. & TARAFDAR, J. C. Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants. *Biol. Fertil. Soils*, 34:140-143, 2001.
- 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 Physiol.*, 125:1901-1911, 2001.
- YUN, S. J.; & KAEPPLE, S. M. Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant Soil*, 237:109-115, 2001.

Conclusões Gerais

As análises químicas de solo usuais para avaliação da fertilidade do solo não são eficazes para o diagnóstico precoce do processo de degradação dos pastos. Os teores de P das frações orgânicas mais lábeis, extraídas com resina de troca aniônica e NaHCO_3 , relacionam-se positivamente com a produtividade dos pastos. As forrageiras cultivadas em baixa disponibilidade de P e com o corte mais intenso, apresentaram maiores atividades da fosfatase ácida e da ribonuclease. Alterações nos teores de P das frações orgânicas mais lábeis e na atividade das fosfatases na forrageira podem ser indicadores precoces do processo de degradação dos pastos.

Apêndice

Quadro 1 - Soma do teor de fósforo das frações inorgânicas (Pi-resina + Pi-NaHCO₃ + Pi-NaOH + Pi-H₂SO₄) e orgânicas (Po-resina + Po-NaHCO₃ + Po-NaOH), teor de fósforo total e porcentagem de Po e Pi em relação ao P total de solos com pastos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandú, em Brasilândia de Minas.

Pasto ¹	ΣPi	ΣPo	P total ²	% Po	% Pi
	-----mg kg ⁻¹ -----				
1	86,99 (5,69)	18,15 (0,90)	183,8 (3,04)	9,9 (0,44)	47,3 (2,68)
2	19,55 (0,67)	18,60 (1,08)	101,6 (1,77)	18,3 (1,29)	19,2 (0,35)
3	33,64 (1,72)	16,54 (0,26)	132,1 (3,19)	12,5 (0,39)	25,5 (0,75)
4	22,45 (0,72)	15,71 (0,67)	119,3 (0,52)	13,2 (0,61)	18,8 (0,62)
5	21,64 (1,29)	18,54 (1,01)	128,8 (2,55)	14,3 (0,73)	16,8 (0,99)
6	27,30 (2,18)	22,99 (1,09)	151,3 (0,84)	15,2 (0,69)	18,0 (1,71)

¹ 1 e 2 pasto produtivo, 3 pasto com degradação intermediária, 4 pasto degradado 5 pasto com degradação avançada e 6 pasto abandonado. ² fósforo total determinado pela digestão nítrico-perclórica das amostras de solo. São apresentadas médias de quatro repetições com os respectivos erros padrão entre parênteses.

Quadro 2 - Valores dos contrastes relativos a atividade da ribonuclease e da fosfatase ácida na folha, caule e raiz, teores de N e P nas folhas novas e nas folhas velhas e relação dos teores de N e P nas folhas novas e velhas, no material vegetal coletado nos pastos de *Brachiaria brizantha* cv marandú com diferentes produtividades, em Brasilândia de Minas.

	-----Ribonuclease-----			-----Fosfatase ácida-----			-----Folha Nova-----		-----Folha Velha-----		Folha Nova/Folha Velha	
	Folha	Caule	Raiz	Folha	Caule	Raiz	N	P	N	P	N	P
	Valor do Contraste											
C1	- 16,0 *	- 8,12 **	- 5,3 °	- 26,4 **	- 15,0 °	+ 2,0 ^{ns}	- 0,68 °	- 0,170 **	+ 0,61 **	- 0,291 **	- 3,9 *	+ 5,4 **
C2	- 9,7 ^{ns}	- 2,76 **	+ 1,0 ^{ns}	- 63,7 **	- 60,4 **	- 14,2 **	- 0,92 **	+ 0,023 ^{ns}	- 0,95 **	- 0,051 *	+ 1,3 *	+ 3,0 **
C3	+ 7,2 **	+ 1,65 **	+ 0,1 ^{ns}	+ 18,0 **	+ 25,3 **	+ 2,4 **	+0,02 ^{ns}	- 0,082 **	- 0,27 **	- 0,098 **	- 0,9 °	+0,7 **
C4	- 0,6 ^{ns}	+ 0,56 ^{ns}	- + 0,5 ^{ns}	+ 0,3 ^{ns}	+ 14,4 *	- 0,1 ^{ns}	+ 0,17 °	- 0,003 ^{ns}	- 0,04 °	- 0,004 ^{ns}	+ 0,2 ^{ns}	+ 0,3 ^{ns}
C5	- 11,2 **	+ 0,63 ^{ns}	- 5,9 **	+ 13,6 *	- 20,4 °	- 2,5 *	- 1,18 **	+ 0,019 ^{ns}	- 0,88 **	- 0,003 ^{ns}	- 1,1 °	+ 0,7 ^{ns}

^{ns}, **, *, ° Não significativo e significativo a 1, 5 e 10 % pelo teste F.

CV – Coeficiente de variação (%)

C1 – -3 (Pasto 1 + Pasto 2) + 2 (Pasto 3 + Pasto 4 + Pasto 5)

C2 – -2 (Pasto 3) + (Pasto 4 + Pasto 5)

C3 – (-Pasto 1) + (Pasto 2)

C4 – (-Pasto 4) + (Pasto 5)

C5 – (- Pasto 4 - Pasto 5) + 2 (Pasto 6)

Onde: 1 e 2 pasto produtivo, 3 pasto com degradação intermediária, 4 pasto degradado 5 pasto com degradação avançada e 6 pasto abandonado.

Quadro 3 - Sumário da análise de variância para o efeito das alturas de corte e das doses de P em plantas de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*, sobre a produção de biomassa (matéria seca - MS), teores de P e N na biomassa acumulada, eficiência de utilização de P, relação entre os teores de N e P na matéria seca e N e P absorvido e acumulado na parte aérea (Nab e Pab).

Quadrado médio							
FV	MS	P	N	EUP	N/P	Nab	Pab
Espécie	590 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,472 ^{***}	330438 ^{***}	41,78 ^{***}	83 ^{***}	0,01 ^{ns}
Dose	36555 ^{***}	0,0560 ^{***}	2,655 ^{***}	696360 ^{***}	457,73 ^{***}	1680 ^{***}	3,77 ^{***}
Corte	18631 ^{***}	0,0327 ^{***}	2,634 ^{***}	873144 ^{***}	17,05 ^{***}	64 ^{***}	0,07 ^{**}
E*D	2916 ^{***}	0,0237 ^{***}	0,186 ^{***}	395946 ^{***}	72,50 ^{***}	23 ^{**}	0,13 ^{***}
E*C	494 ^{ns}	0,0011 [*]	0,103 ^{***}	86969 ^{***}	41,92 ^{***}	17 ^{**}	0,01 ^{ns}
D*C	441 ^{ns}	0,0025 ^{**}	0,050 ^{**}	49400 ^{***}	9,93 ^{**}	33 ^{***}	0,03 [*]
E*D*C	179 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,065 ^{**}	77399 ^{***}	29,07 ^{***}	0,6 ^{ns}	0,04 ^{**}
E1/D1	1031 ^{**}	0,0048 ^{***}	0,165 ^{**}	589730 ^{***}	107,68 ^{***}	19 [*]	0,03 [*]
E1/D2	4496 ^{***}	0,0060 ^{***}	0,233 ^{**}	353419 ^{***}	15,85 ^{**}	19 [*]	0,02 ^{ns}
E1/D3	4464 ^{***}	0,0139 ^{***}	0,547 ^{***}	32583 ^{**}	0,99 ^{ns}	42 ^{**}	0,01 ^{ns}
E2/D1	3066 ^{***}	0,0018 ^{**}	1,106 ^{***}	22008 [*]	11,85 ^{**}	10 ^{ns}	0,03 [*]
E2/D2	4075 ^{***}	0,0041 ^{***}	0,391 ^{***}	122146 ^{***}	0,55 ^{ns}	0,9 ^{ns}	0,01 ^{ns}
E2/D3	3233 ^{***}	0,0087 ^{***}	0,523 ^{***}	91827 ^{***}	0,03 ^{ns}	61 ^{***}	0,09 ^{**}
E1/C1	6991 ^{***}	0,0166 ^{***}	0,448 ^{***}	855962 ^{***}	343,90 ^{***}	0,4 ^{ns}	0,93 ^{***}
E1/C2	3939 ^{***}	0,0247 ^{***}	0,329 ^{***}	200844 ^{***}	70,56 ^{***}	26 ^{**}	0,85 ^{***}
E1/C3	1946 ^{**}	0,0369 ^{***}	0,125 ^{**}	198098 ^{***}	99,97 ^{***}	24 ^{**}	0,87 ^{***}
E2/C1	9424 ^{***}	0,0012 [*]	0,353 ^{***}	53973 ^{**}	16,78 ^{**}	0,8 ^{ns}	0,15 ^{***}
E2/C2	8646 ^{***}	0,0030 ^{**}	1,136 ^{***}	17913 [*]	80,93 ^{***}	53 ^{**}	0,47 ^{***}
E2/C3	9761 ^{***}	0,0036 ^{**}	0,677 ^{***}	19393 [*]	43,21 ^{***}	1540 ^{***}	0,76 ^{***}
Resíduo	166	0,0002	0,011	4936	1,76	0,4	0,01

ns, *, ** e *** Não significativo e significativo a 5, 1 e 0.1 % de probabilidade pelo teste F.

E1 = *Brachiaria decumbens*. E2 = *Panicum maximum*.

D1,D2 e D3 = doses de P, iguais a 100, 200 e 500 mg dm⁻³ respectivamente.

C1, C2 e C3 = alturas de corte, que foram de sem corte (zero), 30 e 15 cm, em relação a superfície do solo, para a *B. decumbens* e de sem corte, 40 e 20 cm para o *P. maximum* respectivamente.