

GUSTAVO RESENDE RIOS

**RESPOSTAS DE GRAMÍNEAS NATIVAS AO DÉFICIT DE
NITROGÊNIO E À APLICAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA
EM ÁREAS IMPACTADAS POR MINERAÇÃO DE FERRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eduardo Gusmão Pereira

FLORESTAL - MINAS GERAIS

2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Florestal

T

R586r
2019

Rios, Gustavo Resende, 1991-

Respostas de gramíneas nativas ao déficit de nitrogênio e à aplicação de matéria orgânica em áreas impactadas por mineração de ferro / Gustavo Resende Rios. – Florestal, MG, 2019.

82 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Gusmão Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Setaria parviflora*. 2. *Paspalum densum*. 3. Recuperação ecológica. 4. Teor de nitrogênio. 5. Teor de ferro. 6. Mineração. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários. II. Título.

CDD 22. ed. 633.2

GUSTAVO RESENDE RIOS

**RESPOSTAS DE GRAMÍNEAS NATIVAS AO DÉFICIT DE
NITROGÊNIO E À APLICAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA
EM ÁREAS IMPACTADAS POR MINERAÇÃO DE FERRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de julho de 2019.



Gustavo Resende Rios
Autor



Eduardo Gusmão Pereira
Orientador

À minha mãe,

Sônia Aparecida Resende,

por todo amor, apoio e exemplo de força,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Serei eternamente grato a Deus, por me dar forças e não me deixar desistir. Nesta jornada, tive ainda mais certeza da grande importância da fé. Foi Deus e Nossa Senhora Aparecida que caminharam junto comigo, me protegendo, ajudando e me mostrando os caminhos.

Agradeço também, de forma especial, minha Mãe Sônia Aparecida Resende, que desde sempre me mostrou a importância de ser forte, de buscar meus objetivos e a não desistir, independente dos obstáculos. Peço a Deus sempre que me ajude a retribuir tudo que esta mulher de garra fez e faz por mim. Eu te amo muito Mãe, obrigado!

Gratidão ao meu orientador, professor Eduardo Gusmão Pereira, que desde a iniciação científica na graduação tem sido um grande exemplo de profissionalismo, respeito, humildade e de amor pela pesquisa. Serei sempre grato por todos os ensinamentos, pela ajuda nos dias de campo, conselhos e principalmente por acreditar em mim e me colocar pra frente e forte nos momentos em que mais precisei. Tenho muito orgulho de ter trabalhado com um profissional exemplar e espero que nossa parceria continue. Muito obrigado Professor!

Aos professores Marihus Altoé Baldotto e Advânio Siqueira, pelas contribuições no trabalho.

À minha irmã Marina Márcia Resende Rios, agradeço por estar comigo em mais uma jornada, dividindo dias difíceis e acreditando que eu seria capaz. Obrigado por ter nos dado o maior presente, nosso pequeno Heitor.

Ao meu sobrinho e afilhado Heitor Resende Rodrigues, que chegou durante tempos difíceis e me mostrou muitas coisas boas, me refez como pessoa e trouxe paz em diversos momentos que tanto precisei, mesmo com tão pouca idade. “É luz que me traz paz...”.

Agradeço ao Wilson Sousa, pelo companheirismo, por toda ajuda e por me incentivar sempre. Seu apoio e companhia tornou a caminhada mais leve e foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Gratidão!

À Kamilla Castelan, pela amizade e por mais uma vez ter sido um grande ponto de apoio. Os momentos de desabafo, de ajuda nas tarefas do mestrado e de descontração foram muito importantes. Fico feliz em saber que chegamos até aqui e que venha o dia que iremos rir de tudo isso.

Aos meus amigos, por entenderem a minha ausência e sempre me mostrar que estavam torcendo por mim, em especial Taís Souza, Fernanda Silva, Joice Freire, Cristiane Marques e todos os outros. É muito importante ter vocês comigo.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim e estão sempre em orações, especialmente minha vó Maria, minha afilhada Ana Júlia, minha tia Márcia e minha madrinha Esmênia.

Agradeço também, de forma especial, a todos que contribuíram muito durante esta jornada, seja nos trabalhos de campo, nas disciplinas ou nas demais atividades: Bruno Fagundes, Tiago Ferreira, Rui Tarcísio, Dâmaris Alves, Nayara Magry, Isadora Medina, Murilo Zaparoli e todos aqueles que estiveram presentes durante esta caminhada.

À Débora Duraes (Lab. de Solos - UFV - CAF), Anna Elisa Sousa (Lab. de Sementes UFV - CAF), Camilla Rios e Bruno Luan pela grande ajuda durante as análises em laboratório. Agradeço muito pela boa vontade que tiveram para me ensinar e por terem me ajudado tanto.

Aos meus “irmãos” do Grupo de Pesquisa em Fisiologia do Estresse Abiótico, pelos momentos de partilha de ideias, seminários e busca por novos conhecimentos. Tenho muito orgulho de fazer parte deste grupo!

Aos colegas professores, alunos e funcionários da Escola Estadual Padre Libério, por estarem comigo durante todo o período do Mestrado. Agradeço em especial à diretora Amanda Cristina pela amizade e palavras que sempre me motivaram.

Aos colegas do Colégio Losango de Pará de Minas, especialmente as coordenadoras Patrícia Gonçalves e Eliane Rombi, pelas importantes palavras de incentivo durante essa difícil reta final.

À Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Florestal, por mais uma vez contribuir tanto para meu crescimento, é uma grande honra estar dentro de uma Universidade que tanto contribui com ensino, pesquisa e extensão. Gratidão à todos os professores e funcionários que estiverem presentes neste caminho e contribuíram significativamente.

À VALE S.A pelo financiamento do projeto e pela bolsa. Muito obrigado pelo apoio.

Enfim, serei grato a todos os citados e àqueles que contribuíram de alguma forma.
Essa vitória não é só minha e a gratidão está muito além deste agradecimento, estará sempre
comigo em minha memória!

BIOGRAFIA

Gustavo Resende Rios, nascido em Pará de Minas - Minas Gerais, no dia 18 de fevereiro de 1991, filho de Sônia Aparecida Resende e Dilmo Geraldo Rios. No ano de 2008, concluiu o ensino médio pela Escola Estadual Nossa Senhora Auxiliadora, em Pará de Minas - MG. Em julho de 2015, formou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Florestal. Em 2017, iniciou os estudos no curso de Mestrado Acadêmico em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários (MCENA), na Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Florestal e em dezembro do mesmo ano, concluiu especialização lato sensu em Gestão e Consultoria Ambiental, pela Universidade do Vale do Rio Verde, *Campus* Pará de Minas - MG.

RESUMO

RIOS, Gustavo Resende Rios, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Respostas de gramíneas nativas ao déficit de nitrogênio e à aplicação de matéria orgânica em áreas impactadas por mineração de ferro.** Orientador: Eduardo Gusmão Pereira.

Para a extração de diversos recursos minerais é necessário causar uma série de distúrbios no ambiente além de gerar resíduos em grandes quantidades devido à ação das mineradoras. Metodologias com a finalidade de reabilitação dessas áreas envolvem desde a escolha correta da espécie até o incremento de matéria orgânica e de nutrientes como o nitrogênio (N), com consequente amenização dos efeitos do excesso de metais que são característicos da mineração de ferro (Fe). Considerando os aspectos de resistência ao excesso de Fe, algumas gramíneas C4 nativas, como as espécies *Paspalum densum* e *Setaria parviflora* se destacam por apresentarem características que demonstram seu potencial favorável para utilização em planos de restauração ecológica em ambientes com excesso de ferro. Assim, o objetivo deste trabalho foi entender, em dois capítulos distintos, como a interação entre o déficit de N e o excesso de ferro em solução nutritiva afeta as duas gramíneas (1º capítulo) e analisar as respostas das espécies em área de pilha de estéril com adição de diferentes doses de matéria orgânica (MO), utilizando cama de frango (2º capítulo). Os resultados do primeiro capítulo mostraram que a junção dos dois fatores de estresse (déficit de N e excesso de Fe) causou diminuição dos valores de variáveis importantes como condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética. Entretanto, as espécies não apresentaram danos oxidativos significativos, mostrando eficiência nos ajustes metabólicos em resposta ao estresse. O 2º capítulo evidenciou o potencial das duas gramíneas para utilização em áreas degradadas por mineração. Além da tolerância ao ferro já observada em outros estudos, a adição das diferentes doses de MO favoreceu *S. parviflora* e *P. densum*, contribuindo para melhor ganho de biomassa principalmente nas maiores doses. Além disso, observou-se que as espécies mostraram tolerância ao déficit hídrico, com mecanismos de proteção contra a combinação de estresses severos. Variáveis importantes como Fv/Fm, clorofila total e atividade da nitrato redutase mostraram respostas favoráveis das duas gramíneas. A adição da cama de frango proporcionou também maiores teores de nutrientes no substrato e nos tecidos vegetais, podendo contribuir para uma maior ciclagem de nutrientes, o que pode favorecer as próprias espécies e posteriormente outros indivíduos, aumentando o potencial dos planos de reabilitação.

Palavras-chave: *Setaria parviflora*. *Paspalum densum*. Restauração ecológica. Metabolismo do nitrogênio. Mineração de ferro. Adubação orgânica.

ABSTRACT

RIOS, Gustavo Resende, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Answers of native grasses for nitrogen deficit and application of organic matter in iron impacted areas.** Adviser: Eduardo Gusmão Pereira.

For the extraction of various mineral resources it is necessary to cause a series of disturbances in the environment and generate waste in large quantities due to the action of mining companies. Methodologies for the rehabilitation of these areas range from the correct choice of species to the increase of organic matter and nutrients such as nitrogen (N), with consequent mitigation of the effects of excess metals that are characteristic of iron (Fe) mining. . Considering the aspects of resistance to excess Fe, some native C4 grasses, such as *Paspalum densum* and *Setaria parviflora*, stand out for presenting characteristics that demonstrate their favorable potential for use in ecological restoration plans in environments with iron excess. Thus, the objective of this work was to understand, in two different chapters, how the interaction between N deficit and excess iron in nutrient solution affects both grasses (first chapter) and to analyze the responses of species in barren heap area. with addition of different doses of organic matter (MO) using chicken litter (second chapter). The results of the first chapter showed that the combination of the two stress factors (N deficit and Fe excess) caused a decrease in the values of important variables such as stomatal conductance, transpiration and photosynthetic rate. However, the species showed no significant oxidative damage, showing efficiency in metabolic adjustments in response to stress. The second chapter highlighted the potential of both grasses for use in mining degraded areas. In addition to the tolerance to iron already observed in other studies, the addition of different doses of MO favored *S. parviflora* and *P. densum*, contributing to better biomass gain especially at higher doses. In addition, it was observed that the species showed tolerance to water deficit, with protection mechanisms against the combination of severe stresses. Important variables such as Fv/Fm, total chlorophyll and nitrate reductase activity showed favorable responses of both grasses. The addition of chicken litter also provided higher nutrient levels in the substrate and plant tissues, and may contribute to greater nutrient cycling, which may favor the species themselves and later other individuals, increasing the potential of rehabilitation plans.

Keywords: *Setaria parviflora*. *Paspalum densum*. Ecological restoration. Nitrogen metabolism; Iron mining, Organic fertilization.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

0%NEF = Tratamentos com déficit de N e excesso de Fe

0%NFN = Tratamentos com déficit de N e quantidades normais de Fe

100%NEF = Tratamentos com quantidades normais de N e excesso de Fe

A = Taxa fotossintética

AFE = Área foliar específica

AFT = Área foliar total

AT = Acidez total

B = Boro

Ca = Cálcio

CF = Cama de frango

CO = Carbono orgânico

Cu = Cobre

DAT = Dias após tratamento

E = Transpiração

EROS = Espécies reativas de oxigênio

ETR = Taxa de transporte de elétrons

EUN = eficiência no uso de nitrogênio

F_0 = Fluorescência inicial

Fe = Ferro

Fig. = Figura

FJ = Folha jovem

FM = Folha madura

F_v/F_m = Eficiência quântica máxima do FSII

g_s = Condutância estomática

H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio

K = Potássio

MDA = Malonaldeído

Mg = Magnésio

Mn = Manganês

MO = Matéria orgânica

Mo = Molibdênio

N = Nitrogênio

N₂ = Nitrogênio molecular

Na = Sódio

NH₃ = Amônia

Ni = Níquel

NO₃⁻ = Nitrato

NPQ = Coeficiente de dissipação não fotoquímico

P = Fósforo

S = Enxofre

Si = Silício

TRA = Teor relativo de água

Zn = Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO I	20
RESPOSTAS DE DUAS ESPÉCIES DE GRAMÍNEAS NATIVAS SUBMETIDAS A DÉFICIT DE NITROGÊNIO E EXCESSO DE FERRO	20
ABSTRACT.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Área de estudo:	23
2.2 Metodologia experimental:.....	23
2.3 Variáveis fotossintéticas avaliadas:	25
2.3.1 Índice de clorofila total.....	25
2.3.2 Fluorescência da clorofila <i>a</i>	25
2.3.2 Trocas gasosas.....	26
2.4 Análises bioquímicas:	26
2.4.1 Nitrato redutase (NR)	26
2.4.2 Determinação dos teores de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	27
2.5 Quantificação dos teores de N e Fe nos tecidos vegetais e na placa de ferro das superfícies radiculares.....	28
2.6 Delineamento experimental e análise estatística	29
3. RESULTADOS	29
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÕES.....	44
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO II	49
ESTABELECIMENTO DE DUAS GRAMÍNEAS NATIVAS EM ÁREA DE PILHA DE ESTÉRIL DE MINERAÇÃO DE FERRO COM APLICAÇÃO DE DOSES DE MATÉRIA ORGÂNICA (CAMA DE FRANGO)	49
RESUMO	49
ESTABLISHMENT OF TWO NATIVE GRASS SPECIES ON IRON-MINING STERILE WASET AREA UPON APPLICATION OF DOSES OF ORGANIC MATTER (CHICKEN MANURE)	51
ABSTRACT.....	51
1 INTRODUÇÃO	53

2 MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.1 Área de estudo e montagem do experimento.....	54
2.2 Variáveis avaliadas	57
Índice de clorofila e fluorescência da clorofila <i>a</i>	57
Nitrato Redutase (NR)	57
Prolina	58
Teor relativo de água (TRA) nas folhas	58
Teor de umidade do substrato	59
Análises químicas do substrato	59
Quantificação de macro/micronutrientes, metais pesados e massa seca dos tecidos vegetais ...	59
2.3 Delineamento experimental e análise estatística	60
3. RESULTADOS	60
4. DISCUSSÃO	76
5. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mineração pode provocar uma série de distúrbios no meio ambiente onde está inserida. Por se destacar como uma das atividades industriais que mais crescem, grande parte das atividades de mineração podem causar danos aos ecossistemas por produzir grandes quantidades de rejeitos e destruir a cobertura vegetal, além de gerar consequências também ao solo, como erosão e lixiviação de contaminantes (Andrade *et al.*, 2009).

Buscando minimizar os impactos causados pelas mineradoras, várias metodologias estão sendo desenvolvidas, as quais propõem ações de baixo custo e que sejam eficientes na promoção da reabilitação ecológica das áreas mineradas. Existem muitas técnicas para recuperação de áreas degradadas, e a escolha de qual delas será utilizada dependerá de fatores como o nível de degradação, aspectos de cada região e também da questão financeira (Dias e Mello, 1998).

A escolha das espécies vegetais para os planos de revegetação é de grande importância para o sucesso dos mesmos (Jacobi *et al.* 2008), sendo mais indicadas aquelas com crescimento rápido, grande capacidade de gerar descendentes e principalmente resistentes a concentrações altas de metais e outros estressores abióticos. Além disso, espécies capazes de produzir quantidades maiores de matéria orgânica são indicadas por contribuir com o estabelecimento de outras espécies durante o processo de restauração (Resende *et al.*, 2013).

Exemplos de plantas que estão sendo utilizadas na recuperação de áreas degradadas por mineradoras são as gramíneas, que se destacam por serem espécies pioneiras e possuírem alto potencial de crescimento (Maiti, 2015). Dentre as gramíneas, as espécies C4 *Paspalum densum* (Poir.) e *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen, nativas das Américas, apresentam características que demonstram seu potencial favorável para utilização em planos que busquem a reabilitação ecológica de áreas impactadas (Rios *et al.*, 2017; Siqueira-Silva *et al.*, 2019).

Setaria Parviflora é considerada uma espécie de gramínea perene que pode ser encontrada em diferentes regiões e ecossistemas, inclusive naqueles com perturbações (Dekker 2000; Pensiero *et al.*, 2005). *Paspalum densum*, também perene, tem distribuição em vários ecossistemas presentes nas Américas, como por exemplo, a Amazônia, o Cerrado e a Mata Atlântica (Gomes, 1995). As duas espécies de gramíneas utilizadas neste estudo possuem potencial para utilização em áreas degradadas pela mineração de ferro (Fe), uma vez que apresentam tolerância aos efeitos do excesso de Fe (Araújo *et al.*, 2014; Rios *et al.*, 2017;

Siqueira-Silva *et al.*, 2019). Em regiões com excesso de Fe, pode ocorrer a formação das espécies reativas de oxigênio (EROS) acima da capacidade de degradação pelas plantas, que podem estar relacionadas a uma série de danos aos tecidos vegetais (Connolly e Guerrinot 2002), como a redução dos índices de clorofila, inibição da atividade de enzimas, peroxidação de lipídeos, danificação do DNA e de proteínas, além de reduzir a taxa fotossintética (Breusegem *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2006; Maheshwari, 2009; Pereira *et al.*, 2009). Portanto, para que seu metabolismo não seja prejudicado, é de grande importância que as espécies utilizadas sejam tolerantes ao excesso de Fe, como são as gramíneas *S. parviflora* e *P. densum*.

Além da seleção adequada das espécies vegetais a serem utilizadas, é fundamental a melhoria das condições físicas e químicas do substrato, como a adição de matéria orgânica (Lima *et al.*, 2015). Uma alternativa para o melhor estabelecimento das espécies em planos de restauração ecológica seria a adição de cama de frango. A cama de frango é formada comumente por cascas de arroz ou raspas de madeira juntamente com as fezes, restos do alimento e penas das aves, sendo considerada uma excelente alternativa como adubação orgânica (Lemos *et al.*, 2014). Este tipo de matéria orgânica caracteriza-se por possuir baixo custo de aquisição e grande quantidade de carbono e nutrientes importantes para as plantas, principalmente nitrogênio (N) (Adeli *et al.*, 2007; Boateng *et al.*, 2006; Moraes, 2006). O N é um elemento essencial requerido em grande concentração pelas plantas e presente em vários constituintes da célula vegetal como os aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (Taiz *et al.*, 2017). Em gramíneas, também é observado a contribuição do incremento da disponibilidade de N na nutrição e no desenvolvimento (Mengel *et al.*, 2001). Portanto, tal nutriente deve ser melhor estudado e relacionado aos fatores de estresses como o excesso de metais, por exemplo.

Neste contexto, acredita-se que as espécies de gramíneas utilizadas nos experimentos, cujo potencial de resistência às áreas impactadas pela mineração de Fe já foi comprovado, se estabeleçam melhor nos substratos com doses adequadas de cama de frango. Acredita-se que a matéria orgânica influenciará positivamente no incremento de nitrogênio e de outros nutrientes essenciais que não estão em quantidades ideais no substrato estudado. A partir dos experimentos relacionados ao déficit de N e das análises posteriores, espera-se compreender como o metabolismo do nutriente interage com o excesso de Fe nas espécies, o que contribuirá para a possível utilização da metodologia com adição de matéria orgânica para a reabilitação de áreas impactadas pela extração de minério de ferro.

Assim, o objeto deste trabalho é compreender, a partir de resultados das análises bioquímicas, fisiológicas e de quantificação de N e Fe, a interação entre o déficit de N e o excesso de Fe em *S. parviflora* e *P. densum*, visando analisar as respostas destas espécies de gramíneas nativas em solução nutritiva (com déficit de N e excesso de Fe) e em área de pilha de estéril com adição de diferentes doses de matéria orgânica (MO), utilizando cama de frango.

2. REFERÊNCIAS

- ADELI, A.; SISTANI, K.R.; ROWE, D.E. TEWOLDE, H. **Effects of broiler litter applied to no-till and tillage cotton on selected soil properties**. Soil Science Society of America Journal, 71, p. 974-983, 2007.
- ANDRADE, M. G. D. **Metais pesados em solos de área de mineração e Metalurgia de chumbo**. Revista Brasileira Ciências do Solo, 33:1879-1888, 2009.
- ARAÚJO, T. O.; FREITAS-SILVA L.; SANTANA, B. V. N.; KUKI, K. N.; PEREIRA, E. G.; AZEVEDO, A. A.; SILVA, L. C. **Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species**. Environmental Science and Pollution Research v. 21, p. 2777-2784, 2014.
- BOATENG, S.A.; ZICKERMANN, J.; KORNAHRENS, M. **Poultry manure effect on growth and yield of maize**. West African Journal of Applied Ecology, v.9, p.1-11, 2006.
- BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. **The role of active oxygen species in plant signal transduction**. Plant Science, v. 161, p. 405-414, 2001.
- CHATTERJEE, C.; GOPAL, R.; DUBE, B. K. **Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.)**. Scientia Horticulturae, v.108, p.1-6, 2006.
- CONNOLLY E. L.; GUERINOT M. L. **Iron stress in plants**. Genome Biology 1024.1–1024.4, 2002.
- DEKKER, J. **Emergent weedy foxtail (*Setaria spp.*) seed germinability behaviour**. In: Black M., Bradford K.J., Vasquez-Ramos J. (Eds), Seed biology: advances and applications. CAB International, Wallingford, UK, pp 411- 423, 2000.
- DIAS, L.E.; MELLO, J.W.V. **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, Departamento de Solos; Sociedade Brasileira de Recuperação de áreas degradadas. 251p. 1998.

GOMES, M. J. R. **Estudos taxonômicos no gênero *Paspalum* L., grupos “Virgata” e “Quadrifaria” no Brasil.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP, 1995.

JACOBI, C. M.; CARMO, F. F.; VICENT, R. DE C. **Estudo fitossociológico de uma comunidade vegetal sobre Canga como subsídio para a reabilitação de áreas mineradas no quadrilátero ferrífero, MG.** Revista Árvore, Viçosa-MG, v.32, n.2, p.345-353, 2008.

LEMO, M. S.; MAIA, E.; FERREIRA, E.; STACHIW, R. **Uso da cama de frango como adubo na agricultura.** Revista Brasileira de Ciências da Amazônia, v. 3, n. 1, p. 57-68, 2014.

LIMA, K. D. R. de; CHAER, G. M.; ROUWS, J. R. C.; MENDONÇA, V.; RESENDE, A. S. de. **Seleção de espécies arbóreas para revegetação de áreas degradadas por mineração de piçarra na caatinga.** Revista Caatinga, Mossoró, v. 28, n. 1, p. 203 – 213, 2015.

MAHESHWARI, R.; DUBEY, R. S. **Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings.** Plant Growth Regulation, v. 59, n. 1, p. 37-49, 2009.

MAITI, S. K.; MAITI, D. **Ecological restoration of waste dumps by topsoil blanketing, coir-matting and seeding with grass-legume mixture.** Ecological Engineering. 77, 74-84, 2015.

MENGEL, K. & KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition.** 5. ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 849, 2001.

MORAIS, T. P. dos S. **Produção e composição do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) sob doses de cama de frango.** 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

PENSIERO, J. F., GUTIERREZ H. F., EXNER, E. **Sistema de polinización y su efecto sobre la producción y el peso de semillas en nueve especies sudamericanas del género *Setaria*.** Interciencia, 30, 495–500, 2005.

PEREIRA, E. G.; OLIVA, M. A.; KUKI, K. N.; CAMBRAIA, J. 2009. **Photosynthetic changes and oxidative stress caused by iron ore dust deposition in the tropical CAM tree *Clusia hilariana*.** Trees. 23, 277-285.

RESENDE, A. S.; CHAER, G. M.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, A. P.; LIMA, K. D. R.; CURCIO, G. R. **Uso de leguminosas arbóreas na recuperação de áreas degradadas.** In: Tópicos em Ciências do Solo, Viçosa: SBCS, v. 8, p. 71-92, 2013.

RIOS, C. O.; SOUZA, B. C.; SIQUEIRA-SILVA, A. I.; PEREIRA, E. G. **Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetation of mined areas.** Polish Journal of Environmental Studies, 2017.

SIQUEIRA-SILVA, Advanio Inácio; RIOS, Camilla Oliveira; PEREIRA, Eduardo Gusmão. **Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers.** Journal of Environmental Sciences, v. 78, p. 257-266, 2019.

SOUZA, A. E. D. **Respostas morfofisiológicas em plantas expostas à estressores abióticos decorrentes da exploração de minério de ferro.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Florestal, MG, 2016.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., & MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal.** Artmed Editora, 2017.

CAPÍTULO I

RESPOSTAS DE DUAS ESPÉCIES DE GRAMÍNEAS NATIVAS SUBMETIDAS A DÉFICIT DE NITROGÊNIO E EXCESSO DE FERRO

RESUMO

O nitrogênio (N) é um exemplo de macronutriente essencial requerido de forma abundante nos vegetais. Embora possa ser encontrado em diferentes formas na biosfera e obtido pelas plantas na forma de nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_3), é comum sua deficiência em áreas degradadas. Nas áreas mineradas com excesso de Fe, as gramíneas *Paspalum densum* e *Setaria parviflora* podem ser espécies nativas importantes para os processos de revegetação, uma vez que possuem potencial de crescimento e são pioneiras em sucessões. O objetivo deste trabalho foi compreender as respostas fotossintéticas e nutricionais das duas espécies de gramíneas sob déficit de N e excesso de Fe. O experimento foi realizado em casa de vegetação utilizando soluções nutritivas de Hoagland (pH 5), com quatro tratamentos distintos: controle, quantidades normais de N (15 mmol L^{-1}) e excesso de Fe (7 mmol L^{-1}), déficit de N e quantidades normais de Fe ($0,019 \text{ mmol L}^{-1}$), e déficit de N com excesso de Fe. Foram avaliadas nas duas espécies folhas jovens e folhas maduras. As duas espécies apresentaram decréscimo na condutância estomática, transpiração e taxa fotossintética nos tratamentos com déficit de N e excesso de Fe. Além disso, a atividade da nitrato redutase apontou decréscimo nos tratamentos com déficit de N. Houve maior acúmulo de N nas folhas jovens das duas espécies quando comparadas às folhas maduras. As análises de MDA não apresentaram diferenças significativas, já a concentração de H_2O_2 em *P. densum* foi maior nos tratamentos com déficit de N e excesso de Fe, evidenciando que as gramíneas tiveram controle efetivo na neutralização do excesso de Fe, evitando assim danos severos. Os resultados comprovam que embora o déficit de N e o excesso de Fe resultem em impactos no metabolismo das duas gramíneas, as mesmas apresentam potencial para possíveis planos de reabilitação ecológica em áreas mineradas.

Palavras chave: Gramíneas; metabolismo do N; tolerância ao Fe; déficit de N.

RESPONSES OF TWO NATIVE GRASS SPECIES SUBMITTED TO NITROGEN DEFICIT AND IRON EXCESS

ABSTRACT

Nitrogen (N) is an example of essential macronutrient abundantly required in vegetables. Although it can be found in different forms in the biosphere and obtained by plants in the form of nitrate (NO_3^-) and ammonia (NH_3), its deficiency in degraded areas is common. In areas mined with excess Fe, *Paspalum densum* and *Setaria parviflora* grasses can be important native species for revegetation processes, as they have growth potential and are pioneers in successions. The objective of this work was to understand the photosynthetic and nutritional responses of both grass species under N deficit and excess Fe. The experiment was carried out in a greenhouse using Hoagland nutrient solutions (pH 5), with four distinct treatments: control, normal amounts of N (15 mmol L^{-1}) and excess Fe (7 mmol L^{-1}), N deficit and normal amounts of Fe ($0.019 \text{ mmol L}^{-1}$), and N deficit with excess Fe. In both species young leaves and mature leaves. Both species presented decrease in stomatal conductance, transpiration and photosynthetic rate in treatments with N deficit and excess Fe. In addition, the activity of nitrate reductase showed decrease in treatments with N deficit, two species when compared to mature leaves. The MDA analyzes did not show significant differences, since the H_2O_2 concentration in *P. densum* was higher in the treatments with N deficit and Fe excess, showing that the grasses had effective control in neutralizing the excess Fe, thus avoiding severe damage. The results prove that although the N deficit and the excess Fe result in impacts on the metabolism of both grasses, they present potential for possible ecological rehabilitation plans in mined areas.

Keywords: Grasses; N metabolism; Fe tolerance; N deficit.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda pelo minério de ferro é proporcional ao número de áreas que precisam ser degradadas para que este recurso seja explorado. Em alguns tipos de mineração, a exploração pode causar uma série de distúrbios no ambiente, como a grande produção de rejeitos, contaminação da água, remoção da camada superficial do solo, frequente desmatamento/supressão da vegetação nativa, e modificação das paisagens, o que demonstra a grande importância de planos de reabilitação das áreas mineradas (Koppe, 2007; Chaturvedi *et al.*, 2014).

A degradação de áreas pela mineração de Fe pode modificar todo o ecossistema, seja pela supressão da vegetação ou pelo acúmulo de rejeitos, o que acaba dificultando processos de restauração ecológica. Além disso, o excesso de metais como o próprio Fe, também comum a estas áreas, pode causar modificações nos processos fisiológicos dos vegetais, em função da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (Broadley *et al.*, 2012; Neves *et al.*, 2009). É comum em plantas sob excesso de Fe a formação de uma placa de ferro nas raízes, que pode prejudicar a absorção de outros metais e de nutrientes que podem causar danos às mesmas (Zhang *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2014).

Entre os vários outros fatores abióticos que dificultam o estabelecimento de espécies em áreas alteradas pela mineração, é comum a escassez de nutrientes importantes como N e P, cuja disponibilidade e absorção são dificultadas pela perda de matéria orgânica nestas áreas (Franco *et al.*, 1995). O excesso de Fe pode desencadear um déficit nutricional de diversos minerais, uma vez que pode haver competição e consequente diminuição dos teores de nutrientes absorvidos (Zanine e Santos, 2004). Além disso, a ação de enzimas importantes pode ser prejudicada, como por exemplo, a nitrato redutase (NR), relacionada ao metabolismo do N e à regulação da incorporação deste nutriente no metabolismo das plantas (Purcino *et al.*, 1994), incluindo as gramíneas (Mengel *et al.*, 2001).

As gramíneas podem ser espécies importantes para os processos de revegetação de áreas com excesso de Fe, uma vez que possuem potencial de crescimento e são pioneiras (Maiti, 2015; Siqueira-Silva *et al.*, 2019). Dentre as gramíneas, as espécies nativas das Américas *Paspalum densum* (Poir.) e *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen apresentam respostas positivas quando submetidas a excesso de ferro (Araújo *et al.*, 2014; Rios *et al.*, 2017; Siqueira-Silva *et al.*, 2019), e podem contribuir significativamente com planos de recuperação de áreas degradadas pelas mineradoras. Além disso, por serem gramíneas C4,

espera-se maior eficiência do uso do N devido a ausência aparente da fotorrespiração e menor investimento do N nas enzimas relacionadas à carboxilação quando comparadas às plantas C3, sendo possível, por exemplo, o investimento na produção de novas folhas (Sage *et al.*, 1987; Sage, 2004).

Acredita-se que, além de serem resistentes ao excesso de Fe, prevenindo danos em relação à formação de espécies reativas de oxigênio, as duas gramíneas apresentarão ajustes fisiológicos satisfatórios em resposta ao déficit de N, como por exemplo, a regulação da atividade da nitrato redutase, enzima relacionada a aquisição de N; a eficiente remobilização do nutriente de folhas maduras para folhas jovens; a compartimentalização do N em diferentes órgãos e interação com a placa de ferro nas raízes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é compreender as respostas fotossintéticas e nutricionais das duas espécies de gramíneas nativas (*P. densum* e *S. parviflora*) cultivadas em solução nutritiva com déficit de N e excesso de Fe. O estudo poderá contribuir para um melhor entendimento de como as espécies respondem ao déficit de N e ao excesso de Fe separadamente e como a interação dos dois fatores pode influenciar no metabolismo das mesmas em possíveis planos de restauração ecológica em áreas com poucos nutrientes e excesso de metais, como as áreas de pilha de estéril de mineração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo:

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação da Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Florestal, na cidade de Florestal - Minas Gerais (19° 52' 29'' S e 44° 25' 12'' W).

2.2 Metodologia experimental:

Foram realizados experimentos distintos com as espécies *Paspalum densum* (Poir.) e *Setaria parviflora* (Poir.) Kerguelen entre novembro de 2017 e janeiro de 2018. Inicialmente, foram coletadas sementes de *P. densum* e *S. parviflora* de plantas matrizes localizadas no *Campus* UFV - Florestal. As sementes foram então semeadas em bandejas plásticas contendo

areia lavada e irrigada duas vezes ao dia, sendo uma vez com água e outra com solução nutritiva de Hoagland (meia força). O crescimento dos indivíduos foi monitorado até que os mesmos atingissem cerca de 7 cm de comprimento.

Após o período de crescimento inicial, as plantas com maior vigor e homogeneidade, foram transplantadas para vinte vasos de cinco litros, sendo três plantas em cada vaso, preenchidos com solução nutritiva de Hoagland a meia força (Hoagland e Arnon, 1950). Após um período de aclimação (aproximadamente 30 dias) e com o crescimento das plantas, foram selecionados vinte indivíduos de cada espécie que foram mantidos em vasos distintos. Para estes vasos, a solução de Hoagland foi preparada com uma força, sendo que os mesmos ficaram na respectiva solução por sete dias. Diariamente durante todo o experimento, além de completar os vasos com água deionizada, aferiu-se o pH entre 5 e 5,5, utilizando NaOH ou HCl. A troca da solução foi realizada a cada sete dias.

Neste experimento, aplicou-se quatro tratamentos, descritos a seguir:

100% NFN (Controle) = Solução completa de Hoagland, com as quantidades normais de N (15 mmol L^{-1} – NH_4 1 mmol L^{-1} e NO_3 14 mmol L^{-1}) e Fe ($0,019 \text{ mmol L}^{-1}$ - Fe-EDTA).

100% NEF = Solução de Hoagland, com as quantidades normais de N, mas com excesso de Fe (7 mmol L^{-1} - Fe-EDTA).

0% NFN = Solução nutritiva preparada com soluções estoques diferentes, sem a presença de N em suas composições e com quantidades normais de Fe.

0% NEF = Solução nutritiva preparada com soluções estoques diferentes, sem a presença de N em suas composições e com excesso de Fe.

Para os tratamentos com déficit de N, as soluções nutritivas apresentaram as seguintes soluções estoque: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mol L^{-1}), KH_2PO_4 (1 mol L^{-1}), K_2SO_4 (1 mol L^{-1}), $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 mol L^{-1}), Microelementos (2 mol L^{-1}) e Fe-EDTA ($0,036 \text{ mol L}^{-1}$ quantidades normais de ferro e $0,210 \text{ mol L}^{-1}$ para excesso de ferro, totalizando concentrações finais de $0,019 \text{ mol/mL}$ Fe-EDTA e 7 mol/mL Fe-EDTA, respectivamente). Antes da aplicação dos tratamentos, as soluções dos vasos foram retiradas, onde as plantas dos mesmos ficaram em água deionizada por 24 horas.

Diariamente foram observados os sintomas presentes na parte aérea e raiz após a aplicação dos tratamentos. Os experimentos duraram 13 e 20 dias para *S. parviflora* e *P. densum*, respectivamente.

2.3 Variáveis fotossintéticas avaliadas:

As medições foram realizadas em duas folhas de cada indivíduo previamente marcadas, sendo uma folha jovem - FJ (última folha totalmente expandida) e folha madura - FM (terceira folha totalmente expandida) de seu respectivo perfil (Figura 1).

2.3.1 Índice de clorofila total

Os índices de conteúdo de clorofila foram obtidos com o medidor portátil ClorofiLOG (Falker, Brasil). Os valores de clorofila total foram caracterizados pela média de três medições feitas em cada folha. As medições foram realizadas periodicamente ao longo do experimento e, com a visualização de sintomas nas folhas, foi possível determinar o momento de finalizar os experimentos das duas espécies em estudo, onde foi coletado material vegetal para as análises posteriores.

2.3.2 Fluorescência da clorofila *a*

As medições das variáveis de fluorescência da clorofila *a*, foram realizadas nas duas folhas marcadas (FJ e FM) com o fluorômetro de pulso modulado Mini-Pam (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Após a aplicação dos tratamentos, as medições foram realizadas no período da manhã, entre as 7 e 10 horas, a cada dois dias durante todo o período experimental, sendo 11 dias para *S. parviflora* (novembro 2017) e 20 dias para *P. densum* (Janeiro, 2018). Inicialmente, as folhas jovens e maduras de cada planta foram aclimatadas ao escuro por 30 minutos. Após este período, realizou-se as medições da fluorescência inicial (F_0) e também da fluorescência máxima (F_m), com luz de medição ($0,15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e pulso de luz saturante ($12000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Após a obtenção dos valores, foi possível determinar a eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII), ($F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$) (Genty *et al.*, 1989). Em seguida, as folhas foram expostas por 40 segundos à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) com intensidade de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Um pulso de luz saturante foi aplicado após o período de iluminação, tornando-se possível obter as seguintes variáveis: $\phi\text{PSII} = (F_m' - F)/F_m'$ – rendimento quântico efetivo do FSII no tecido vegetal com iluminação; $\text{NPQ} = F_m - F_m'/F_m'$ – coeficiente de dissipação não-fotoquímico (Bilger e Björkman, 1990); $\text{ETR} = 0,5 \times IA \times$

$\phi\text{PSII} \times \text{PAR}$ – taxa de transporte de elétrons, em que 0,5 é a proporção de fótons destinados aos dois fotossistemas (Melis *et al.*, 1987) e IA é a absorptância foliar.

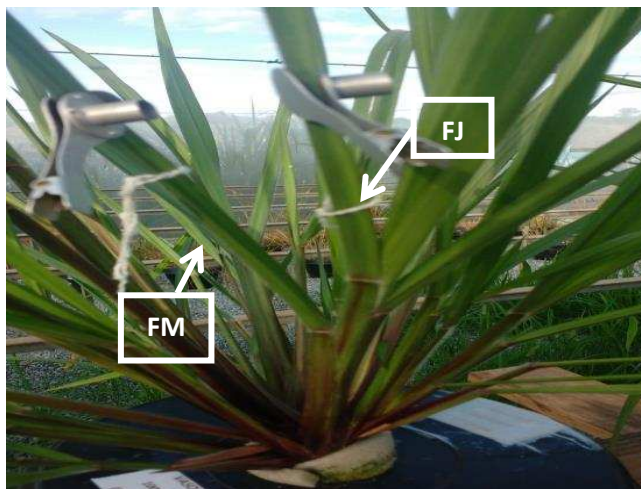


Figura 1: Indivíduo de *P. densum*, exemplificando as duas folhas (FJ e FM) marcadas e com as pinças para aclimação ao escuro.

2.3.2 Trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram feitas ao final do experimento (após 13 dias após da aplicação dos tratamentos em *S. parviflora* e 20 dias em *P. densum*), em folhas jovens e maduras, no período da manhã. Foi utilizado o medidor de gases no infravermelho (IRGA), modelo LI-6400xt (Li-Cor Inc., Lincoln, Nebraska, EUA), com luz de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ estabelecida por LEDs, em câmara foliar (modelo 6400-02B, Li-Cor Inc.). As avaliações foram realizadas com auxílio de sistema de controle de CO_2 (modelo 6400-01, Li-Cor Inc.) com concentração de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{mol}^{-1}$, com 30°C de temperatura e 45% de umidade do ar. Obtiveram-se os valores das seguintes variáveis: E - transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), A - taxa fotossintética líquida ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e g_s - condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.4 Análises bioquímicas:

2.4.1 Nitrato redutase (NR)

Foram coletadas folhas (jovens e maduras) para o teste de NR no final de cada experimento. As folhas foram colocadas em sacos plásticos identificados e acondicionadas em caixa de isopor com gelo. O teste foi realizado imediatamente após a coleta, de acordo com o protocolo de Jaworski (1971), com adaptações.

Inicialmente, pesou-se cerca de 0,5 gramas de material foliar e preparou-se o meio de incubação (tampão fosfato de potássio 0,1M; propanol, KNO₃ e clorofenicol). Para a extração, o material foi exposto a vácuo (três vezes) juntamente com 5 ml do meio de incubação. A atividade enzimática foi determinada no tempo inicial (T₀) e após uma hora (T₁). Após os dois tempos de coleta, foi adicionado imediatamente 0,5 ml de sulfanilamida e 0,5 ml de N-2-naftil etileno (NNEDA) em cada tubo. Em seguida, os tubos foram deixados em banho maria (Ethik technology, 521-3D) a 30°C por 20 minutos e após este período, foram adicionados 2,5 ml de água deionizada a cada tubo. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800) no comprimento de onda de 540nm.

Para o cálculo da atividade de NR, utilizou-se a determinação da quantidade de nitrito a partir de curva padrão, onde os valores da reta obtidos e utilizados foram aproximados de 0,02 ($y = 0,02x$ e $r^2 = 0,9975$), sendo o valor de y equivalente à absorbância e x à concentração de nitrito (nmol ml⁻¹).

2.4.2 Determinação dos teores de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para as análises dos teores de MDA e H₂O₂, foram coletadas folhas jovens e maduras de *S. parviflora* (13º dia de experimento) e de *P. densum* (20º dia de experimento) e congeladas em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta. Os teores de MDA foram obtidos segundo método de Hodges *et al.* (1999). Inicialmente pesou-se 0,1g de tecido foliar que foram macerados em almofariz com pistilo, após adição de nitrogênio líquido. Após a maceração, foi adicionado 1mL de etanol 80%, as amostras foram vortexadas (Phoenix, modelo AP:54) e levadas para o banho ultrassônico refrigerado (Elmasonic S30 H) por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000, a 4°C (Thermo scientific, megafuge 16R), coletou-se o sobrenadante e o mesmo processo de extração foi repetido mais duas vezes. Adicionou-se 1mL do extrato em tubos de ensaios com tampas de rosca contendo 1mL de solução de TBA+ (ácido tricloacético a 20%, hidroxitolueno butilado 0,01% e 0,65% de ácido tiobarbitúrico) e outros 1mL da amostra foi adicionado a tubos contendo 1mL de solução de TBA - (ácido tricloacético a 20%, hidroxitolueno butilado 0,01%). Em seguida, incubou-se os tubos banho maria (Ethik technology, 521-3D) a 95°C durante 25 minutos com paralização da reação em banho de gelo por 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10min a 25°C e 10.000 g. Após a centrifugação, foram feitas leituras em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800) em

três comprimentos de onda: 440nm, 532nm e 600nm. Os cálculos foram realizados seguindo a equação: $\{[(A_{523} - A_{600}) - (A_{440} - A_{600}) (MA \text{ de sacarose a } 532 / MA \text{ de sacarose a } 440)] / 157000\} 10^6$ sendo A = absorvância, MA = absorvância molar e 157000 = coeficiente de extinção molar (Hodges *et al.*, 1999).

Para a determinação dos teores de H₂O₂, seguiu-se o proposto por Velikova *et al.* (2000). Inicialmente, pesou-se 0,1g das folhas, macerou-se cada amostra com nitrogênio líquido em almofariz e pistilo e adicionou-se 1mL de TCA 1% (ácido tricloroacético). Em seguida, centrifugou-se (Thermo scientific, megafuge 16R) a 12.000g, 4°C e por quinze minutos. Posteriormente, separou-se 0,250 mL do sobrenadante, onde foram adicionados 0,5 mL de solução de fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0; 0,250 mL de TCA 0,1% e 1mL de iodeto de potássio 1M. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, UV-1800) no comprimento de onda de 390nm. Após obtenção dos valores no respectivo comprimento de onda, obteve-se o teor de peróxido de hidrogênio com auxílio de curva padrão.

2.5 Quantificação dos teores de N e Fe nos tecidos vegetais e na placa de ferro das superfícies radiculares

Após a coleta das folhas para os procedimentos descritos acima, os tecidos vegetais foram separados em colmo e folhas (jovens e maduras), colocados em sacos de papel, para secagem em estufa à 65°C e destinados para quantificação de N e Fe nos mesmos por espectrometria de absorção molecular, seguindo os protocolos de Kjeldahl (1883) e Malavolta *et al.* (1989), respectivamente.

Para quantificação da placa de ferro, uma porção da raiz de cada indivíduo foi coletada e colocada em um frasco de vidro contendo solução de DCB (ditionito-citrato-bicarbonato), seguindo técnica recomendada por Taylor e Crowder (1983). Em seguida, agitou-se periodicamente os frascos por 50 minutos e armazenou-se a solução de cada tratamento em tubos do tipo Falcon, devidamente identificados para a quantificação das porções de Fe e N presentes na solução por meio de espectrometria de absorção atômica. Após este procedimento, as porções das raízes foram secas em estufa, pesadas e utilizadas para a quantificação de N e Fe conforme descrito acima para as demais partes das plantas.

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Os indivíduos de *S. parviflora* e *P. densum* foram avaliados em experimentos independentes, ou seja, buscando-se as respostas das duas espécies com relação ao déficit de N e ao excesso de Fe. Os experimentos foram executados em blocos casualizados e com esquema fatorial 2x2, com duas concentrações de Fe (0,019 mmol L⁻¹ e 7 mmol L⁻¹), duas concentrações de N (15 mmol L⁻¹ e 0 mmol L⁻¹), com 5 repetições. Quando apropriado, o tipo de folha (folha jovem e folha madura) foi considerado como sub-parcela. Bem como para os dados de clorofila total, o tempo (DAT) foi considerado como sub-parcela. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Antes da ANOVA os dados foram testados quanto à homogeneidade de variância (testes de Cochran e Bartlett) e distribuição normal dos erros (teste de Lilliefors). Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico SAEG.

3. RESULTADOS

Em *S. parviflora*, após treze dias de exposição aos tratamentos, as folhas jovens (FJ) mostraram valores de clorofila significativamente inferiores nas plantas expostas à combinação de déficit de N e excesso de Fe (0%NEF) em comparação com os demais tratamentos (Fig. 2 A). Nas folhas maduras (FM) da mesma espécie houve redução significativa dos índices de clorofila em todos os tratamentos com excesso de ferro ou déficit de N em relação ao tratamento controle (Fig. 2 C). A espécie *P. densum* apresentou valores de clorofila significativamente maiores e na presença de N, mesmo no tratamento com excesso de ferro, para os dois tipos de folha (Fig. 2 B e 2 D). O declínio nos valores de clorofila total foram observados nos dois tratamentos com déficit de N em *P. densum* a partir do 12º dia. Entretanto, ao final do experimento (20º dia) foi observada redução significativa em FJ das plantas de *P. densum* exposta ao excesso de Fe em relação ao tratamento com quantidades normais de N e Fe. Entre os tratamentos houve diferença significativa em relação aos DAT's para ambas as espécies.

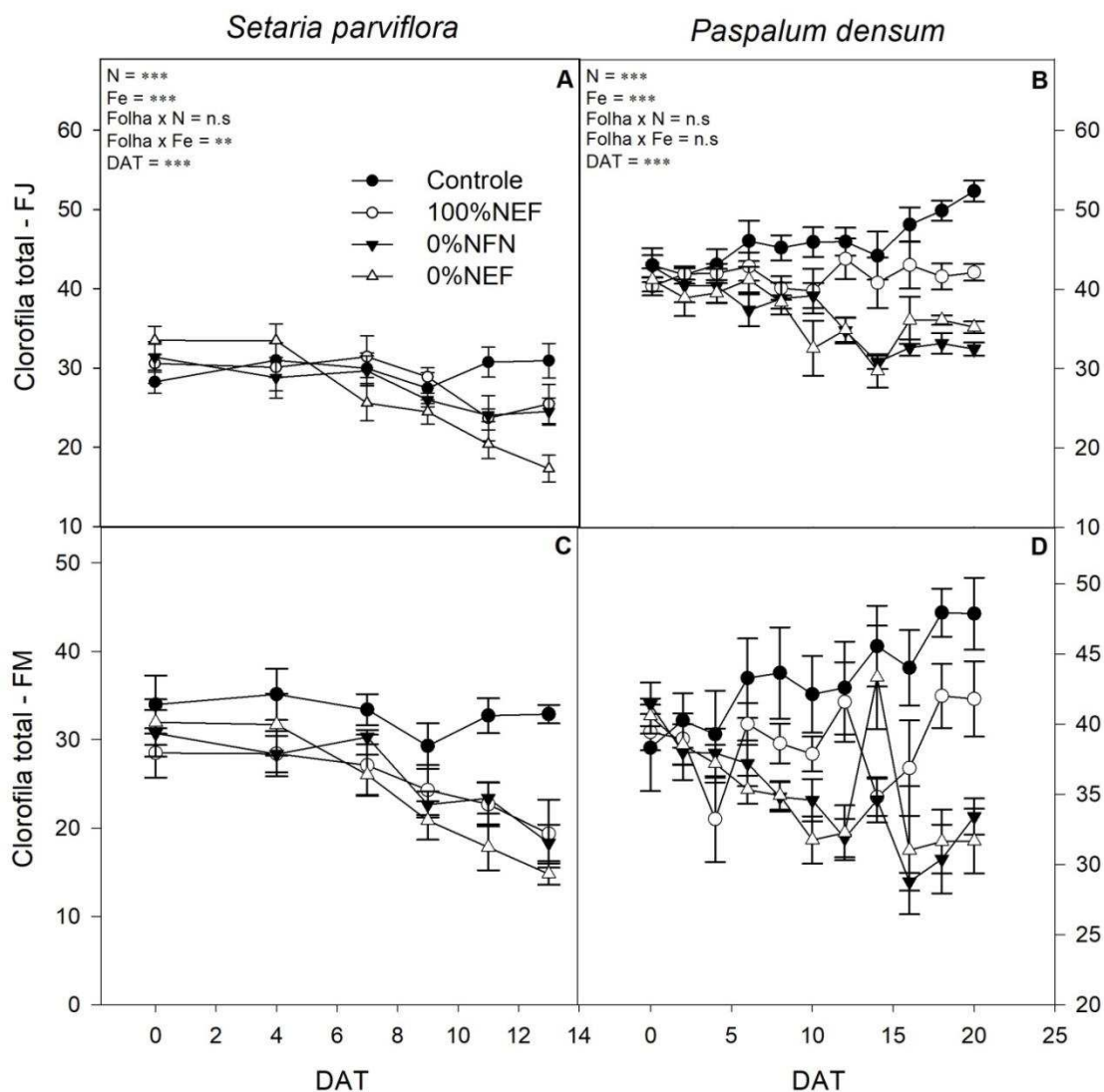


Figura 2: Índices de clorofila nas folhas jovens e maduras de *S. parviflora* (A e C) e *P. densum* (B e D) cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (Controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. No eixo X, têm-se os DAT's de cada experimento, tendo as durações de 13 dias (*S. parviflora*) e 20 dias (*P. densum*). Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e n.s = não significativa.

Em *S. parviflora* não foi observada diferença significativa dos valores de fluorescência inicial (F_0) entre os tratamentos com déficit de N ou excesso de Fe. Apenas o fator folha apresentou diferença significativa (Fig. 3 A), com valores maiores de F_0 nas folhas jovens,

quando comparada às folhas maduras. Os valores de F_0 obtidos para *P. densum* (Fig. 3 B) apresentaram diferença significativa em relação aos efeitos isolados do déficit de N e excesso de Fe. O tratamento com quantidades normais de Fe e déficit de N (0%NFN) apresentou valores de F_0 significativamente superiores aos demais tratamentos, independentemente do tipo de folha.

Os valores da eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) em *S. parviflora* e *P. densum* foram significativamente menores nas plantas com déficit de N. O excesso de ferro também resultou em declínio nos valores de F_v/F_m em ambas as espécies, entretanto, a interação N x Fe e os valores para os diferentes tipos de folha não apresentaram diferença estatisticamente (Fig. 3 D).

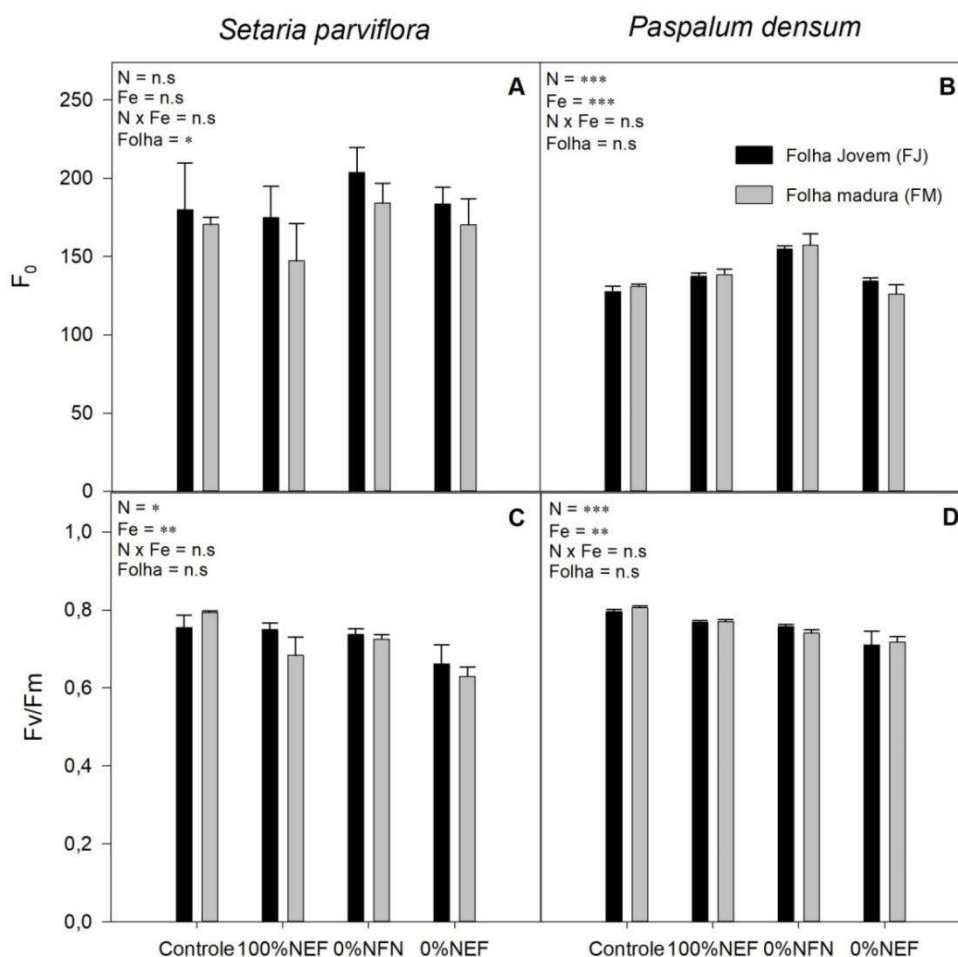


Figura 3: Fluorescência mínima (F_0) e eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) nas folhas jovens e maduras de *S. parviflora* (A e C) e *P. densum* (B e D) cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (Controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e n.s = não significativa.

O rendimento quântico efetivo do PSII (Φ PSII), em *S. parviflora* (Fig. 4 A) apresentou diferença significativa quanto ao efeito isolado apenas em relação ao déficit de N. Observou-se que nos tratamentos com déficit de N a folha madura apresentou valores menores quando comparadas às folhas jovens (interação significativa N x folha). A combinação do déficit de N com o excesso de Fe reduziu significativamente os valores de Φ PSII da folha jovem de *S. parviflora*. O mesmo efeito ocorreu com o déficit de N em folhas maduras, independentemente da concentração de Fe. Em *P. densum*, o Φ PSII apresentou interação significativa entre N x Fe, com valores significativamente maiores no tratamento controle em relação aos demais tratamentos. Os tratamentos com déficit de N ou com o excesso de Fe apresentaram valores significativamente menores (Fig. 4 B).

A taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) foi distinta nas duas espécies. Em *S. parviflora*, observou-se diferença significativa apenas com relação ao fator N. Já em *P. densum*, os valores de ETR apresentaram diferenças significativas para os efeitos isolados do Fe e N e para a interação N x Fe. As plantas do tratamento controle apresentaram maior ETR em relação aos demais. Houve redução significativa do ETR em função do excesso de ferro ou déficit de N de forma isolada (Fig. 4 D).

Apenas a espécie *P. densum* apresentou diferenças significativas quanto ao coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ). Foram observados efeitos significativos quanto aos fatores N e Fe de forma isolada e na interação N x Fe. Em comparação ao controle, os tratamentos com déficit de N ou com excesso de Fe apresentaram maiores valores de NPQ (Fig. 4 F).

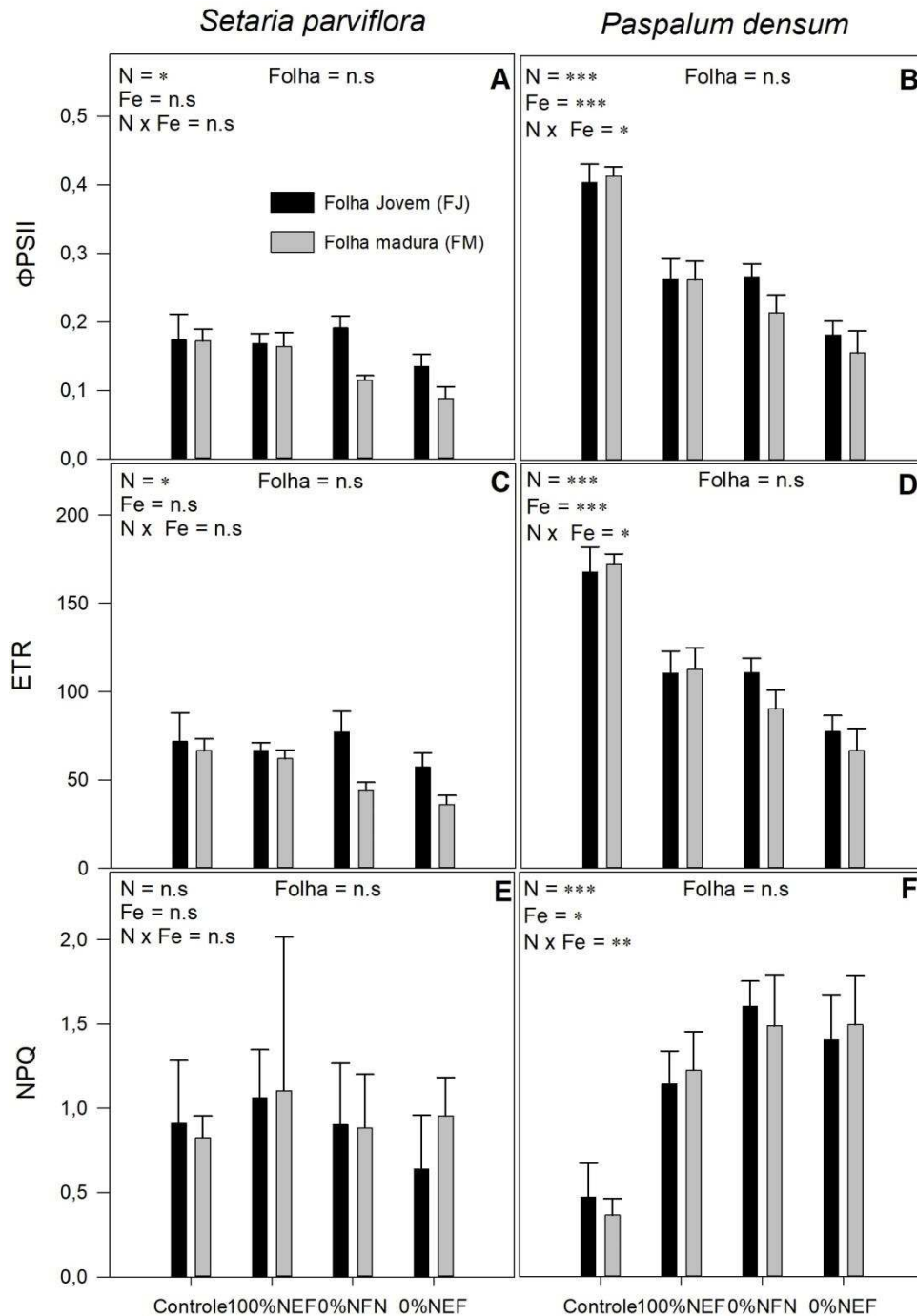


Figura 4: Rendimento quântico efetivo do PSII - Φ_{PSII} (A e B), taxa aparente de transporte de elétrons -ETR (C e D) e coeficiente de extinção não fotoquímica - NPQ (E e F) nas folhas jovens e maduras de *S. parviflora* e de *P. densum* cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e n.s = não significativa.

Os valores de taxa fotossintética (A) em *S. parviflora* (Fig. 5 A) apresentaram diferença significativa em função dos efeitos isolados do déficit de N e do excesso de Fe na solução nutritiva, já a interação N x Fe não apresentou diferença significativa. Observou-se declínio dos valores da A para o tratamento 0%NEF em relação ao controle, para ambas as folhas (FJ e FM) de *S. parviflora*. Entretanto, a A somente foi significativamente reduzida em função do déficit de N nas folhas maduras (interação significativa N x folha). Os valores de fotossíntese para a espécie *P. densum* apresentaram diferença significativa quando exposta a interação entre o déficit de N e excesso de Fe. Todos os tratamentos com excesso de Fe ou déficit de N resultaram na diminuição da fotossíntese nesta espécie em relação às plantas controle. Com exceção do controle, os demais tratamentos resultaram em valores significativamente maiores nas folhas jovens.

Em *S. parviflora*, o déficit de N causou redução significativa na condutância estomática (g_s) e na transpiração (E), somente nas folhas maduras (interação significativa N x folha, Fig. 5C e E). Em *P. densum* houve efeito significativo da interação N x Fe, bem como efeitos isolados do déficit de N, do excesso de Fe e dos tipos de folhas nos valores de g_s e E . Observou-se que tanto o déficit de N quanto o excesso de Fe afetaram negativamente estas duas variáveis, quando comparadas às plantas de *P. densum* do tratamento controle. Entretanto, plantas expostas ao déficit de nitrogênio sob excesso de ferro apresentaram os menores valores. Em todos os tratamentos as plantas de *P. densum* apresentaram maiores valores para as folhas jovens.

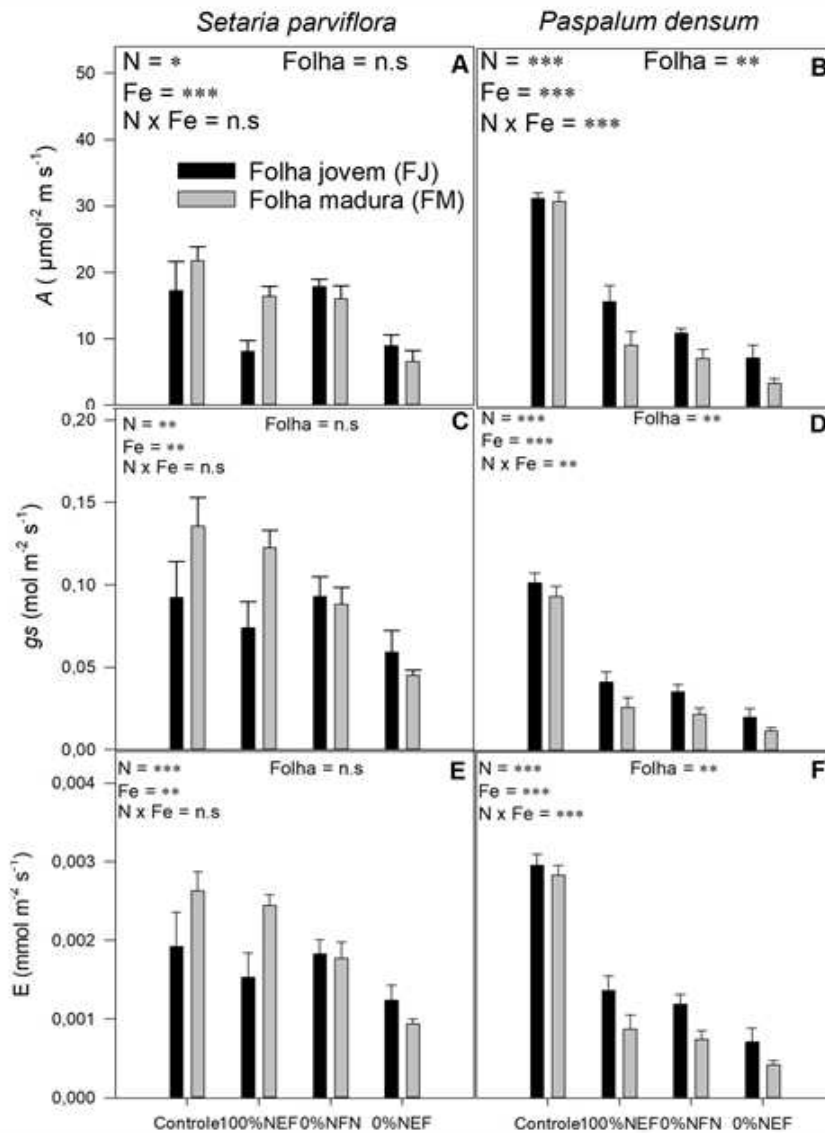


Figura 5: Fotossíntese - A (A e B), condutância estomática - g_s (C e D) e transpiração - E (E e F) nas folhas jovens e maduras de *S. parviflora* e de *P. densum* cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e n.s = não significativa.

Não houve diferenças significativas na concentração de malonaldeído (MDA) obtidos para ambas as espécies expostas aos diferentes tratamentos (Fig. 6 A e B). Os teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em *S. parviflora*, apresentaram diferença significativa com relação ao efeito simples do Fe e em relação às folhas. As plantas de *S. parviflora* expostas a

menor concentração de ferro apresentaram os maiores teores de H_2O_2 , principalmente naquelas sob déficit de N. (Fig. 6 C). Em *P. densum*, observou-se diferença significativa em relação aos efeitos simples do déficit de N, do excesso de Fe, do tipo de folha e na interação N x Fe (Fig. 6 D). Nesta espécie, as FM apresentaram maior concentração de H_2O_2 quando comparadas às FJ.

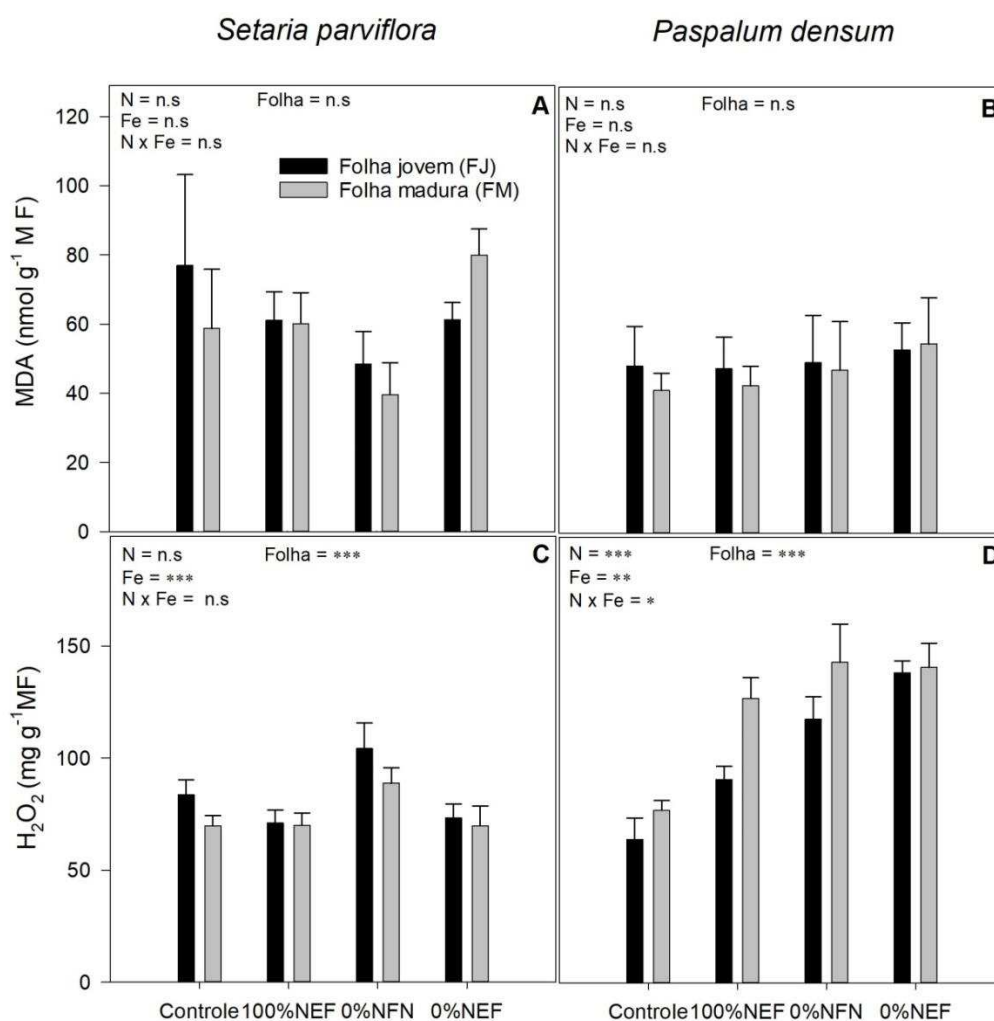


Figura 6: Concentrações de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas jovens e maduras de *S. parviflora* (A e C) e de *P. densum* (B e D) cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ e n.s. = não significativa.

A atividade da nitrato redutase (NR) (Fig. 7 A-B) nas duas espécies apresentou diferenças significativas apenas com relação ao déficit de N. Menor atividade da NR foi

observada somente nos tratamentos com déficit de N, independentemente da concentração de Fe ou do tipo de folha.

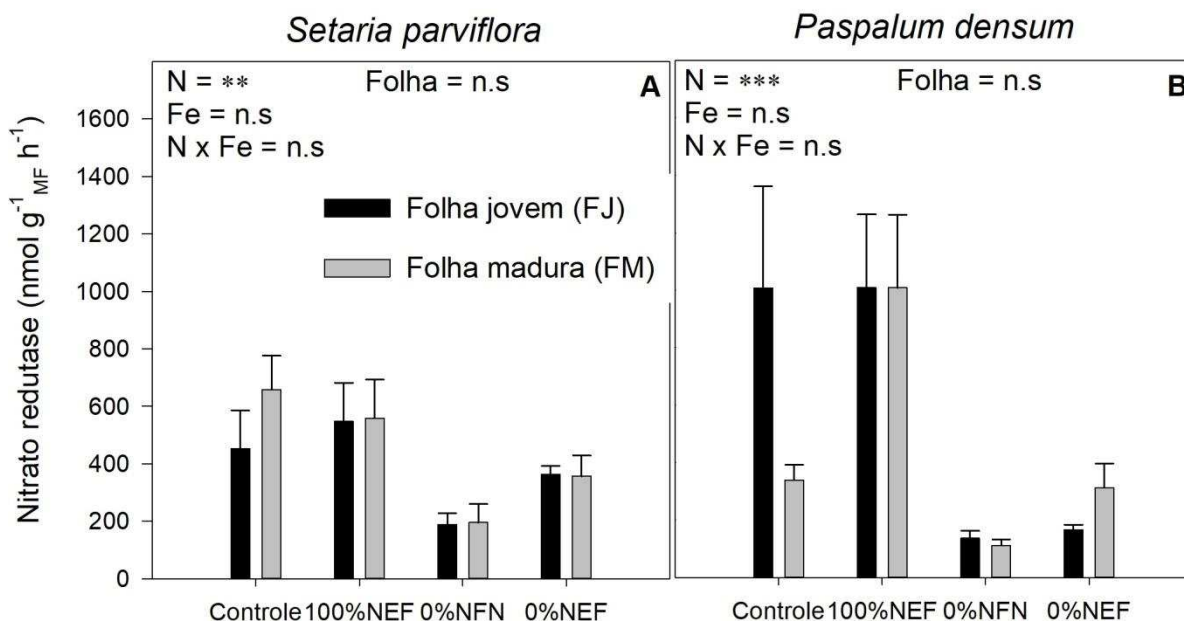


Figura 7: Atividade de nitrato redutase (NR) em folhas jovens e maduras de *S. parviflora* (A) e de *P. densum* (B) das gramíneas cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Os teores de N nas folhas (Fig. 8 A-B), no colmo (Fig. 8 C-D) e nas raízes (Fig. 8 E-F) apresentaram valores significativamente maiores nos tratamentos controle e 100%NFN em ambas as espécies. Nas folhas, os teores de N apresentaram diferença significativa para a interação N x Fe, sendo que em *P. densum*, o excesso de Fe diminuiu os teores de N. No geral, as folhas jovens apresentaram maiores teores de N para as duas espécies, em todos os tratamentos (Fig. 8 A-B). Nos demais tecidos, observou-se diferença significativa apenas para o efeito de N isolado.

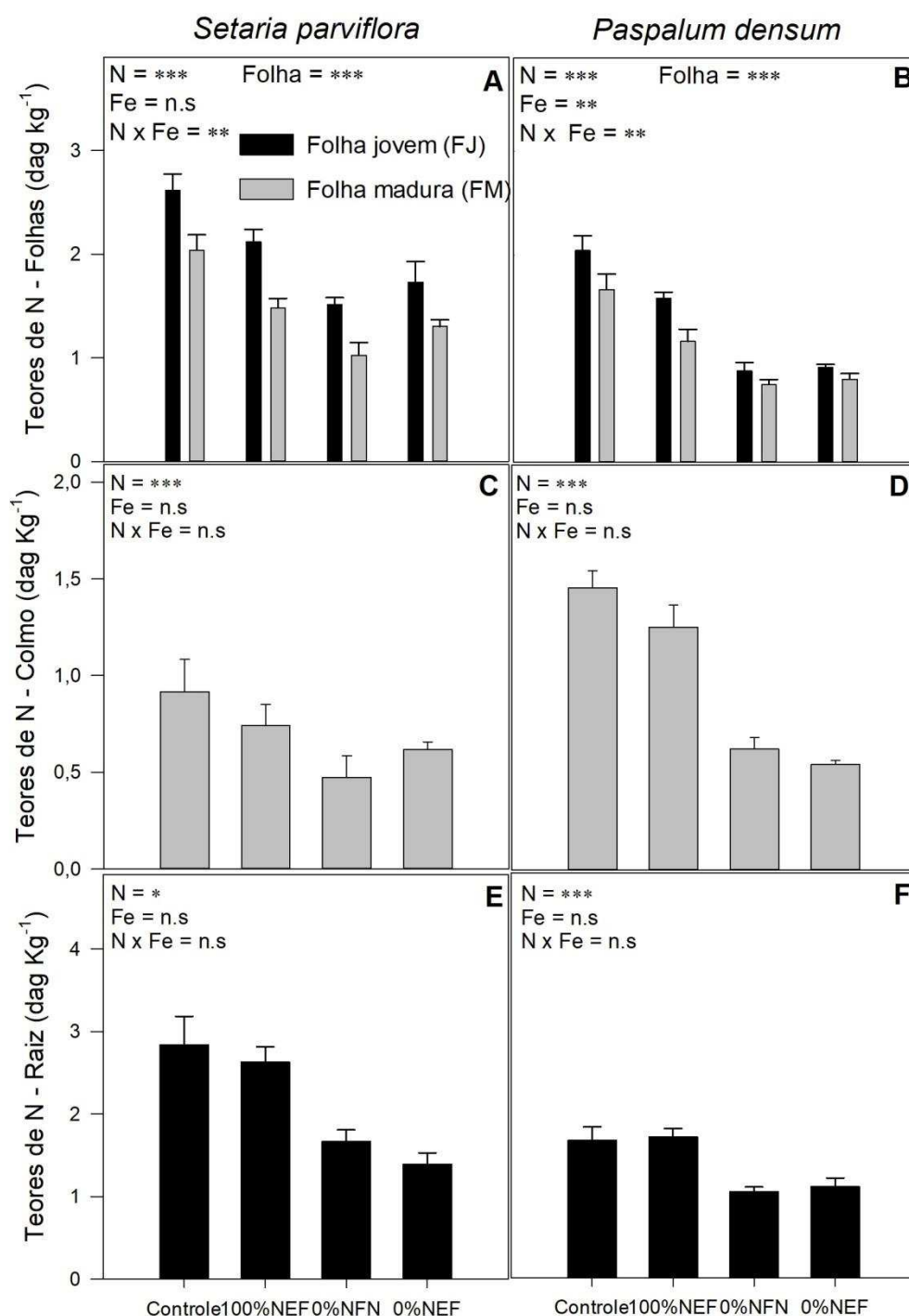


Figura 8: Teores de N em diferentes órgãos vegetais em *S. parviflora* (A, C, E) e *P. densum* (B, D, F) das plantas cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Em ambas as espécies, os teores de Fe nas folhas (FJ e FM) apresentaram valores significativamente maiores nos tratamentos com excesso de Fe. Em *P. densum*, observou-se diferença significativa entre as folhas, nos diferentes tratamentos de Fe e N e também na interação N x Fe. Observou-se, em *S. parviflora*, diferença significativa apenas com relação ao Fe. As FM apresentaram valores significativamente maiores do que as FJ nos tratamentos com excesso de Fe em *P. densum* e menores em *S. parviflora* (interação significativa Fe x folhas nas duas espécies). Os teores de Fe no colmo (Fig. 9 C-D) apresentaram diferenças significativas em relação ao excesso de Fe em *S. parviflora* e *P. densum*. Entretanto, apenas em *P. densum* a interação N x Fe foi significativa, onde as plantas com déficit de N apresentaram o menor teor de Fe no colmo. Em ambas as espécies, os teores de Fe nas raízes (Fig. 9 E-F), apresentaram diferença significativa apenas em relação ao efeito isolado do Fe, com maiores valores nos tratamentos com excesso de Fe (100%NEF e 0%NEF).

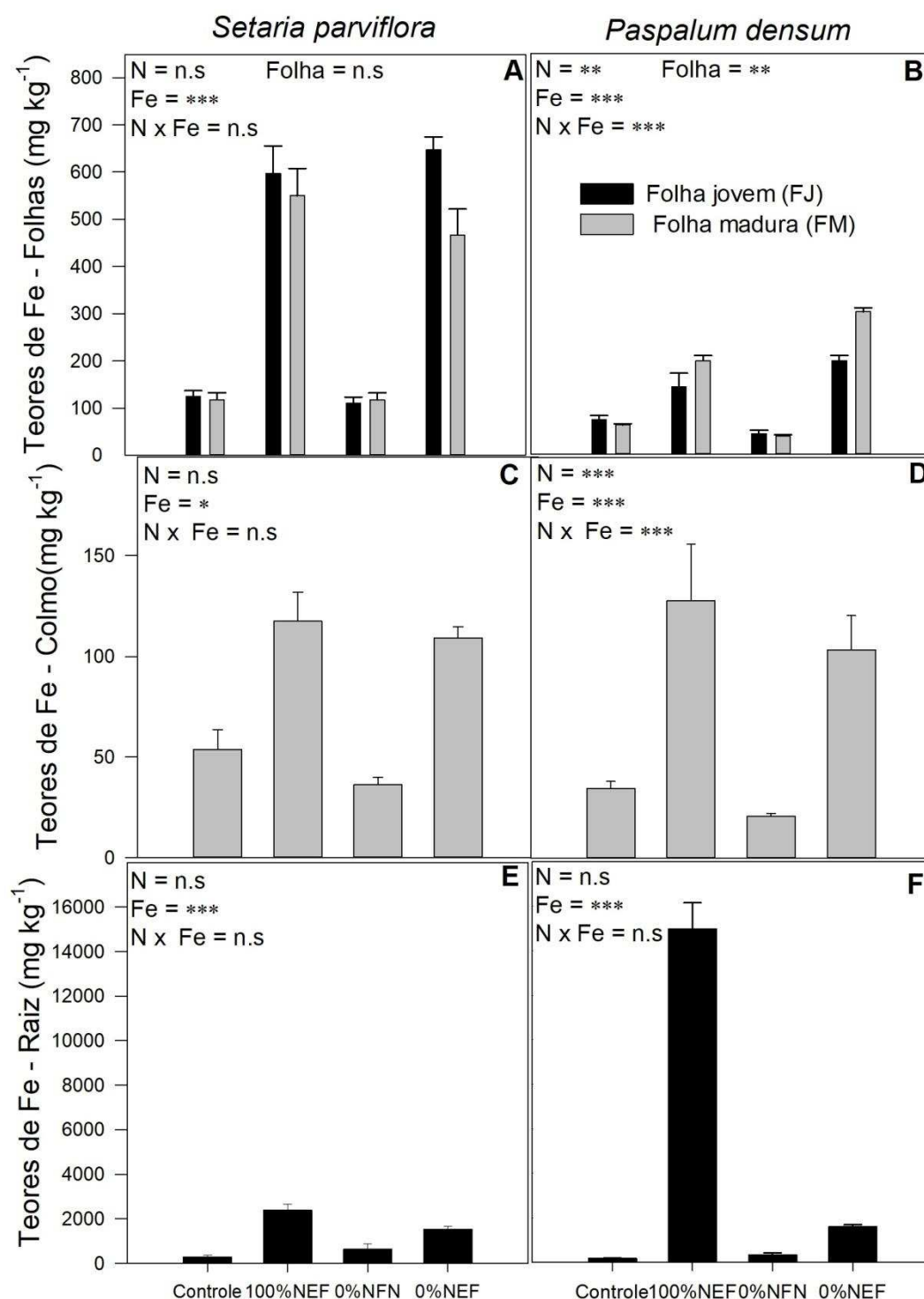


Figura 9: Teores de Fe em diferentes tecidos vegetais em *S. parviflora* (A, C, E) e *P. densum* (B, D, F) das plantas cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Na quantificação dos teores de N na placa de ferro (solução de DCB) das plantas expostas aos tratamentos, observou-se efeito significativo em função do déficit de N, excesso de Fe e na interação N x Fe apenas na espécie *P. densum* (Fig. 10 A-B), com valores significativamente menores no tratamento com déficit de N e Fe normal (0%NFN) e significativamente maiores no tratamento 100%NEF. Já com relação aos teores de Fe, observou-se diferenças significativas em função do efeito simples do Fe, do N e da interação N x Fe para *S. parviflora* (Fig. 10 A) e *P. densum*. O déficit de N na solução nutritiva influenciou a concentração de Fe na placa, uma vez que para ambas as espécies, o tratamento com excesso de Fe e N adequado apresentou valores significativamente maiores quando comparado ao tratamento com déficit N e excesso de Fe.

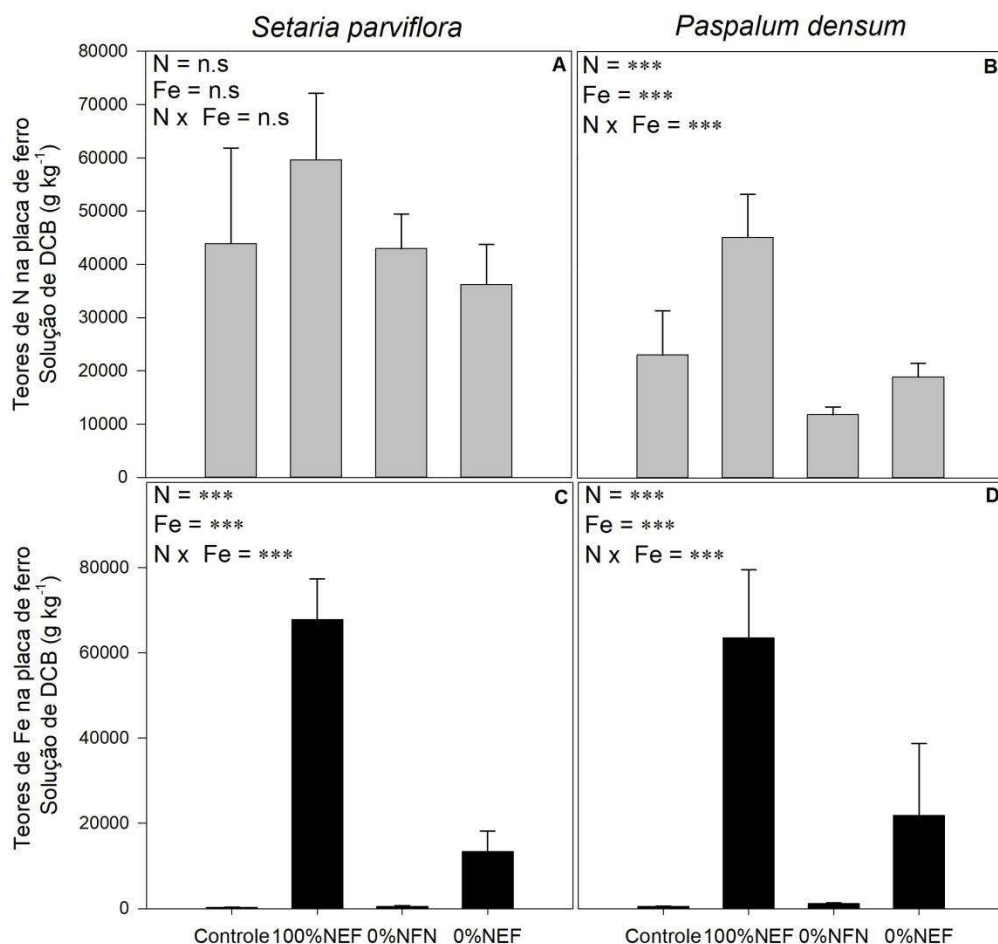


Figura 10: Teores de N e Fe na placa de ferro (solução de DCB) em *S. parviflora* (A, C) e *P. densum* (B, D) das plantas cultivadas em solução nutritiva de Hoagland (controle) e solução nutritiva modificada para déficit de N e excesso de Fe, nos tratamentos 100%NEF, 0%NFN e 0%NEF. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos através de variáveis importantes como a taxa fotossintética, transpiração, condutância estomática, clorofila total e fluorescência da clorofila *a* possibilitaram obter entendimento sobre o uso do N das duas gramíneas nativas, relacionando o déficit de N ao excesso de Fe. Os valores maiores de clorofila total observados nas plantas expostas aos tratamentos com dose ideal de N, corroboram com alguns estudos que apontam efeito positivo após aplicação de N nos teores de clorofila *a*, *b* e carotenóides em diversas espécies vegetais (Martuscello *et al.*, 2016; Kappes *et al.*, 2013; Argenta *et al.*, 2003; Soratto *et al.*, 2004). De fato, o N é um componente da molécula de clorofila, atuando na sua síntese e também na síntese de proteínas (Andrade *et al.*, 2003).

A menor taxa fotossintética nas plantas de *P. densum* em relação a *S. parviflora* quando expostas aos tratamentos com excesso de Fe e déficit de N, pode ser explicado pelo fato de que, por possuir menor número de folhas e consequentemente maior tempo de vida foliar (dados não mostrados), *P. densum* tende a ter essa diminuição a medida que a idade da folha aumenta (Hardwick *et al.*, 1968), como pode ser comprovado pelos valores significativamente maiores de *A* nas folhas jovens apenas desta espécie. Além das folhas jovens possuírem atividade metabólica maior quando comparadas às folhas mais velhas (Wójcik, 2004), estes resultados em *P. densum* também estão relacionados aos menores teores de Fe nas folhas jovens nos tratamentos com excesso deste metal, o que reduz os efeitos tóxicos sobre a fotossíntese. Segundo Chapin (1980), quando a deficiência de nutrientes prejudica ou impede o surgimento de folhas novas, a planta pode utilizar a energia armazenada nas folhas velhas. Assim, torna-se vantajoso que as plantas com menor reposição de folhas e maior remobilização de N de folhas velhas para folhas jovens, sejam utilizadas em áreas com limitada disponibilidade de nutrientes, como ocorre em áreas degradadas pela mineração de ferro.

A manutenção de altas taxas fotossintéticas e eficiência fotoquímica sob déficit de N, principalmente em *S. parviflora* pode estar relacionada ao metabolismo fotossintético C4 nas espécies estudadas. Espécies de plantas C4 apresentam maior fotossíntese por unidade de N nas folhas do que as plantas com metabolismo C3 (Sage *et al.*, 1987). Isso ocorre devido ao fato de que as plantas C4 precisam de menores concentrações da enzima rubisco, que demanda grande parte do N em plantas C3 (Brown e Wilson, 1983; Schmitt e Edwards, 1983). Além disso, uma maior eficiência do uso de nitrogênio na fotossíntese das plantas C4

pode permitir melhor utilização do N para a produção de novos tecidos (folhas, raízes e caules) (Sage *et al.*, 1987).

O aumento dos valores de F_0 nas plantas de *P. densum* submetidas ao déficit de N em concentrações normais de Fe pode ser resposta de estresse, em função da redução no conteúdo de clorofilas e indicando limitação na transferência de energia entre o complexo antena e o centro de reação, e que pode atuar também no controle da excitação do centro de reação (Bergantino *et al.*, 1995). A redução na eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) das espécies *S. parviflora* e *P. densum* nos tratamentos com excesso de Fe e de forma independente sob déficit de N, ocorreu por diferentes causas. Os efeitos do déficit de N sobre os valores de F_v/F_m são resultantes da diminuição dos teores de N foliar, impacto negativo na atividade da NR e redução no teor de clorofilas. Por outro lado, nas plantas sob o tratamento 100%NFN, não houve redução de clorofilas, evidenciada em *P. densum*, porém o incremento excessivo nos teores de Fe com a formação de H_2O_2 podem ter contribuído para a redução em F_v/F_m . Entretanto, os valores de F_v/F_m apresentados nas plantas sob déficit de N e excesso de Fe (entre 0,7 e 0,8) e a ausência de danos oxidativos (pelos valores de MDA), demonstram que os efeitos não foram severos.

O aumento nos valores de NPQ em *P. densum* está diretamente relacionado ao decréscimo no ϕ PSII. O NPQ relaciona-se à dissipação do excesso de energia de excitação que não pode ser utilizada na fotossíntese, sendo considerado um importante mecanismo de fotoproteção das plantas (Krausse e Jahns, 2004; Goss e Lepetit, 2015), o que indica uma vantagem em *P. densum*, onde o aumento de NPQ foi relacionado ao déficit de N.

Os dados de MDA e peróxido de hidrogênio evidenciaram que as duas espécies apresentaram tolerância aos estresses aplicados nos tratamentos. Em *P. densum*, por exemplo, mesmo com índices de H_2O_2 maiores nos tratamentos com déficit de N, observou-se diminuição nos valores de MDA, mostrando eficiência da planta com relação ao controle de espécies reativas de oxigênio. Já em *S. parviflora*, mesmo com os maiores valores de H_2O_2 em função do excesso de Fe, a planta não apresentou danos severos devido à toxidez de Fe. Entretanto, para *S. parviflora*, encerrou-se o experimento com 13 dias devido ao aumento de sintomas, principalmente senescência no tratamento 0%NEF, diferente de *P. densum* (20 dias) o que corrobora com os resultados de Souza (2016), que observou provável maior resistência para esta mesma espécie, com relação à formação de EROS e possíveis danos severos. Além disso, para *P. densum*, menores valores de H_2O_2 foram observados nas FJ, o que demonstra

maior possibilidade de formação de EROS nas FM. Essas diferenças entre as espécies podem estar relacionadas ao fato de teores de Fe observados estão acima do limite de toxidez (500 mg kg^{-1}) nas folhas de *S. parviflora* (Marschner, 2002).

Embora em menores taxas, a atividade de NR observada também nas plantas expostas aos tratamentos com déficit de N, foi relatada por Donato *et al.* (2004) em seus estudos com diferentes variedades de cana-de-açúcar. Já Colozza *et al.* (2000), em seu estudo com capim Aruana, evidenciaram aumento das concentrações de nitrato com aplicação das doses de N, o que corrobora com os resultados deste experimento que mostram maior atividade de NR nos tratamentos com N. Já em plantas sob baixa disponibilidade de N, a atividade da NR é rapidamente afetada (Souza e Fernandes, 2006). Queiroz Filho *et al.* (1982), evidenciaram que quando aumentadas as doses de N, ocorreu um aumento na concentração de nitrato nas dez espécies de gramíneas estudadas por eles. A NR possui atividade em outras partes da planta, como no colmo (Cazetta e Villela, 2004) e raízes (Martuscello *et al.*, 2016) de gramíneas, porém a maior atividade da NR ocorre nas folhas, sendo portanto o órgão utilizado neste estudo.

Os maiores teores de N nas folhas jovens das duas espécies ocorreu devido à remobilização do nutriente das folhas mais velhas e senescentes para as folhas jovens (Oliveira, 2015). No Capim-Aruana (*Panicum maximum*) cultivados em diferentes doses de N em solução nutritiva, também foi observado maiores concentrações de N nas folhas mais jovens, seguidas pelas folhas maduras e pelos caules (Junior *et al.* 2006).

5. CONCLUSÕES

A presença de N foi fundamental para que as espécies apresentassem melhor desempenho quanto às variáveis de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*, entretanto, a combinação entre déficit de N e excesso de Fe ocasionou decréscimo nos valores de variáveis importantes como *A*, *E* e *gs*. Mesmo com os efeitos sobre a fotossíntese em resposta ao déficit de N e excesso de Fe, as plantas não apresentaram sintomas severos, como evidenciado pelos valores de *Fv/Fm* e *MDA*.

As folhas jovens acumulam maior teor de N quando comparadas às folhas maduras, o que comprova a mobilidade do mesmo e sua contribuição com processos indispensáveis para a planta, com a fotossíntese e transpiração, principalmente em *P. densum*. A atividade de NR

foi maior nos tratamentos com interação de déficit de N e excesso de ferro quando comparada aos tratamentos com déficit e sem excesso de ferro, mostrando que mesmo nestas condições a redução de nitrato a nitrito, realizada por esta enzima, não foi prejudicada.

Tendo em vista que nas áreas mineradas é comum o déficit de nutrientes e excesso de Fe, a partir dos resultados deste estudo, sugere-se a utilização das duas gramíneas em planos de restauração ecológica em áreas de mineração.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A.C.; FONSECA, D.M.; QUEIROZ, D.S.; SALGADO, L.T. & CECON, P.R. **Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier).** Ciência e Agrotecnologia, p.1643-1651, 2003.

ARAÚJO, T. O.; FREITAS-SILVA L.; SANTANA, B. V. N.; KUKI, K. N.; PEREIRA, E. G.; AZEVEDO, A. A.; SILVA, L. C. **Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species.** Environmental Science and Pollution Research, v. 21, p. 2777-2784, 2014.

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; FOSTHOFER, E.L.; STRIEDER, M.L.; SUHRE, E.; TEICHMANN, L.L. **Adubação nitrogenada em milho pelo monitoramento do nível de nitrogênio na planta por meio do clorofilômetro.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 27:109-119, 2003.

BERGANTINO, E.; DAINESE, P.; CEROVIC, Z.; SECHI, S.; BASSI, R. **A posttranslational modification of the photosystem II subunit CP29 protects maize from cold stress.** The Journal of Biological Chemistry, v. 270, n. 15, p. 8474-8481, 1995.

BILGER, W.; BJÖRKMAN, O. **Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*.** Photosynthesis Research, v. 25, p. 173-185, 1990.

BROADLEY, M; BROWN, P; CAKMAK, I; RENGEL, Z; ZHAO, F. **Function of nutrients: Micronutrients.** Marschner, P. (Ed). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press, San Diego, p. 191-248, 2012.

BROWN R.H, WILSON, J. R. **Nitrogen response of *Panicum* species differing in CO₂ fixation pathways. II. CO₂ exchange characteristics.** Crop Science, 23: 1154-1159, 1983.

CAZETTA, J.O.; VILELLA, L.C.V. **Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans*).** Scientia Agricola, 61: 640-648, 2004.

CHAPIN, F. S. III. **The mineral nutrition of wild plants.** Annual review of ecology and systematic, v. 11 p. 233-260, 1980.

COLOZZA, M. T.; KIEHL, J. D. C.; JOAQUIM CARLOS WERNER, J. C. W.; SCHAMMASS, E. A. **Respostas de *Panicum maximum* cultivar aruana a doses de nitrogênio.** Boletim de Indústria Animal, v.57, n.1, p.21-32, 2000.

DONATO, V. M. T. S. *et al.* **Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.39, n.11, p.1087-1093, 2004.

FRANCO, A. A. *et al.* **Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida no solo: um modelo tecnológico.** Oecologia Brasiliensis, v.1, p.459-467, 1995.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J. M., BAKER, N. R. **The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence.** Biochimica et Biophysica Acta, 990: 87-92, 1989.

GOSS, R., & LEPETIT, B. **Biodiversity of NPQ.** Journal of plant physiology, 172, 13-32, 2015.

HARDWICK, K. *et al.* New Phytol. 67: 79-86, 1968.

HOAGLAND D. R.; ARNON D. I. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkeley, CA: Agricultural Experiment Station, Univ. of California. (Circ. 347), 1950.

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. **Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds.** Planta, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

JAWORSKI, E. G. **Nitrate reductase assay in intact plant tissues.** Biochemical and Biophysical Research Communications 43:1274- 1279, 1971.

JUNIOR, J. L.; MONTEIRO, F. A. **Diagnose nutricional de nitrogênio no capim-aruaana em condições controladas.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, 30:829-837, 2006.

KAPPES, C.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. **Produtividade do milho em condições de diferentes manejos do solo e de doses de nitrogênio.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 37, n. 5, p. 1310-1321, 2013.

KJELDAHL, J. **Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen. Körpern,** Z. Analytical Chemistry, v. 22, p. 366-382, 1883.

KOPPE, J. C. **A lavra e a indústria mineral - estado da arte e tendências tecnológicas.** In: Tendências tecnológicas Brasil 2015; geociências e tecnologia mineral. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p.86-107, 2007.

KRAUSE GH, JAHNS P. **Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching. Characterization and function.** In: Papageorgiou G. C, Govindjee, editors. Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis. Springer; p. 463–95, 2004.

MAITI, S. K.; MAITI, D. **Ecological restoration of waste dumps by topsoil blanketing, coir-matting and seeding with grass-legume mixture.** Ecological Engineering. 77, 74-84, 2015.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de; **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** Potafos, p. 201, 1989.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** London: Academic, 889 p., 2002.

MARTUSCELLO, J. A.; MAJEROWICZ, N.; DA CUNHA, D. N. F. V.; DE AMORIM, P. L.; BRAZ, T. G. S. **Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada.** Archivos Zootecnia. 65 (252): 565-570, 2016.

MELIS, A.; SPANGFORT, M.; ANDERSSON, B. **Light-absorption and electron transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts.** Photochemistry and Photobiology, v. 45, p. 129-136, 1987.

MENGEL, K. & KIRKBY, E. **Principles of plant nutrition.** 5. ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 849, 2001.

NEVES, N. R.; OLIVA, M. A.; CENTENO, D. C.; COSTA, A. C.; RIBAS, R. F.; PEREIRA, E. G. **Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: Potential use in environmental risk assessment.** Science Total Environment, v. 407, p. 3740-3745, 2009.

OLIVEIRA, L. B. D. **Crescimento e uso de nitrogênio e fósforo de quatro gramíneas nativas do rio grande do sul.** Universidade Federal de Santa Maria (Tese de doutorado), RS, 2015.

PEREIRA, E. G., OLIVA, M. A., SIQUEIRA-SILVA, A. I., ROSADO-SOUZA, L., PINHEIRO, D. T., & ALMEIDA, A. M. **Tropical rice cultivars from lowland and upland cropping systems differ in iron plaque formation.** Journal of plant nutrition, 37 (9), 1373-1394, 2014.

PURCINO, A. A. C.; MAGNAVACA, R.; MACHADO, A. T. **Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Londrina, v. 6, n. 1, p. 41-46, 1994.

QUEIROZ FILHO, J.L.; SAIBRO, J.C.; RIBOLDI, J. **Efeito do nitrogênio e dos regimes de corte sobre o acúmulo de nitrato em gramíneas forrageiras perenes de produção estival.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.11, p.734-745, 1982.

RIOS, C. O.; SOUZA, B. C.; SIQUEIRA-SILVA, A. I.; PEREIRA, E. G. **Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetation of mined areas.** Polish Journal of Environmental Studies, 2017.

SAGE, R. F.; PEARCY, R. W. **The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. I. Leaf nitrogen, growth, and biomass partitioning in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.).** Plant Physiology, Rockville, v. 84, n. 3, p. 954-958, 1987.

SAGE, R. F. 2004. **The evolution of C4 photosynthesis.** New Phytologist, 161, 341–370.

SCHMITT, M. R., EDWARDS, G. E. **Photosynthetic capacity and nitrogen use efficiency of maize, wheat, and rice: a comparison between C3 and C4 photosynthesis.** Journal of Experimental Botany, 32: 459-466, 1981.

SIQUEIRA-SILVA, ADVANIO INÁCIO; RIOS, CAMILLA OLIVEIRA; PEREIRA, EDUARDO GUSMÃO. **Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers.** Journal of Environmental Sciences, v. 78, p. 257-266, 2019.

SORATTO, R. P.; CARVALHO, M. A. C. e ARF, O. **Teor de clorofila e produtividade do feijoeiro em razão da adubação nitrogenada.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39: 895-901, 2004.

SOUZA, A. E. D. **Respostas morfofisiológicas em plantas expostas à estressores abióticos decorrentes da exploração de minério de ferro.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Florestal, MG, 2016.

TAYLOR, G. J.; CROWDER, A. A. **Use of the DCB technique for extraction of hydrous iron oxides from roots of wetland plants.** American Journal of Botany, v. 70, n. 8, p. 1254-1257, 1983.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. **Oxidative stress and some antioxidante system in acid rain treated bean plants: Protective role of exogenous polyammines.** Plant Science. 151, 59–66, 2000.

WÓJCIK, P. **Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization.** Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, v. 12, 210-218, 2004.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. **Competition among species of plants - a review.** Revista da FZVA. v. 11, n. 1, p. 10-30, 2004.

ZHANG X, ZHANG F, MAO D. **Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake.** Plant Soil 209:187-192, 1999.

CAPÍTULO II

ESTABELECIMENTO DE DUAS GRAMÍNEAS NATIVAS EM ÁREA DE PILHA DE ESTÉRIL DE MINERAÇÃO DE FERRO COM APLICAÇÃO DE DOSES DE MATÉRIA ORGÂNICA (CAMA DE FRANGO)

RESUMO

Grande parte das atividades das mineradoras degrada o ambiente e geram quantidades significativas de rejeitos, contribuindo significativamente para diversos distúrbios nas áreas onde são executadas. Nas áreas degradadas por mineração de ferro, por exemplo, além da maior concentração de metais, é notória a menor concentração de matéria orgânica e nutrientes importantes para os vegetais. Buscando amenizar os impactos, é promissor o uso das gramíneas C4 nativas, *Setaria parviflora* e *Paspalum densum*, cuja resistência às altas concentrações de Fe já foi comprovada. Este trabalho tem como objetivo avaliar as respostas fotossintéticas, nutricionais e acúmulo de biomassa em duas espécies de gramíneas em área de pilha de estéril de mineração de Fe, onde foram utilizadas 5 doses de matéria orgânica (MO) (0, 10, 20, 40 e 80 t ha⁻¹). Para cada espécie, 20 quadrantes foram delimitados, com 4 repetições. As medições de variáveis fisiológicas como fluorescência da clorofila *a* e os teores de clorofila foram obtidas mensalmente, além disso, para as demais análises fotossintéticas e nutricionais realizou-se coleta de indivíduos e do substrato na estação chuvosa - EC (janeiro 2018) e na estação seca - ES (julho 2018). Durante a estação seca, houve decréscimo nos valores de Fv/Fm, ETR e nos índices de clorofila total para ambas as espécies. A maior concentração de prolina na ES em *P. densum*, evidenciou a resposta positiva da espécie à menor disponibilidade de água no substrato. *S. parviflora* apresentou maior teor de prolina na estação chuvosa, o que influenciou, por exemplo, na atividade da NR. As maiores doses de cama de frango aplicadas (40 e 80 t ha⁻¹) contribuíram para o maior incremento de biomassa nas duas espécies, sendo principalmente das raízes em *S. parviflora* e parte aérea em *P. densum*. As espécies se mostraram resistentes às condições abióticas da pilha de estéril, como déficit hídrico sazonal e presença de metais como o ferro, com respostas satisfatórias à aplicação das maiores dosagens de cama de frango. A dose de 40 t ha⁻¹ seria a mais indicada para utilização em planos de restauração ecológica, por apresentar uma quantidade menor de cama de frango, resultados semelhantes à dose de 80 t ha⁻¹ e por ter influenciado

positivamente o incremento de nutrientes importantes (N, K, Mg, Zn, Ca, por exemplo) nos tecidos vegetais e no substrato. As duas espécies estudadas possuem potencial para utilização em planos de reabilitação de áreas degradadas por mineração.

Palavras chave: Restauração ecológica, adubação orgânica, nutrientes, áreas impactadas por mineração.

ESTABLISHMENT OF TWO NATIVE GRASS SPECIES ON IRON-MINING STERILE WASET AREA UPON APPLICATION OF DOSES OF ORGANIC MATTER (CHICKEN MANURE)

ABSTRACT

Much of mining activity degrades the environment and generates significant amounts of tailings, contributing significantly to various disturbances in the areas where they are run. In areas degraded by iron mining, for example, in addition to the higher concentration of metals, the lowest concentration of organic matter and important nutrients for plants is noticeable. Aiming to mitigate the impacts, the use of native C4 grasses, *Setaria parviflora* and *Paspalum densum*, whose resistance to high Fe concentrations has already been proven, is promising. The objective of this work is to evaluate photosynthetic, nutritional and biomass accumulation responses in two grass species in an area of Fe mining barren piles, where 5 doses of organic matter (MO) were used (0, 10, 20, 40 and 80 t ha⁻¹). For each species, 20 quadrants were delimited, with 4 repetitions. The measurements of physiological variables such as chlorophyll fluorescence and chlorophyll contents were obtained monthly. In addition, for the other photosynthetic and nutritional analyzes, individuals and substrate were collected in the rainy season - EC (January 2018) and in the dry season - ES (July 2018). During the dry season, there was a decrease in Fv/Fm, ETR and total chlorophyll indices for both species. The higher proline concentration in ES in *P. densum* evidenced the positive response of the species to the lower water availability in the substrate. *S. parviflora* presented higher proline content in the rainy season, which influenced, for example, the activity of NR. The highest doses of chicken litter applied (40 and 80 t ha⁻¹) contributed to the highest biomass increase in both species, mainly from roots in *S. parviflora* and shoot in *P. densum*. The species were resistant to the abiotic conditions of the barren pile, such as seasonal water deficit and the presence of metals such as iron, with satisfactory responses to the application of higher chicken litter dosages. The 40 t ha⁻¹ dose would be the most suitable for use in ecological restoration plans, as it has a smaller amount of chicken litter, similar results to the 80 t ha⁻¹ dose and for having positively influenced the increase of important nutrients. (N, K, Mg, Zn,

Ca, for example) in plant tissues and substrate. Both species have potential for use in rehabilitation plans of degraded areas by mining.

Key words: Ecological restoration, organic fertilization, nutrients, areas impacted by mining.

1 INTRODUÇÃO

Os planos de restauração de áreas degradadas são indispensáveis para a recuperação de ecossistemas, visando minimizar os impactos causados por diversas atividades. As áreas de mineração, por exemplo, causam uma série de distúrbios no ambiente. Além das áreas de extração, os rejeitos e estéreis podem ser caracterizados como causadores de grande impacto no ambiente, principalmente pelo fato do grande volume gerado e a necessidade de locais para o armazenamento dos mesmos (Fernandes e Santos, 2008).

Visando minimizar as consequências da degradação ambiental causada pelas atividades de mineração, foram criadas legislações estabelecendo a obrigatoriedade da recuperação de áreas degradadas (artigo 225 da Constituição Federal). Além disso, o decreto de número 97.632 (10 de abril de 1989) tornou uma obrigação à apresentação de um Plano de Recuperação de Áreas Degradadas (PRAD). Neste contexto, as empresas têm buscado metodologias eficientes para o cumprimento da legislação ambiente vigente. Entretanto, algumas limitações podem diminuir a eficiência dos planos de reabilitação nas áreas de mineração e de armazenamento de rejeitos, visto que nestes ambientes é comum o baixo teor de nutrientes, matéria orgânica escassa, menor retenção de água, solo com maior densidade, entre outros (Dias *et al.*, 2007). Aumentar a quantidade de matéria orgânica nos substratos provenientes de atividades de mineração pode contribuir para a revegetação dos mesmos (Corrêa, 2005). A inserção de matéria orgânica nos ambientes degradados por mineradoras pode suprir a demanda nutricional das espécies promissoras para restauração dessas áreas.

Alguns estudos vêm testando a cama de frango como alternativa para incremento da quantidade de nutrientes no solo (Mello e Vitti, 2002; Moraes, 2006). O uso deste tipo de matéria orgânica pode ser justificado pelo seu baixo custo, alto teor de nutrientes (principalmente N) (Moraes, 2006), além de que o mesmo poderá ser reaproveitado, evitando seu descarte.

Além do melhoramento das condições nutricionais do substrato a ser revegetado, o uso de espécies com resistência ao excesso de Fe, como as gramíneas nativas *S. parviflora* e *P. densum* (Araújo *et al.*, 2014; Rios *et al.*, 2017; Siqueira-Silva *et al.*, 2019), pode ser fundamental para o sucesso dos planos de reabilitação de áreas degradadas por mineração, uma vez que, por serem resistentes, podem contribuir com a fertilidade a longo prazo, a partir da ciclagem de nutrientes (Fageria *et al.*, 1991). Desta forma, a dose ideal de cama de frango

aplicada em pilha de estéril da mineração de ferro, além de contribuir para o aumento dos teores de nutrientes do substrato, contribuirá também para maior crescimento dessas duas espécies no processo de reabilitação das áreas degradadas.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas e nutricionais de *S. parviflora* e *P. densum* em área de pilha de estéril de mineração de ferro, buscando testar a utilização de cama de frango em diferentes doses para melhorar as concentrações de nutrientes nessas áreas.

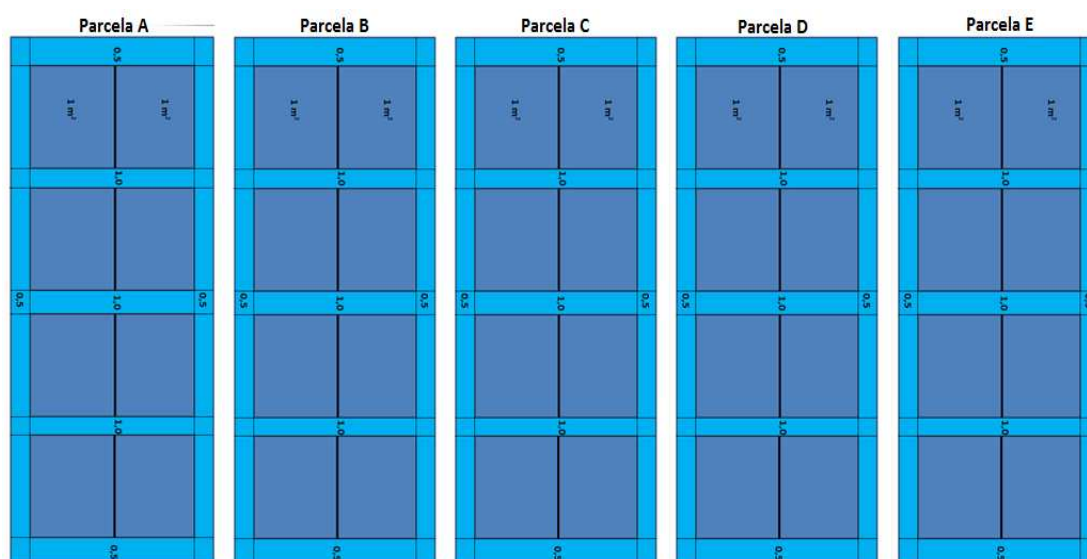
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo e montagem do experimento

O experimento foi realizado na mina Retiro das Almas, localizada entre as cidades de Congonhas e Ouro Preto, Minas Gerais (20°25'12,6'' S e 43° 52' 53'' W). A mina encontra-se desativada a cerca de dez anos e pertence à empresa VALE S.A. As parcelas experimentais foram montadas em área de pilha de estéril, região relativamente próxima a cava e onde eram depositados os rejeitos provenientes da extração quando a mina estava em funcionamento.

Em janeiro de 2017 foram delimitadas cinco parcelas subdivididas em quatro quadrantes com 2 m² cada, com bordas laterais de 0,5 m, totalizando uma área total de 28 m² (Fig. 1). Cada quadrante foi dividido ao meio, onde se disponibilizou para cada uma das espécies uma área de 1 m² por quadrante.

Figura 1 - Esquema experimental em campo, apresentando as cinco parcelas (A,B,C,D,E) com os quatro quadrantes divididos ao meio em cada uma delas e suas respectivas bordas.



Após a montagem dos quadrantes, foram aplicadas no início de fevereiro de 2017 cinco doses de cama de frango: 0 (sem adição de cama de frango), 10, 20, 40 e 80 t ha⁻¹. O cálculo da quantidade de cama de frango em cada dose foi proveniente de experimento anterior em casa de vegetação. A cama de frango utilizada foi proveniente de estoque da UFV - *Campus* Florestal. As análises químicas de N, K, Mg, Ca, Carbono (CO), pH em água, matéria orgânica (MO) e acidez total (AT) da cama de frango foram realizadas no laboratório de solos da mesma instituição seguindo protocolos da EMBRAPA (2017). Os resultados estão presentes na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Análise química da cama de frango utilizada no experimento.

Característica	Teor
N (dag/kg)	13,73
Ca (mg dm ⁻³)	7,04
Mg (mg dm ⁻³)	8,46
P (mg dm ⁻³)	6413,74
K (mg dm ⁻³)	7041,23
AT (cmol/dm ³)	3,30
MO (dag kg ⁻¹)	22,03
CO (%)	12,78
pH	6,76

A aplicação das respectivas doses de cama de frango foi feita por meio de sorteio para determinar em qual quadrante as mesmas seriam aplicadas. Em cada quadrante, uma única dosagem foi aplicada para as duas espécies. No momento da aplicação dentro dos quadrantes o substrato foi revolvido em aproximadamente 15 cm de profundidade, buscando deixar o mesmo homogêneo.

Com o substrato pronto, as sementes das duas espécies, provenientes de plantas matrizes localizadas no *campus* UFV - Florestal, e com lotes variando entre os anos de 2015 e 2016, foram semeadas em cada quadrante/borda na densidade de 40 kg por hectare. O semeio, realizado em fevereiro de 2017, foi feito em canaletas com distância de 10 cm entre as mesmas e profundidade de cerca de 1 cm.

Para monitoramento dos dados climáticos, foi utilizado o banco de dados das estações automáticas do INMET, obtidos da estação mais próxima da área de estudo (Ouro Branco -

MG) e disponibilizados no site do instituto (www.inmet.gov.br). Na figura 2, encontram-se as médias de temperatura, umidade e precipitação referentes ao período deste estudo.

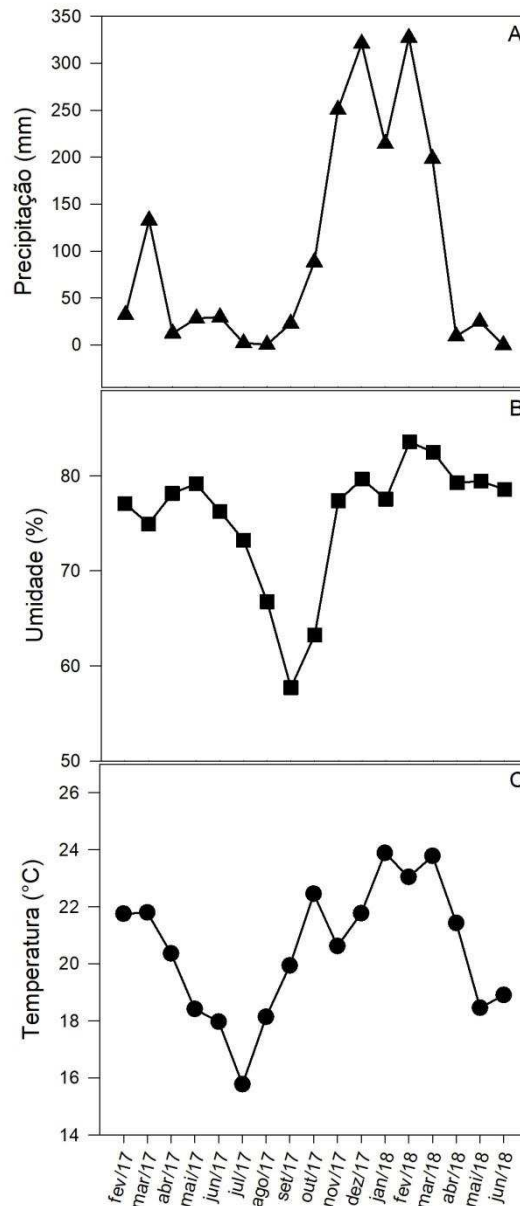


Figura 2: Dados com a soma mensal de precipitação (mm) (A), média mensal de umidade (%) (B) e média mensal de temperatura (°C) (C) ao longo do experimento de campo, entre os meses de fevereiro (2017) a junho (2018).

2.2 Variáveis avaliadas

Índice de clorofila e fluorescência da clorofila *a*

Posteriormente à montagem e semeio, foram realizadas visitas mensais para monitoramento e acompanhamento do crescimento das plantas. E após aproximadamente 150 dias do semeio, em julho de 2017, quando as mesmas apresentaram área foliar suficiente, foram feitas medições da fluorescência da clorofila *a* e índices de clorofila, utilizando os equipamentos Mini-Pam (Heinz Walz, Effeltrich, Germany) e Clorofilog (Falker, Porto Alegre, Brasil), respectivamente, conforme descrição a seguir.

As medições de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas a cada visita mensal, em folhas de dois indivíduos diferentes em cada quadrante. Buscavam-se indivíduos com folhas totalmente expandidas e que representassem a parcela. Assim, dois blocos de medições de F_0 e F_v/F_m eram realizados a cada visita, para posterior cálculo da média entre eles. Tais medições ocorriam no período de 9 às 13 horas, de acordo com a descrição das mesmas no capítulo 1.

Após as medições de fluorescência da clorofila *a*, foram realizadas as medições do índice de clorofila com o ClorofiLOG (Falker, Brasil). As medições ocorreram conforme descrito no capítulo 1.

Além do monitoramento mensal dos índices de clorofila, F_0 e F_v/F_m como descritas acima, foram realizadas duas coletas, uma na estação chuvosa (janeiro/2018) e outra na estação seca (julho/2018). Nestas coletas, avaliou-se também a taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e o coeficiente de extinção não fotoquímico (NPQ), conforme descritos no capítulo 1. Além disso, foram coletados material vegetal de um indivíduo de cada espécie e de cada quadrante, para os seguintes procedimentos:

Nitrato Redutase (NR)

Nas estações chuvosa e seca por volta das 14 horas, foram coletadas seis folhas de um indivíduo de *S. parviflora* e duas folhas de um indivíduo de *P. densum* em cada quadrante. As folhas foram envoltas em papel toalha umedecido com água deionizada, colocadas em pequenos sacos plásticos identificados e armazenadas em caixa de isopor com gelo até a chegada no laboratório. O teste da NR foi feito imediatamente após a chegada ao laboratório

(aproximadamente quatro horas após a coleta do material), seguindo o protocolo de Jaworski (1971), conforme adequações informadas dos experimentos em casa de vegetação do Cap. 1.

Prolina

Foram coletadas seis folhas de cada indivíduo de *S. parviflora* e duas folhas de cada indivíduo de *P. densum* em cada quadrante, no período chuvoso e seco. Após a coleta, ainda no campo, as folhas foram lavadas, embaladas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido.

As análises de prolina foram realizadas segundo o método de Bates *et al.* (1973). Inicialmente pesou-se 0,1g de folhas, macerou-se com nitrogênio líquido e adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfossalicílico 3%. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 12.000g a 25°C. O sobrenadante foi coletado e o processo de extração foi repetido. Em 1 mL do sobrenadante, adicionou-se 1 mL de ninidrina ácida e 1 mL de ácido acético glacial. Em seguida, colocou-se os tubos em banho maria a 100°C por 1 hora. Após este período, os tubos foram resfriados em gelo. Adicionou-se 2 mL de tolueno, agitou-se em vórtex e deixou os tubos por 30 minutos em temperatura ambiente para a formação de duas fases. Retirou-se a fase aquosa superior para leitura em espectrofotômetro a 520 nm. Para calcular as concentrações de prolina, utilizou-se os valores referentes a curva padrão a partir de concentrações conhecidas de prolina.

Teor relativo de água (TRA) nas folhas

Em cada estação, foram coletadas 6 folhas de cada indivíduo de *S. parviflora* e 2 folhas de cada indivíduo de *P. densum* por quadrante. As folhas foram coletadas por volta das 14 horas, e armazenadas da mesma forma descrita acima para as análises de NR. No laboratório, todas as folhas de cada quadrante/espécie foram divididas em partes menores e pesadas imediatamente para determinação da massa fresca (MF), em seguida foram imersas em água deionizada e colocadas na geladeira por 24 horas para posterior determinação da massa túrgida (MT). Após este período, obteve-se a massa seca (MS), colocando as amostras na estufa a 65° por 24 horas. O TRA foi calculado de acordo com a equação: $TRA = 100 * [(MF - MS) / (MT - MS)]$.

Teor de umidade do substrato

Em cada uma das estações, foi coletada uma porção do substrato de cada um dos quadrantes e armazenados em cápsula de alumínio com tampa (20 ml). No laboratório, as amostras foram pesadas e transferidas para estufa (105°C) por 48 horas, em seguida, foram pesadas novamente. Calculou-se, a partir das diferenças entre a massa seca (MS) e a massa úmida (UM), a umidade do substrato, usando a seguinte fórmula: Umidade do substrato (%) = $100 * [(MU/MS) / MS]$.

Análises químicas do substrato

Em cada estação, foram coletadas porções de substrato de cada um dos quadrantes e armazenados em sacos de papel devidamente identificados. As análises do substrato (N, K, Al, Mg, Ca, Carbono, pH em água, matéria orgânica e acidez potencial) foram realizadas no laboratório de solos da Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Florestal, seguindo os protocolos da EMBRAPA (2017). Já a determinação de Fe, Mn, Zn (Jackson, 1958) foi feita no laboratório de Análises de Solos e Tecido Vegetal da Universidade Federal de Viçosa – *Campus* Viçosa.

Quantificação de macro/micronutrientes, metais pesados e massa seca dos tecidos vegetais

Em cada estação, coletou-se um indivíduo de cada espécie em cada quadrante, que foram identificados, cobertos com papel toalha, umedecidos com água deionizada e armazenados em bandejas. No laboratório, separou-se as raízes da parte aérea. A parte aérea foi dividida em colmo e folhas, lavadas com água deionizada e secadas com papel toalha, sendo colocadas em embalagens de papel para obtenção de massa seca.

As raízes foram lavadas em água corrente para remoção do material particulado aderido. Uma porção de cada raiz foi colocada em frascos de vidro, devidamente identificados e contendo solução de ditionito de sódio, citrato de sódio e bicarbonato de sódio (DCB), agitadas por 50 minutos, seguindo o mesmo protocolo descrito no capítulo 1. Em seguida, as raízes foram retiradas dos frascos, secas com papel toalha e transferidas para embalagens de papel para obtenção da massa seca.

Os tecidos vegetais foram colocados em estufa a 65°C, em seguida, as mesmas foram pesadas e utilizadas para quantificação de macro e micronutrientes (exceto B) e metais pesados (Cr, Cd e Pb) no laboratório de Análises de Solos e Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Viçosa – *Campus Viçosa*, seguindo os mesmos protocolos descritos no capítulo 1.

2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental consistiu em cinco doses de cama de frango com quatro repetições para cada espécie (*S. parviflora* e *P. densum*), totalizando 40 quadrantes divididos nas 5 parcelas, sendo utilizado arranjo fatorial triplo, levando em consideração os fatores tempo x dose x espécie (clorofila total, F_0 e F_v/F_m) e os fatores dose x espécie x estação para os demais índices avaliados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a teste de média (Tukey $P < 0,05$), utilizando os programas estatísticos STATISTIC e SAEG.

3. RESULTADOS

Os dados de clorofila totais obtidos ao longo do período de crescimento das gramíneas (avaliados entre julho de 2017 e julho de 2018) apresentaram diferença significativa com relação ao tempo, às diferentes doses de matéria orgânica usada em relação às espécies e à interação tempo x espécie. Os maiores valores de clorofila foram observados em *Setaria parviflora* nos meses de julho a outubro de 2017 (principalmente na dose 80 t ha⁻¹) e em julho de 2018 (Fig. 3 A), para esta espécie, observou-se diferença significativa apenas com relação ao tempo. Já a espécie *P. densum* apresentou diferença significativa para o tempo e para as doses (Fig. 3B), além disso, apresentaram maiores índices de clorofila quando expostas às doses de 40 e 80 t ha⁻¹ entre os meses de agosto a dezembro (2017), em relação às plantas da dose 0 t ha⁻¹. Posteriormente houve decréscimo nos valores de clorofila, o que também foi observado nas demais doses.

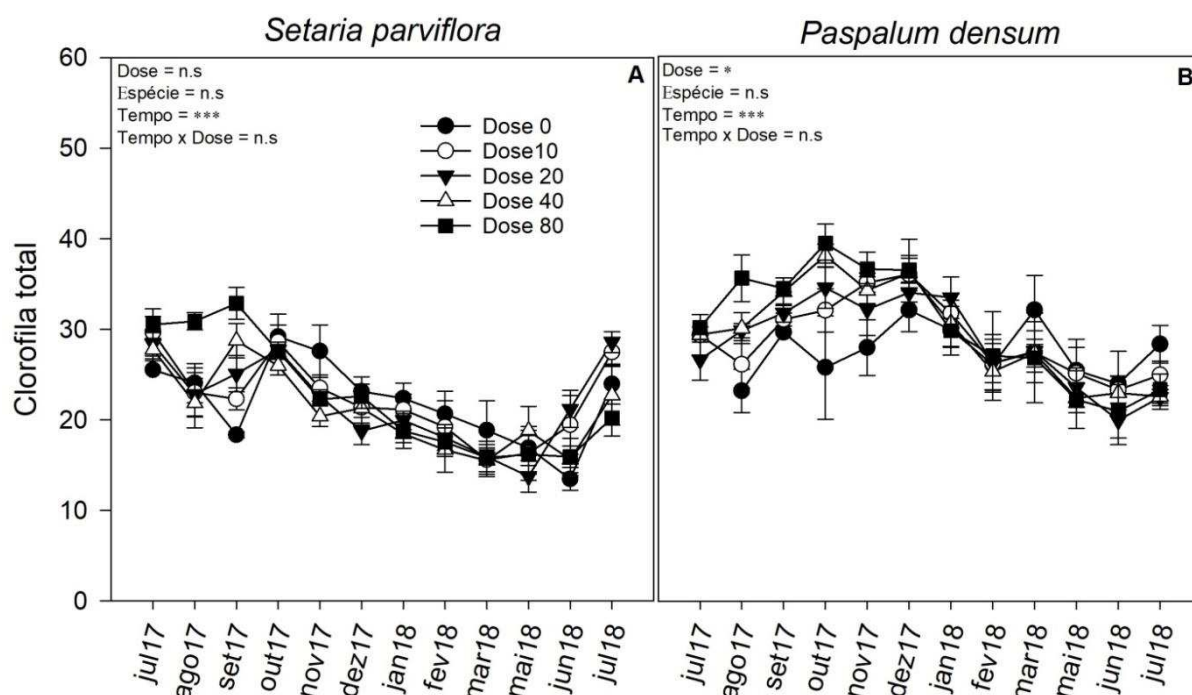


Figura 3: Índices de clorofila em *S. parviflora* (A) e *P. densum* (B) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de diferentes doses de MO no período de julho de 2017 a julho de 2018. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Os valores de eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) apresentaram efeitos significativos da interação entre tempo x espécie e na interação tripla entre tempo x espécie x dose. Em *S. parviflora*, observou-se decréscimo significativo entre os meses de março a maio (2018), com diferença significativa entre a dose controle (0 t ha^{-1}) com as doses 10, 20, 40 e 80 t ha^{-1} , em função da senescência foliar (Fig. 4 A). Já *P. densum*, apresentou valores próximos entre as dosagens durante todo o período (Fig. 4 B). A fluorescência inicial (F_0) apresentou efeito significativo para o tempo e nas interações tempo x espécie, espécie x dose e tempo x espécie x dose. Em março de 2018 houve aumento significativo de F_0 em *S.*

parviflora nas doses de 10 e 20 t ha⁻¹, em relação às demais doses de matéria orgânica. Enquanto em abril, valores significativamente maiores do que aqueles das plantas controle foram observados nas plantas da dose de 80 t ha⁻¹ (Fig. 4 C). Em *P. densum*, houve aumento significativo de F₀ entre os meses de agosto a outubro (Fig. 4 D).

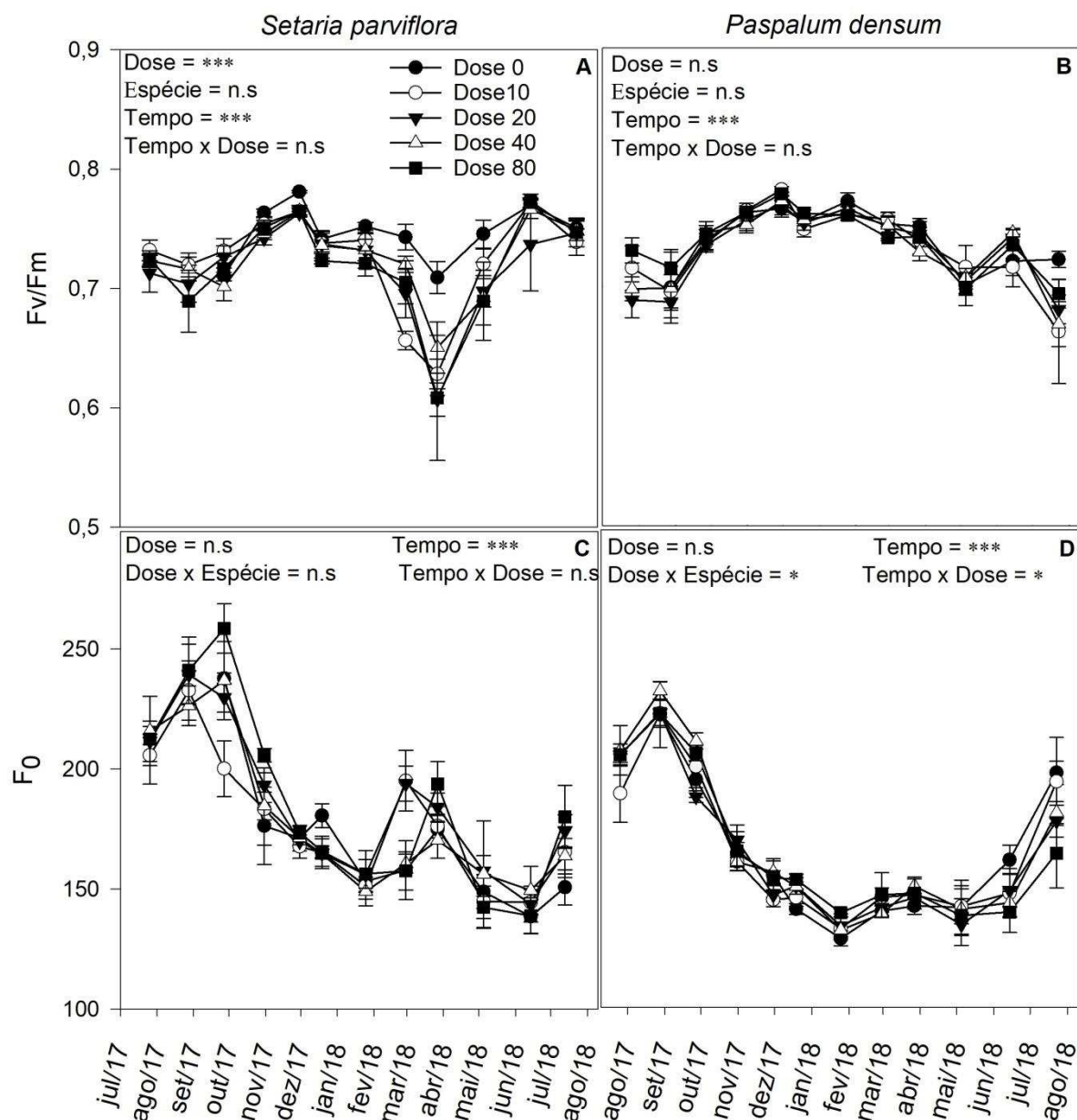


Figura 4: Índices de Fv/FM e F₀ em *S. parviflora* (A, C) e *P. densum* (B, D) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de diferentes doses de MO no período de julho de 2017 a julho de 2018. As barras mostram as médias ± erro padrão das cinco repetições de cada

experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo $*$ = $p < 0,05$; $**$ = $p < 0,01$ e $***$ = $p < 0,001$.

Com relação ao NPQ, observou-se diferença significativa entre as espécies, espécie x estação; espécie x estação x dose. Em *S. parviflora* (Fig. 5 A), não houve efeitos significativos dos fatores analisados nos valores de NPQ. Já em *P. densum*, observou-se diferença significativa, sendo que a dose 20 t ha⁻¹ apresentou valores significativamente maiores na estação seca, enquanto que nas doses de 40 t ha⁻¹ e 80 t ha⁻¹, ocorreu maiores valores na chuvosa (Fig. 5 B). Os dados de ETR apresentaram diferença significativa entre as estações, espécies e na interação entre espécie x estação. As duas espécies apresentaram diferença significativa apenas com relação à estação, sendo que na estação chuvosa apresentaram valores significativamente maiores (Fig. 5 C, D). *P. densum* apresentou valores de ETR significativamente maiores do que *S. parviflora* nas estações chuvosa e seca.

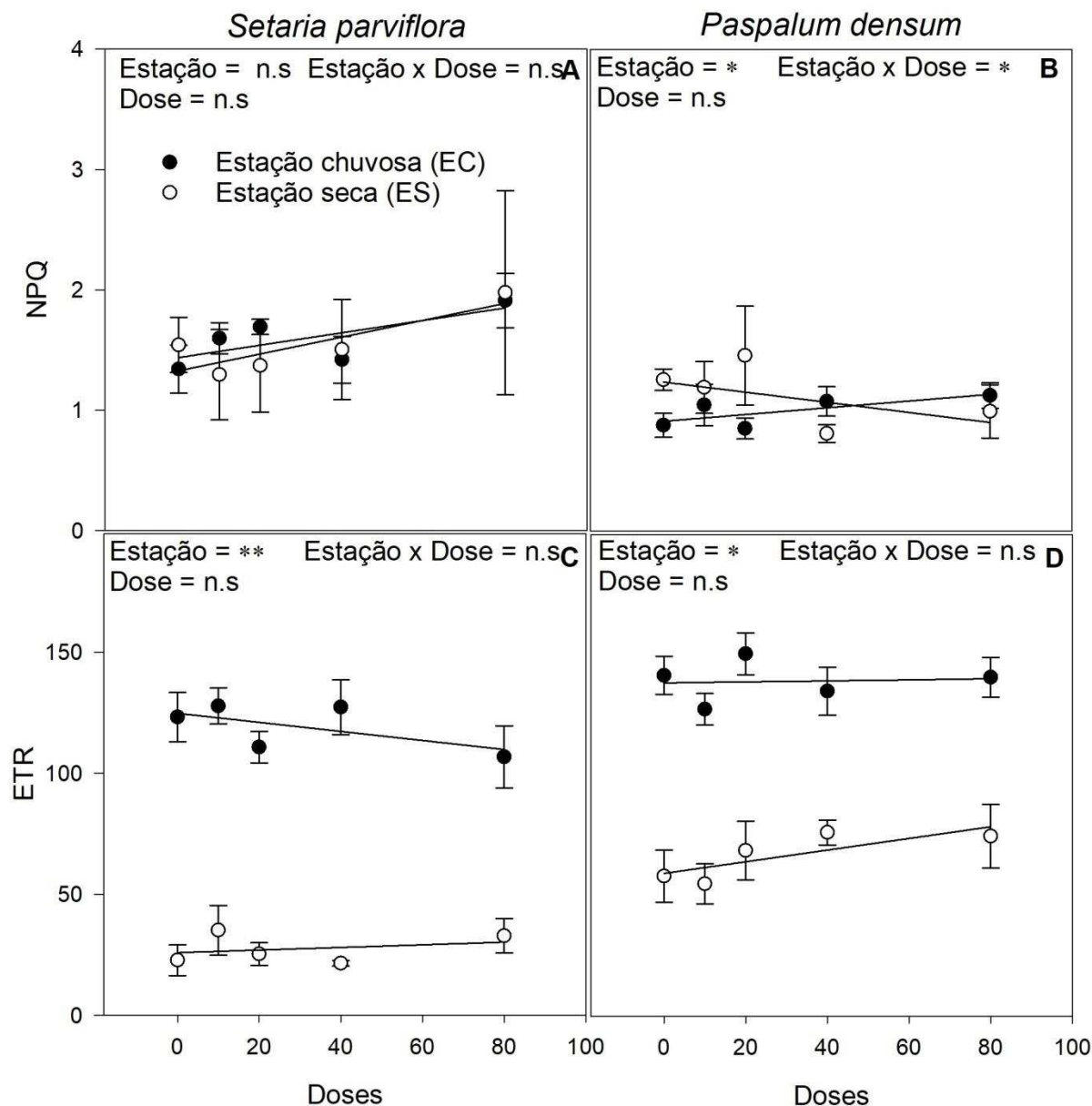


Figura 5: Valores de quenching não fotoquímico (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR) na estação chuvosa e seca em *S. parviflora* (A) e *P. densum* (B) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de doses crescentes de MO (0, 10, 20, 40 e 80). As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

A atividade da nitrato redutase (NR) apresentou diferença significativa em relação aos efeitos isolados de espécie e à interação estação x espécie. Em *S. parviflora*, observou-se os maiores valores, com valores significativamente menores na estação seca. *P. densum* não apresentou nenhuma diferença significativa (Fig. 6 A-B).

A quantificação dos teores de N na parte aérea apontou diferença significativa na interação entre espécie x dose e estação x espécie x dose. Em *S. parviflora*, as menores doses

(0 e 10) apresentaram maior teor de N na parte aérea (Fig. 4 C). Em *P. densum*, observou-se maiores valores para a estação chuvosa (Fig. 4 D).

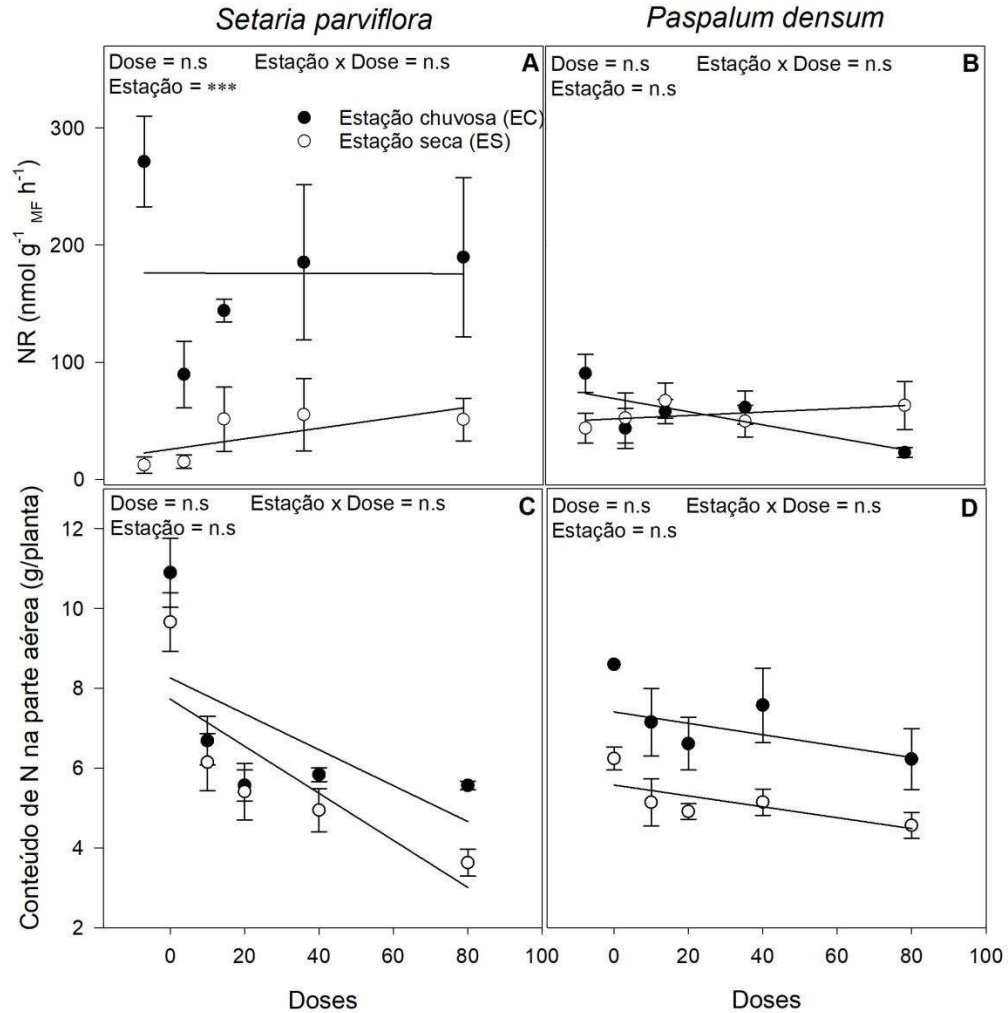


Figura 6: Índices de NR e conteúdo de N na parte aérea em *S. parviflora* (A e C) e *P. densum* (B e D) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de doses crescentes de MO (0, 10, 20, 40 e 80), em estação chuvosa e seca. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Os valores de umidade do solo obtidos apresentaram diferença significativa entre nos efeitos isolados (espécie e estação) e na interação dose x espécie. Para as duas gramíneas, como esperado, a estação chuvosa apresentou maiores valores (Fig. 7 A-B), além disso, em *S. parviflora*, a dose 80 t ha⁻¹ foi significativamente superior às demais (Fig. 7 A). Com relação ao teor relativo de água (TRA), observou-se diferença significativa entre as estações e na interação dose x espécie x estação. As duas espécies também apresentaram maiores valores na

EC (Fig. 7 C, D). *P. densum* apresentou maiores valores de TRA na dose de 80 t ha⁻¹ na EC. Estatisticamente, os valores de prolina apresentaram diferença significativa apenas na interação espécie x estação. Diferente de *S. parviflora*, *P. densum* apresentou maiores valores para a prolina na estação seca (Fig. 7 E, F).

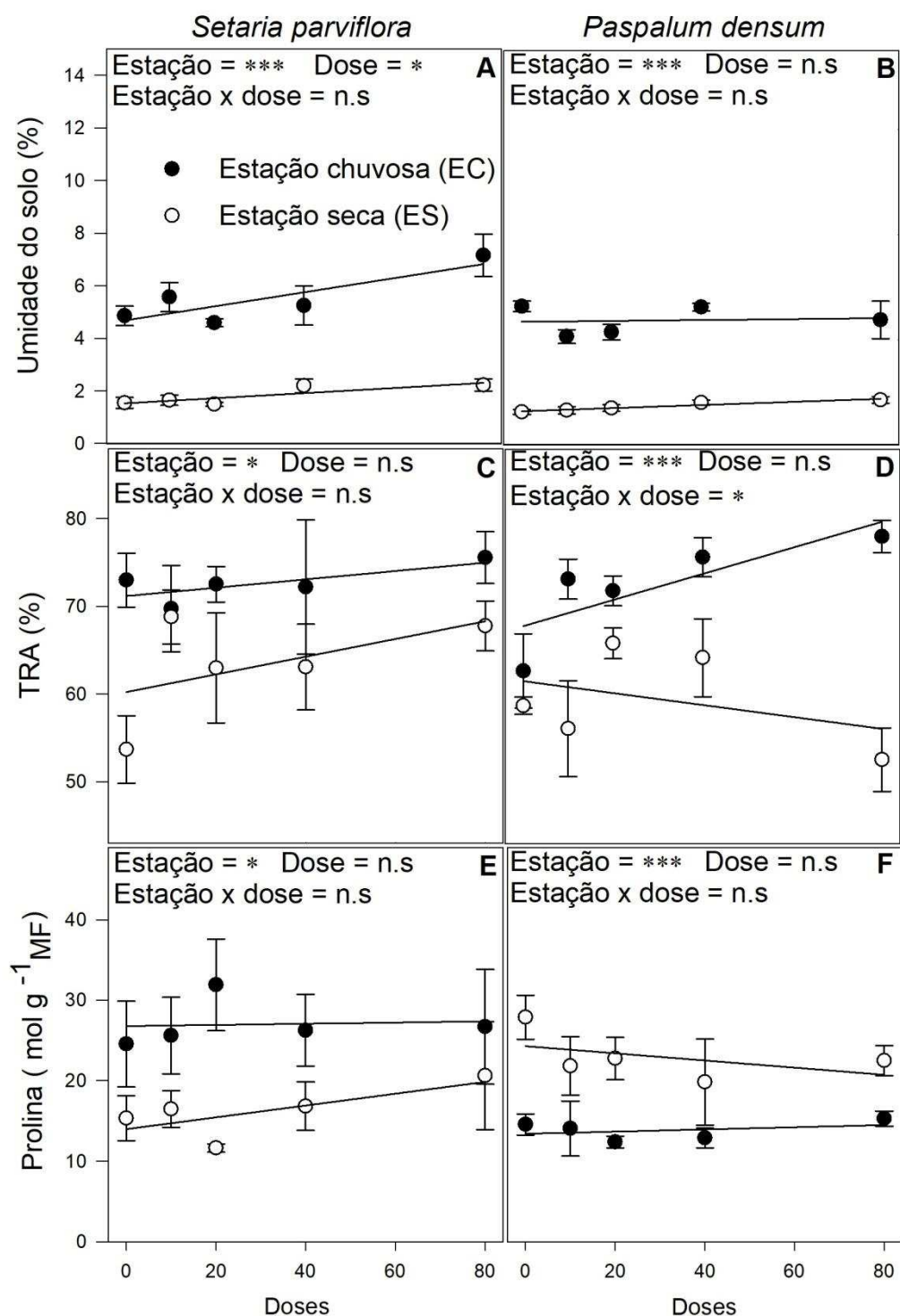


Figura 7: Umidade do solo, teor relativo de água (TRA) e concentrações de prolina nas folhas d *S. parviflora* (A) e *P. densum* (B) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de doses crescentes de MO (0, 10, 20, 40 e 80), em estação chuvosa e seca. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

A massa seca das folhas apresentou diferença significativa nos efeitos isolados (dose, estação e espécie) e nas interações dose x espécie e dose x espécie x estação. Em *S. parviflora*, observou-se maior massa seca de folhas na estação chuvosa (Fig. 8 A), já em *P. densum* somente a dose 80 t ha⁻¹ foi significativamente maior na estação chuvosa (Fig. 8 B). O acúmulo de massa seca nas folhas em resposta às doses de MO foi maior em *P. densum*, principalmente nas doses de 10, 20 e 40 t ha⁻¹. Com relação ao colmo, houve diferença significativa para os efeitos dose, espécie e na interação estação x dose x espécie. Em *S. parviflora* e *P. densum*, a dose 80 t ha⁻¹ apresentou valores significativamente maiores (Fig. 8 C e D). A massa seca do colmo de *P. densum* apresentou maiores valores na estação chuvosa para as maiores doses (Fig. 8 D). A massa seca das raízes apresentou diferença significativa com relação à interação dose x estação, espécie x estação e estação x dose x espécie. A massa seca de *P. densum* na dose de 80 t ha⁻¹ na estação seca, apresentou valores maiores (Fig. 8 F). Para *S. parviflora*, a massa seca das raízes apresentaram na estação seca valores maiores, principalmente nas doses de 40 e 80 t ha⁻¹ em relação às demais doses (Fig. 8 E).

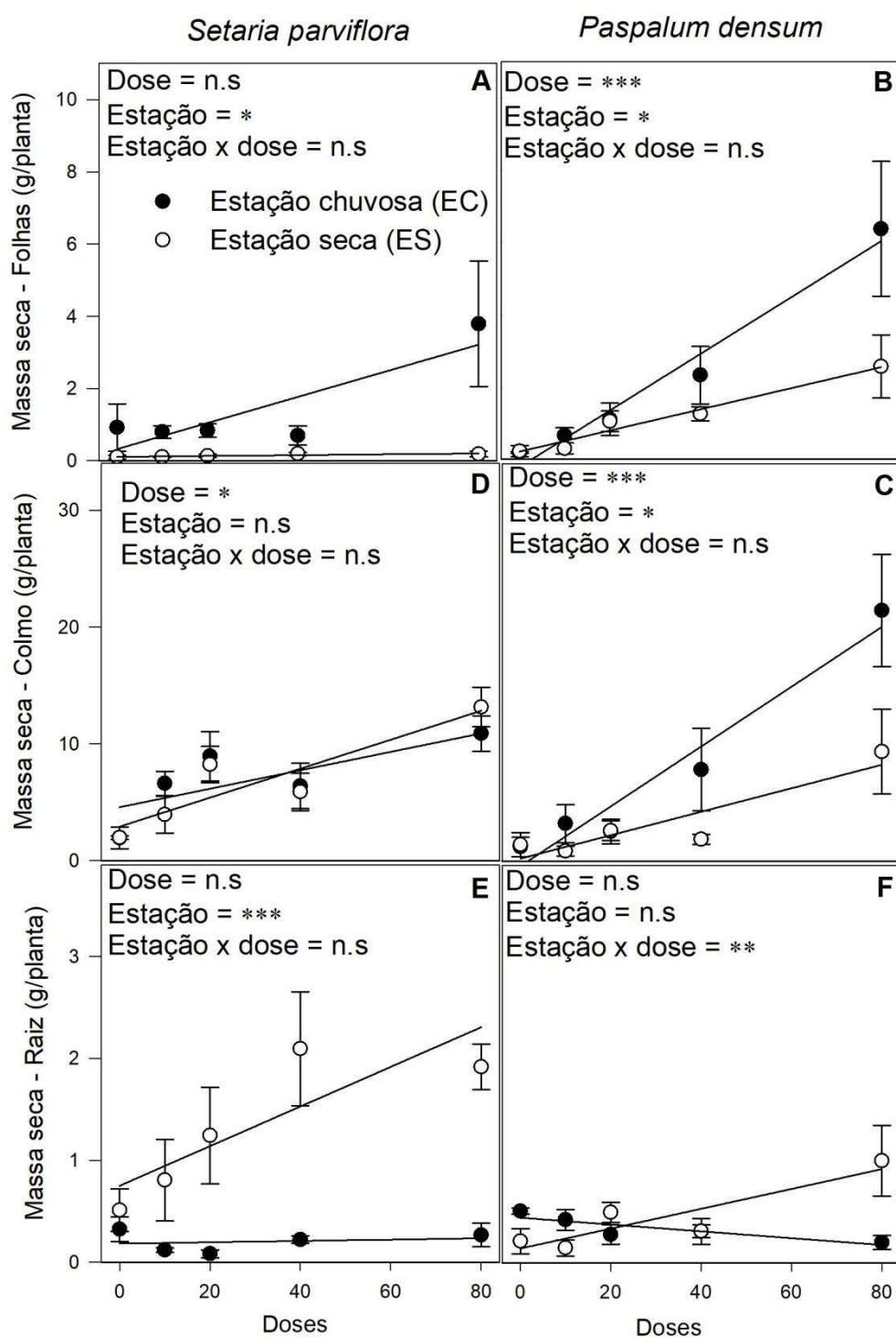


Figura 8: Massa seca total das folhas, colmo e raiz de *S. parviflora* (A, C, E) e *P. densum* (B, D, F) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de doses crescentes de MO (0, 10, 20, 40 e 80), em estação chuvosa e seca. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Os teores de N apresentaram diferença significativa com relação à estação (maior na ES) e nas doses (Fig. 9 A), Com relação aos teores de Fe no substrato, observou-se diferença significativa entre as doses, com menores teores de Fe no substrato enriquecido com as doses de 40 e 80 t ha⁻¹ (Fig. 9 B).

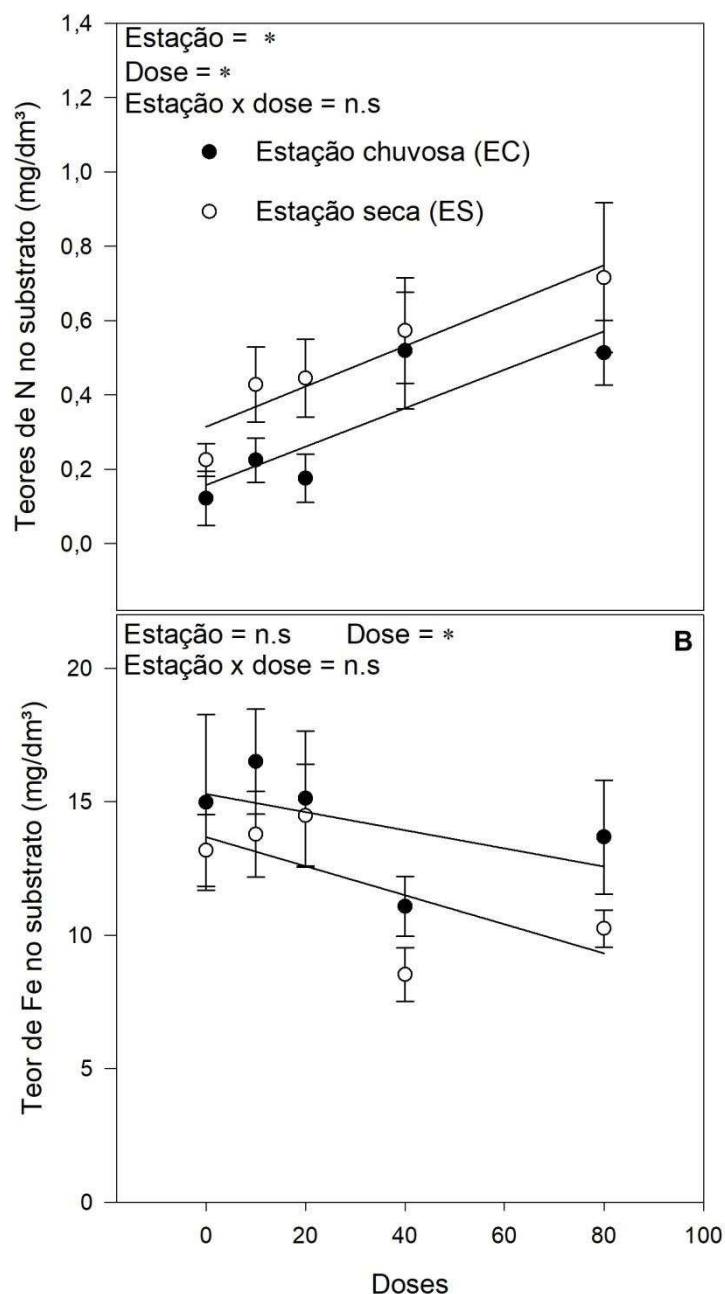


Figura 9: Concentrações de N (A) e Fe (B) no substrato de pilha de estéril com adição de doses crescentes de MO (0, 10, 20, 40 e 80), em estação chuvosa e seca. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste ANOVA ($p < 0,05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

As quantificações dos demais minerais presentes no substrato apontaram diferenças significativas nos teores de Zn, P, K e nos valores de pH com aumento dos valores em relação às doses. Ca e Mg apresentaram diferença significativa para a interação estação x dose, com concentrações significativamente maiores para a dose 40 na EC (Mg) e 40 e 80 na ES (Ca). Os valores de acidez total (AT) foram significativamente maiores na estação seca e os teores de Cr somente foram detectados na estação chuvosa. Os demais (Cd, Pb, matéria orgânica e carbono orgânico) não apresentaram diferença significativa para nenhum dos fatores avaliados.

Tabela 2: Teores de minerais no substrato, com relação às estações (EC e ES) e diferentes dosagens de cama de frango adicionadas. Letras maiúsculas em frente a símbolo do elemento indicam: A = diferença significativa com relação à estação; letras minúsculas indicam: a = diferença significativa com relação à dose.

		Teores de minerais no substrato				
	Estação	Dose 0	Dose 10	Dose 20	Dose 40	Dose 80
Mg (mg dm ⁻³) Aa	EC	0,16	0,36	0,29	0,82	0,64
	ES	0,04	0,16	0,16	0,24	0,36
Zn (mg dm ⁻³) a	EC	1,61	5,19	3,69	15,41	13,96
	ES	1,87	5,69	8,06	17,08	24,41
Cd (mg dm ⁻³)	EC	0,05	0,04	0,13	0,10	0,04
	ES	0,07	0,05	0,04	0,05	0,08
Ca (mg dm ⁻³) Aa	EC	0,85	0,77	0,96	1,68	1,85
	ES	1,21	1,34	1,56	2,10	2,50
P (mg dm ⁻³) a	EC	9,34	72,18	58,55	402,12	257,26
	ES	10,85	110,60	107,47	451,12	476,64
Mn (mg dm ⁻³) a	EC	73,98	107,70	111,25	163,95	210,98
	ES	66,73	90,03	110,45	126,05	152,08
K (mg dm ⁻³) a	EC	9,95	14,10	13,18	35,33	34,86
	ES	8,50	19,14	20,11	31,72	52,52
Cr (mg dm ⁻³) A	EC	0,11	0,36	0,20	0,21	0,31
	ES	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
Pb (mg dm ⁻³)	EC	0,94	1,27	1,20	1,28	1,16
	ES	0,96	0,98	1,11	1,15	1,08
pH (H ₂ O) a	EC	5,82	6,16	6,46	6,66	6,92
	ES	5,62	6,07	6,53	6,81	6,90
MO (dag kg ⁻¹)	EC	0,94	1,09	0,87	1,30	1,44
	ES	0,52	1,01	0,78	1,38	1,24
CO (%)	EC	0,55	0,63	0,51	0,76	0,84
	ES	0,30	0,59	0,45	0,80	0,72
AT (cmol/dm ³) A	EC	1,13	1,07	0,88	0,91	1,01
	ES	3,31	3,11	2,68	2,30	1,98

As duas espécies apresentaram respostas diferentes com relação ao acúmulo de Fe. Estatisticamente, houve diferença significativa no efeito isolado da estação, e nas interações estação x espécie e estação x espécie x dose. Em *S. parviflora*, os teores de Fe tanto na parte aérea quanto nas raízes, apresentaram valores significativamente maiores na estação seca, independentemente da dose de MO (Fig. 10 A, C). Já em *P. densum*, a parte aérea houve apresentou maiores teores de Fe na estação chuvosa somente nas doses de 40 e 80 t ha⁻¹. A raiz de *P. densum* também apresentou maiores valores de Fe na estação seca, entretanto, não houve diferenças significativas para esta espécie (Fig. 10 B, D).

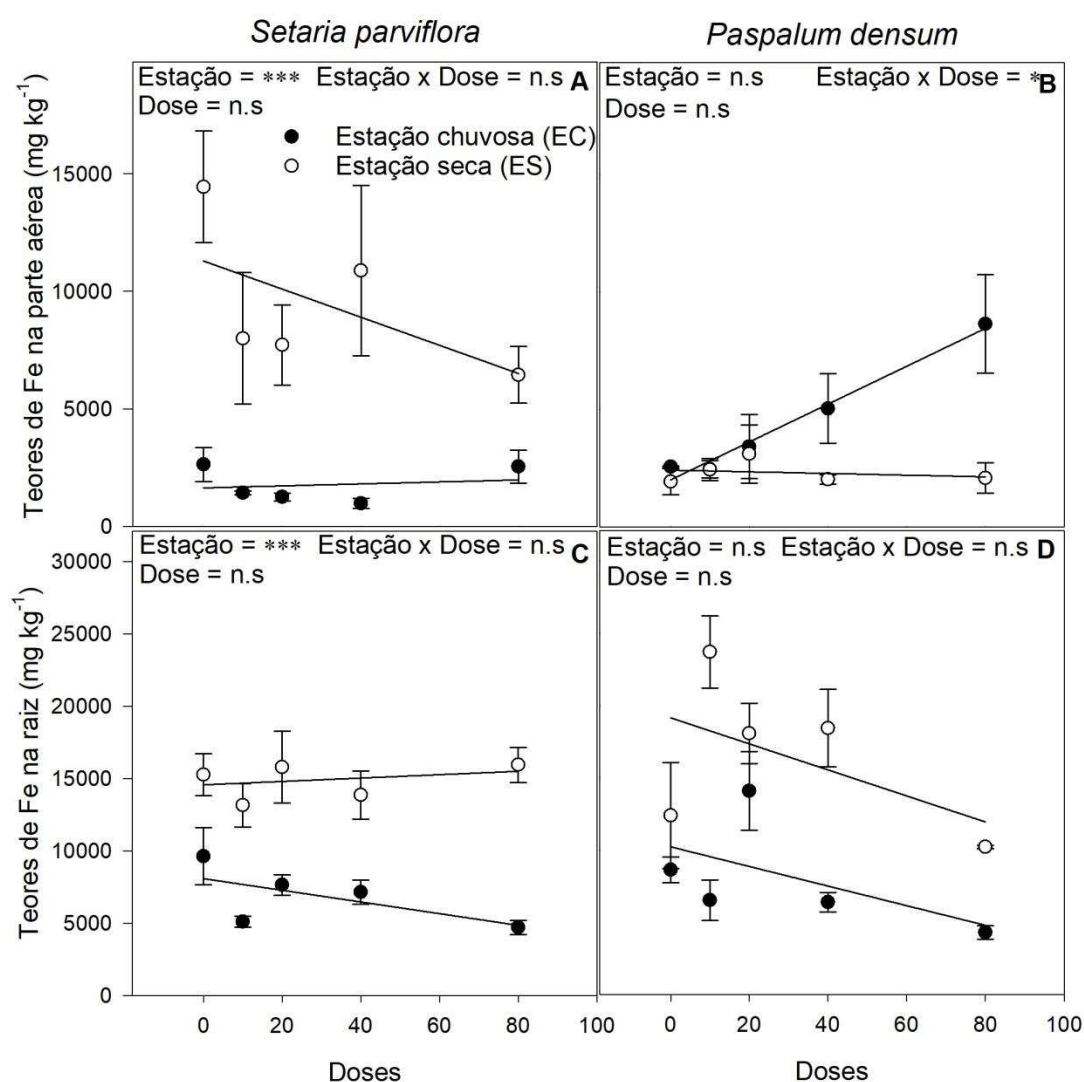


Figura 10: Concentrações de Fe na parte aérea e raiz em *S. parviflora* (A, C) e *P. densum* (B, D) cultivadas em área de pilha de estéril com adição de doses crescentes de MO (0, 10, 20, 40 e 80), em estação chuvosa e seca. As barras mostram as médias $\pm$ erro padrão das cinco repetições de cada experimento. Os valores foram submetidos ao teste Tukey ($p < 0.05$), sendo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Os teores de K e Cu na parte aérea apresentaram diferenças significativas com relação a estação e às doses para as duas espécies, sendo que na estação chuvosa houve maior teor de K e menor de Cu no substrato, com aumento nos teores de K e redução nos teores de Cu em função das doses de MO. Para Ca, houve interação significativa com relação à estação x espécie, em que apenas *S. parviflora* apresentou aumento significativo na estação seca. Zn e Mn apresentaram diferenças significativas com relação às doses e estação x espécie, com maiores teores nas menores doses de MO e menores teores em *S. parviflora* na estação chuvosa. Ni apresentou diferença significativa apenas com relação à dose x espécie, com

maiores valores em *P. densum* nas maiores doses de MO. Com relação ao P, não houve diferença significativa para as duas gramíneas. Não houve detecção de teores de Al, Cd, Cr e Pb nos tecidos avaliados, em ambas as espécies.

A quantificação dos teores dos nutrientes nas raízes apontou diferença significativa com relação à estação e dose apenas para K em ambas as espécies, com maiores valores na estação chuvosa, principalmente nas maiores doses de MO. Houve aumento significativo nos teores de Mg em ambas as espécies na estação chuvosa. Com relação aos teores de P, Cu e Ni nas raízes houve interação significativa entre espécie x estação, em que *S. parviflora* apresentou maiores teores de Ni e P na estação seca e *P. densum* os menores valores de P e maiores valores de Cu na estação chuvosa. Para Mn, não houve diferença significativa.

Tabela 3: Teores de minerais na parte aérea e raiz das duas espécies, com relação à estação e diferentes dosagens de cama de frango (MO) adicionadas ao substrato. * indicam interação significativa (estação x dose), letras maiúsculas abaixo do símbolo do elemento indicam: A = diferença significativa entre as estações e letras minúsculas indicam: a = diferença significativa entre às doses.

		Parte aérea						Raiz					
		Estação	Dose 0	Dose 10	Dose 20	Dose 40	Dose 80		Dose 0	Dose 10	Dose 20	Dose 40	Dose 80
Setaria parviflora	P (dag/kg)	EC	0,18	0,22	0,19	0,22	0,22	P (dag/kg)	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05
		ES	0,15	0,13	0,12	0,28	0,20	Aa	0,05	0,06	0,09	0,12	0,16
	K (dag/kg)	EC	0,66	1,07	1,24	1,30	1,58	K (dag/kg)	0,09	0,11	0,17	0,21	0,20
	Aa	ES	0,43	0,38	0,30	0,77	0,45	Aa	0,05	0,10	0,10	0,18	0,13
	Ca (dag/kg)	EC	0,24	0,17	0,14	0,12	0,12	Ca	0,01	0,06	0,05	0,11	0,07
	A	ES	0,26	0,24	0,23	0,28	0,25	(dag/kg)	0,03	0,06	0,13	0,27	0,42
	Mg	EC	0,34	0,27	0,20	0,17	0,18	Mg	0,06	0,08	0,09	0,08	0,09
	(dag/kg)							(dag/kg) A					
	*Aa	ES	0,17	0,18	0,17	0,21	0,17		0,03	0,03	0,05	0,06	0,06
	S (dag/kg) a	EC	0,18	0,13	0,10	0,11	0,11	S	0,26	0,27	0,28	0,28	0,30
		ES	0,14	0,12	0,09	0,13	0,10	(dag/kg)					
	Cu (mg/kg)	EC	9,43	5,25	5,54	6,21	5,18	Aa	0,44	0,37	0,49	0,53	0,52
	* Aa	ES	18,06	11,85	8,98	8,26	6,19	Cu	28,20	26,54	29,75	34,83	33,00
	Zn (mg/kg)	EC	25,79	14,78	13,58	13,63	13,55	(mg/kg)	26,18	30,08	39,89	45,59	42,04
	Aa	ES	59,40	36,14	30,40	34,13	23,89	Zn	9,99	12,04	18,04	22,50	25,91
	Mn (mg/kg)	EC	485,75	246,50	231,11	183,69	208,69	(mg/kg)					
	Aa	ES	967,96	588,91	634,73	759,03	398,58	Aa	11,80	12,87	25,79	47,30	54,34
Paspalum densum	Ni (mg/kg)	EC	0,28	10,46	0,39	0,08	0,29	Mn	180,48	250,23	184,73	152,59	106,00
		ES	3,43	2,39	2,78	3,17	1,86	(mg/kg)	752,56	4403,41	418,64	727,74	694,58
	P (dag/kg)	EC	0,16	0,20	0,17	0,18	0,18	Ni	1,74	1,44	1,53	1,25	1,13
		ES	0,17	0,19	0,18	0,25	0,20	(mg/kg) A	2,88	1,37	1,74	3,26	3,06
	K (dag/kg)	EC	0,52	0,54	0,84	0,97	1,19	P (dag/kg)	0,07	0,11	0,16	0,13	0,14
	Aa	ES	0,53	0,50	0,49	0,74	0,80	A	0,06	0,09	0,09	0,09	0,08
	Ca (dag/kg)	EC	0,37	0,37	0,32	0,23	0,21	K (dag/kg)	0,18	0,26	0,25	0,31	0,41
	a	ES	0,36	0,37	0,28	0,28	0,24	Aa	0,08	0,21	0,3	0,27	0,28
	Mg	EC	0,33	0,38	0,30	0,26	0,22	Ca	0,09	0,07	0,09	0,11	0,16
	(dag/kg) A	ES	0,24	0,25	0,24	0,27	0,18	(dag/kg)	0,06	0,15	0,15	0,11	0,18
	S (dag/kg)	EC	0,20	0,19	0,17	0,18	0,15	Mg	0,14	0,19	0,23	0,18	0,21
		ES	0,15	0,16	0,16	0,19	0,13	(dag/kg) A	0,08	0,1	0,11	0,1	0,1
	Cu (mg/kg)	EC	11,49	10,89	8,69	7,50	6,65	S	0,33	0,32	0,30	0,34	0,32
	Aa	ES	9,50	8,33	5,94	6,41	5,39	(dag/kg)	0,37	0,38	0,35	0,34	0,37
	Zn (mg/kg)	EC	62,84	51,61	33,36	33,19	28,48	Cu	45,28	26,42	37,10	32,58	22,11
	Aa	ES	57,55	78,20	45,60	56,19	29,51	(mg/kg) A	16,84	23,44	13,55	17,32	13,06
	Mn (mg/kg)	EC	945,21	847,71	604,78	553,56	559,01	Zn	26,46	24,15	22,63	11,52	18,62
	Aa	ES	676,17	1108,05	557,19	388,71	290,43	(mg/kg)	17,44	15,03	11,02	11,44	13
	Ni (mg/kg)	EC	3,35	0,81	0,90	1,05	0,88	Mn	546,10	273,37	6015,28	183,73	140,26
		ES	1,95	2,64	0,83	0,78	0,74	(mg/kg)	565,2	965,28	479,3	678,32	271,77
								Ni	6,37	2,96	2,22	1,69	1,48
								(mg/kg) a	3,88	3,39	2,75	2,87	2,02

4. DISCUSSÃO

A aplicação das diferentes doses de cama de frango influenciou em diferentes variáveis analisadas. Os maiores índices de clorofila total além da maior massa seca dos tecidos avaliados, principalmente em *P. densum*, com as aplicações das maiores doses de cama de frango, sugerem efeitos positivos do enriquecimento do substrato de mineração com a matéria orgânica. Assim, para *P. densum* a aplicação das maiores dosagens seria recomendada. Já *S. parviflora* responde menos às doses de MO com relação ao acúmulo de biomassa, é recomendado a aplicação da dose de 40, devido à menor quantidade de cama de frango que seria utilizada e aos efeitos positivos na matéria seca da raiz desta espécie. De fato, o aumento nas doses de cama de frango influenciou mais no acúmulo de biomassa da raiz em *S. parviflora* e da parte aérea de *P. densum*, justificando o uso de ambas as espécies em conjunto no processo de recuperação de áreas degradadas por mineradoras de ferro. A aplicação de MO, é frequentemente relacionada à efeitos positivos para as plantas, como por exemplo o aumento de massa seca nos estudos de Martuscello *et al.* (2016) com capim-elefante e melhor produtividade de Milho (Silva *et al.*, 2005).

Paralelo às diferentes dosagens, as estações influenciaram significativamente os resultados em diversas análises. Os maiores índices de clorofila na estação chuvosa apresentados pelas duas espécies de gramíneas quando comparados à estação seca, corroboram com estudos que compararam períodos úmidos e de seca em gramíneas, como os estudos de Delabio (2014) e Rios (2017). Além disso, observou-se que em *P. densum*, os índices de clorofila foram mais constantes ao longo do período de avaliação, quando comparado à *S. parviflora*, que apresentou decréscimo já no final da estação chuvosa (janeiro de 2018). A estação chuvosa também influenciou positivamente os valores de Fv/Fm. Na estação seca, *P. densum* apresentou menos efeitos com relação ao déficit hídrico. A diminuição da água disponível para os indivíduos, característica presente durante os meses de estação seca proporcionaram um decréscimo em Fv/Fm, como também foi observado em cana-de-açúcar (Gonçalves *et al.* 2010; Silva *et al.* 2007). Entretanto, algumas espécies não apresentaram tal decréscimo, como observado em trigo (Lu *et al.*, 1998) e nos trabalhos de Ghannoum *et al.* (2003) com espécies de gramíneas C4.

A espécie *S. parviflora*, em campo, apresentou sintomas mais acentuados quando comparada à *P. densum*, o que pode ter ocorrido devido a maior senescência foliar nos meses finais de avaliação como observado com o decréscimo de Fv/Fm e aumento de F₀ observado

para a mesma. Além disso, *P. densum* apresentou desenvolvimento mais lento, tanto para início do processo de germinação quanto para o crescimento inicial e acumulação de biomassa, principalmente nas doses de cama de frango de 0, 10 e 20 t ha⁻¹. A diminuição do F_0 nos meses ligados à ES corroborou com dados de Silva *et al.* (2006), que demonstrou que a medida que o déficit hídrico se acentuava observava-se tal diminuição nas quatro espécies de gramíneas estudadas, principalmente no capim-do-nilo (*Acroceras macrum*).

O aumento significativo no coeficiente de dissipação não fotoquímico (NPQ) na estação seca em *P. densum* somente nas menores doses de cama de frango, e manutenção nos valores de F_v/F_m confirmam a tolerância da espécie neste ambiente, uma vez que tal aumento demonstra dissipação do excesso de energia de excitação que não será utilizada pela planta, evitando danos FSII. (Baker, 2008).

Os maiores valores de prolina em *P. densum* na estação seca também demonstram maior tolerância da espécie com relação ao período com menor disponibilidade de água no substrato. Este fato pode ser relacionado à menor quantidade de sintomas apresentados pela espécie em campo em comparação com *S. parviflora*, que durante a estação seca apresentou decréscimo de variáveis importantes como a clorofila total, F_0 e ETR, por exemplo, e apresentou grande senescência de folhas. O aumento na síntese de prolina em resposta a diferentes estresses pode contribuir, por exemplo, para a manutenção do fluxo de elétrons, preservar a integridade das células e suprir a energia para o crescimento do vegetal (Bartels *et al.*, 2005; Hare *et al.*, 1997). A prolina pode atuar também na proteção da enzima nitrato redutase em casos de estresses relacionados à presença de metais pesados e aos estresses osmóticos (Sharma *et al.*, 2005), o que pode justificar os maiores teores de prolina em relação à maior atividade da NR em *S. parviflora* no período chuvoso.

A atividade da NR interfere na aquisição de N em diversas espécies vegetais (Lea, 1997). Entretanto, outros fatores podem também afetar o acúmulo de N na parte aérea das plantas, como a disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos no substrato (Sharma *et al.*, 2005), como observado em *S. parviflora*. Assim, relacionando os dados obtidos neste estudo para NR com os teores de N na parte aérea, pode-se observar que nos quadrantes sem adição de MO (dose 0), ocorreu maior atividade da NR e maiores teores de N na estação chuvosa em *S. parviflora*. O aumento na atividade da NR e posterior redução do nitrato em nitrito pode modificar a forma como a planta assimilará tais elementos, uma vez que quando a quantidade de nitrato aumenta, a assimilação ocorrerá de forma mais ativa nas folhas. A disponibilidade

de água pode interferir também na atividade da NR (Sharma *et al.*, 2005), como observado em *S. parviflora*, em que os valores de NR foram maiores na estação chuvosa. Além disso, a quantidade de água nas folhas pode interferir na absorção de nutrientes, devido a maior hidratação das cutículas e consequentemente maior permeabilidade (Fagan *et al.*, 2016).

A aplicação das doses de cama frango possibilitou maior quantidade de elementos importantes no substrato, como K, Ca, Zn, Mg, uma vez que, nestas áreas os metais pesados frequentemente se apresentam em maiores concentrações, o que podem dificultar a absorção dos demais minerais. Devido à baixa qualidade nutricional dos substratos, metodologias que adicionem ou mantenham a matéria orgânica existente podem ser mais indicadas para melhoria do solo (Karlen *et al.*, 1994). O aumento de N observado interfere significativamente na resposta da planta, visto que este nutriente está entre os quatro principais componentes quantitativos da biomassa (Larcher, 2000). Em *S. parviflora*, o maior número de indivíduos e quantidade maior de folhas em cada quadrante possibilitaram uma possível renovação do N, uma vez que, nas plantas em processo de senescência (observado para esta espécie em campo), o N pode ser transferido para tecidos mais jovens (Larcher, 2000, Cap. I), podendo, em média, recuperar cerca de 50% do nitrogênio presente nas folhas (Aerts, 1996). Tais informações podem justificar o fato de que mesmo com sintomas e elevada senescência, a maioria dos indivíduos de *S. parviflora* sobreviveram até o final das avaliações. De fato, o grande investimento em sistema radicular em resposta à adição de cama de frango promoveu também maior brotação e crescimento da espécie durante a próxima estação chuvosa. Outro fato observado foi a grande produção de sementes viáveis em *P. densum*, mas principalmente em *S. parviflora* nas doses de 40 e 80 t ha⁻¹, evidenciando a continuidade do processo de colonização da área.

Neste contexto, a incorporação da matéria orgânica em substratos de áreas degradadas por mineradoras pode ser de grande importância por contribuir com um melhor estabelecimento e ganho de biomassa das gramíneas resistentes no processo de recuperação ambiental da área, o que contribui para o desenvolvimento posterior e recrutamento de novas espécies vegetais nos processos de sucessão (Wong, 2003).

5. CONCLUSÕES

- As duas espécies apresentaram condições favoráveis frente à adição de matéria orgânica e ao excesso de Fe, podendo ser utilizadas em planos de recuperação de áreas degradadas por mineradoras.
- A estação seca reduziu os índices de clorofila total, Fv/Fm e ETR nas duas espécies, entretanto, não significou danos severos às mesmas.
- As maiores concentrações de prolina para a espécie *P. densum* na estação seca contribuiu na melhor resposta dos indivíduos frente à menor disponibilidade de água no substrato. Da mesma forma, os níveis de prolina maiores em *S. parviflora* também contribuíram para que a atividade da NR não diminuísse na estação seca para esta espécie.
- Considerando o acúmulo de biomassa e as respostas fisiológicas em ambas as espécies, sugere-se a utilização da dose de 40 t ha⁻¹, como evidenciado pelo maior acúmulo de biomassa na parte aérea de *P. densum* e no sistema radicular de *S. parviflora*. Além disso, nesta dosagem, observou-se redução dos teores de metais e aumento dos teores de nutrientes importantes, como N e K.
- Mesmo apresentando grande senescência durante o período experimental, os indivíduos de *S. parviflora* apresentaram respostas fisiológicas adequadas à colonização da área, o que pode ser justificado pela remobilização do N para as folhas novas e ciclagem de nutrientes no solo, bem como pela produção de grande quantidade de sementes viáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, T. O.; FREITAS-SILVA L.; SANTANA, B. V. N.; KUKI, K. N.; PEREIRA, E. G.; AZEVEDO, A. A.; SILVA, L. C. **Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species.** Environmental Science and Pollution Research v. 21, p. 2777-2784, 2014.
- AERTS, R. **Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: are there general patterns?** Journal of Ecology, London, v. 84, p. 597-608, 1996.
- BAKER, N. R. **Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo.** Annual Review of Plant Biology. 59, 89-113, 2008.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. **Drought and salt tolerance in plants.** Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.
- BATES, L. S.; WAKLREN, R. P.; TEARE, I. D. **Rapid determination of free proline water stress studies.** Plant Soil, v. 39, p. 205-207, 1973.

CORRÊA, R. S. **Recuperação de áreas degradadas pela mineração no cerrado: Manual para revegetação**. Brasília: Universa, 186p., 2005.

DELABIO, J. C. **Ecofisiologia comparativa entre gramíneas nativas e gramíneas exóticas invasoras em um Cerrado Campo Sujo, SP**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Universidade de São Paulo, 2014.

DIAS, L. E.; FRANCO, A. A.; CAMPELLO E. F. C. **Fertilidade do solo e seu manejo em áreas degradadas**. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). *Fertilidade do solo*. Viçosa: SBCS, p. 955-990, 2007.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de métodos de análise de solo / Centro Nacional de Pesquisa de Solos**. – 2. ed. Revista atual, Rio de Janeiro, 1997.

FAGAN, E. B.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D.; SOARES, L. H., NETO, D. D. **Fisiologia Vegetal Metabolismo e Nutrição Mineral**. Editora Andrei, 305 p., 2016.

FAGERIA, N. K. **The Use of Nutrients in Crop Plants**. New York: CRC Press, 2009.

FERNANDES, E. A.; SANTOS, H. I. **Análise da operação da barragem de rejeitos da mineração Serra Grande S.A., município de Crixás, Goiás**. Universidade Católica de Goiás, Departamento de engenharia, 15p., 2008.

GHANNOUM, O.; CONROY, J. P.; DRISCOLL, S. P.; PAUL, M. J.; FOYER, C. H.; LAWLOR, D. W. **Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses**. *New Phytologist*, v.159, p.599-608, 2003.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. de G. **Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.14, n.4, p.378–386, 2010.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. **Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants**. *Plant Growth Regulation*, Dordrecht, v. 21, p. 79-102, 1997.

JACKSON, M. L. **Soil chemical analysis**. New York: Prentice Hall, 498p, 1958.

JAWORSKI, E.G. **Nitrate reductase assay in intact plant tissues**. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43:1274- 1279, 1971.

KARLEN, D.L., WOLLENHAUPT, N.C., ERBACH, D.C., BERRY, E.C., SWAN, J.B., EASH, N.S., JORDAHL, J.L. **Crop residue effects on soil quality following 10-years of no-till corn**. *Soil & Tillage Research*, 31, 149–167, 1994.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: ed. Rima Artes e Textos, 531p., 2000.

LEA, P.J. **Primary nitrogen metabolism**. In: DEY, P.M., HARBORNE, J.B. *Plant biochemistry*. Academic, Chapt.7. p.273-313, 1997.

LU, C., ZHANG, J. **Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants.** Australian journal of plant physiology, n. 25, p.883-892.1998.

MARTUSCELLO, J. A.; MAJEROWICZ, N.; DA CUNHA, D. N. F. V.; DE AMORIM, P. L.; BRAZ, T. G. S. **Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada.** Archivos de Zootecnia. 65 (252): 565-570, 2016.

MELLO, S. C.; VITTI, G. C. **Desenvolvimento do tomateiro e modificações nas propriedades químicas do solo em função da aplicação de resíduos orgânicos, sob cultivo protegido.** Orticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 2, p. 200-206, 2002.

MORAIS, T. P. dos S. **Produção e composição do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) sob doses de cama de frango.** 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

PEREIRA, E. G.; OLIVA, M. A.; ROSADO-SOUZA, L.; MENDES, G. C.; COLARES, D. S.; STOPATO, C. H.; ALMEIDA, A. M. **Iron excess affects rice photosynthesis through stomatal and non-stomatal limitations.** Plant Science. 201-202, 81-92, 2013.

RIOS, C. O. **Respostas fisiológicas de gramíneas ao déficit hídrico visando a revegetação de pilha de estéril.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Florestal, MG, 2017.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. **Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant.** Journal of Plant Physiology, v. 162, n. 8, p. 854-864, 2005.

SILVA, E. C. da; BUZETTI, S.; GUIMARÃES, G. L.; LAZARINI, E.; SÁ, M. E. **Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre latossolo vermelho.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, v. 29, n. 3, p. 353-362, 2005.

SILVA, M. DE A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G. DA; SHARMA, V. **Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane.** Brazilian Journal of Plant Physiology, v.19, n.3, p.193-201, 2007.

SILVA, M. M. O.; VASQUEZ, H. M.; BRESSAN-SMITH, R.; SILVA, J. F. C.; ERBESDOBLER, E. D.; JUNIOR, P. S. C. A. **Eficiência fotoquímica de gramíneas forrageiras tropicais submetidas à deficiência hídrica.** Revista Brasileira Zootecnia, v. 35, n. 1, p. 67-74, 2006.

WONG, M.H. **Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils.** Chemosphere 50 (2003) 775–780, 2003.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados referentes à ligação do déficit de N e excesso de Fe demonstram que a metodologia proposta (adição de MO nas áreas de restauração ecológica) pode ser de grande eficiência.
- As espécies de gramíneas utilizadas, além de serem nativas, responderam favoravelmente à aplicação das dosagens de MO em campo, o que em conjunto com sua comprovada tolerância ao Fe serve como justificativa para a utilização das mesmas em áreas degradadas por mineração.
- A cama de frango é um tipo de adubo orgânico acessível, o que pode favorecer a aplicação do mesmo em várias áreas com necessidade de recuperação ambiental, buscando aumentar os teores de nutrientes no substrato e consequentemente melhorar o estabelecimento da vegetação.
- Devida a importância do N para o metabolismo das gramíneas, o incremento de compostos orgânicos, como a cama de frango, podem contribuir significativamente para a utilização e melhor estabelecimento de gramíneas em planos de restauração de áreas degradadas.