

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROBIOLOGIA**

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E
MICORRÍZAÇÃO EM GRAMÍNEAS DOS CAMPOS
SULINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Anderson Cesar Ramos Marques

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E MICORRÍZAÇÃO EM GRAMÍNEAS DOS CAMPOS SULINOS

Anderson Cesar Ramos Marques

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Agrobiologia**.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Luiz Ferreira de Quadros

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E MICORRÍZAÇÃO EM
GRAMÍNEAS DOS CAMPOS SULINOS**

elaborado por
Anderson Cesar Ramos Marques

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Agrobiologia

Comissão Examinadora:

Fernando Luiz Ferreira de Quadros, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, Dr. (UFSM)

Leandro Bochi da Silva Volk, Dr. (EMBRAPA)

Santa Maria, 10 de fevereiro de 2014

Aos meus pais, Alfeu Vieira Marques (*in memoriam*) e Rosa Ramos Marques

Dedico este trabalho!

*“Se eu fui capaz de ver mais longe é porque
estava em pé nos ombros de gigantes”*

Isaac Newton

Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, e pela oportunidade de conviver com pessoas maravilhosas que sempre contribuíram para o meu crescimento.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

Aos meus pais Alfeu Vieira Marques (*in memoriam*) e Rosa Ramos Marques, pelos exemplos de vida e trabalho, pelo carinho, compreensão e dedicação, sempre me apoiando e incentivando a dar continuidade aos estudos. A minha irmã Eliane Ramos Marques pelo companheirismo e atenção. A minha namorada Quélen Martins Braga, pelo apoio constante, compreensão nos momentos de ausência, compartilhando as dificuldades e entusiasmos do trabalho. A vocês todo meu carinho e gratidão.

Ao “Patrão” orientador, professor, Fernando L. F. de Quadros, pelo exemplo de humildade e dedicação a pesquisa e ao ensino. Pelos ensinamentos, pela convivência, confiança depositada e paciência.

Aos estagiários e bolsistas do LEPAN, Pedro, João Bento, Augusto, Gabriela, Paula, Fernando, Felipe, João Elias, João Tomas, Jessica, Laís, e em especial, Leonardo Lemos Karsburg, pessoa esta, excepcional, que tive o prazer de conhecer e que com certeza zela por nós nas estâncias do céu, este trabalho é fruto da colaboração de cada um de vocês.

Aos colegas das Pós-Graduações, Bruno, Régis, Jorge, Émerson, Alessandro, Liane Soares, Carolina, Júlia, Dr. Felipe Jochims (Alemão pós-doc), Fábio, Cesar, o taura missioneiro Leandro, pela atenção, ensinamentos, paciência e compreensão de minhas dificuldades.

Ao professor Rodrigo Josemar Seminoti Jacques, um exemplo de profissional e acima de tudo amigo, a quem devo boa parte desta empreitada. Também, aos amigos do laboratório de Microbiologia do Solo e Ambiente, Cristiane, Daiana, Daiane, Daniel, Francisco, Luana, Lilian, Marcos, Natielo, Jaime, Sabrina, Taís, Diogo, Willian e Rosângela, pelo excelente convívio e pela amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, em especial ao Marcos, Rogério Piccin, Alex, Lessandro, Dênis, Fábio, Roque e Cesar Cella pelo companheirismo durante minha passagem pelo laboratório.

Aos professores, do PPG em Agrobiologia, em especial Zaida, Taís, Fernando Nicoloso, Sidnei, e Sandro Giacomini, sempre disponíveis a auxiliar e sanar dúvidas.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, em especial aos colegas da turma de 2012, pela amizade e pelo constante apoio.

Aos amigos em geral, que em todas as etapas dessa jornada de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação.

A todos, MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós – Graduação em Agrobiologia
Universidade Federal de Santa Maria

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E MICORRIZAÇÃO EM GRAMÍNEAS DOS CAMPOS SULINOS

AUTOR: ANDERSON CESAR RAMOS MARQUES
ORIENTADOR: Dr. FERNANDO LUIZ FERREIRA DE QUADROS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 10 de fevereiro de 2014

O conhecimento do nível de associação que ocorre entre bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nos ecossistemas campestres, pode ser importante para a o entendimento das alterações provocadas pela adição de fertilizantes, contendo fósforo (P) e nitrogênio (N), na produção e na composição botânica das pastagens naturais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar (a) a ocorrência de três gêneros de bactérias diazotróficas no sistema radicular sob fertilização com N e P, e determinar a contribuição de N via FBN, e (b) avaliar o comportamento da associação entre FMAs e gramíneas nativas. Foram utilizadas quatro gramíneas de maior abundância nas pastagens naturais dos Campos Sulinos no Rio Grande do Sul, *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* e *Aristida laevis*, cultivadas em casa de vegetação, sendo conduzidos dois estudos (A e B). Em A, foram aplicados dois tratamentos: 50 mg kg⁻¹ de solo de P + 100 mg kg⁻¹ de N solo (NP) e uma testemunha, sendo avaliados, o número de bactérias diazotróficas dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, e a contribuição da FBN através da técnica da abundância natural de ¹⁵N. Em B, os tratamentos consistiram na aplicação de 50 mg kg⁻¹ de solo de P (P); aplicação de 50 mg kg⁻¹ de solo de P + 100 mg kg⁻¹ de N solo (NP), e uma testemunha, em ambos foi determinada a colonização micorrízica. A espécie *A. laevis* demonstrou ser mais dependente da fixação biológica de N que as demais espécies. A espécie *P. notatum* em comparação as demais espécies, demonstrou ser mais hábil em absorver o N disponível no solo. A matéria seca acumulada da parte aérea das espécies nativas foi maior com a aplicação de NP. A colonização micorrízica foi semelhante entre a testemunha, P e NP para as raízes de *A. lateralis* e *A. laevis*, apresentando assim uma maior dependência da associação micorrízica. Diferentemente, nas espécies *A. affinis* e *P. notatum*, a colonização micorrízica foi menor quando submetidas a adubação com P e NP, apresentando assim uma menor dependência. Conclui-se assim, que a adubação com N e P reduz a colonização de bactérias diazotróficas, aumentando a produção de matéria seca e teor de N no tecido. *A. laevis* apresentou a maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio, já *P. notatum* apresentou maior acúmulo de N do solo. As espécies *A. laevis* e *A. lateralis* apresentam maior dependência da micorrização que as espécies *A. affinis* e *P. notatum*.

Palavras-chave: Rizosfera. Exsudatos radiculares. Bactérias associativas. Colonização micorrízica. Dependência micorrízica.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Agrobiologia
Federal University of Santa Maria

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND MYCORRHIZATION IN GRASSES OF THE SOUTHERN FIELDS

AUTHOR: ANDERSON CESAR RAMOS MARQUES
ADVISER: Dr. FERNANDO LUIZ FERREIRA DE QUADROS

Place and Date of the Defense: Santa Maria, 11th February 2014.

The knowledge of the level of association that occurs between diazotrophic bacteria and fungi arbusculares mycorrhizae (AMF) in grassland ecosystems may be important for the understanding of the changes caused by the addition of fertilizers containing phosphorus (P) and nitrogen (N), in the production and botanical composition of natural pastures. The objective of this study was to evaluate. (a) the occurrence of three genera of diazotrophic bacterial in the root system under fertilization with N and P, and determine the contribution of N via BNF, and (b) evaluate the behavior of the association between AMF and native grasses. Four most abundant grasses in natural grasslands of the Southern “Campos” in Rio Grande do Sul , *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* and *Aristida laevis* were grown in pots of 5 kg, in a greenhouse, two studies being conducted (A e B). In A, two treatments were applied: 50 mg kg⁻¹ soil P and 100 mg kg⁻¹ of soil N (NP) and a control, being evaluated, the number of diazotrophic bacteria of the genera *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, and the contribution of BNF was determined by the technique of natural ¹⁵N abundance. In B, the treatments consisted of applying 50 mg kg⁻¹ soil P (P), application of 50 mg kg⁻¹ soil P and 100 mg kg⁻¹ of soil N (NP), and a control, in both treatments mycorrhizal colonization was determined. For A, *A. laevis* demonstrate to be more dependent on biological N fixation than the other species. The grass *P. notatum* compared with other species demonstrated to be more efficient to absorb available soil N. The dry matter accumulation in shoots of the native species was higher with the application of NP. In B the mycorrhizal colonization was similar between the control, P and NP to the roots of *A. lateralis* and *A. laevis*, thus presenting a greater dependence on the mycorrhizal association. Differently, in *A. affinis* and *P. notatum*, the mycorrhizal colonization was lower when subjected to fertilization with P and NP, thus presenting a lower dependence. It is concluded for A that fertilization with N and P reduces diazotrophic colonization, increasing the production of dry matter and N content of the tissue. *A. laevis* showed the highest contribution of biological nitrogen fixation, since *P. notatum* showed higher N accumulation in soil. In relation to B, *A. laevis* and *A. lateralis* have a higher dependence on the mycorrhizal than *A. affinis* and *P. notatum*.

Key words: Rhizosphere. Root exudates. Associative bacteria. Mycorrhizal colonization. Mycorrhizal dependency.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Características do sistema radicular correlacionados com dependência micorrízica (Brundrett, 1991)..... 21
- Tabela 2: Temperatura média mensal do ar no interior da casa de vegetação durante o período de condução dos estudos..... 31
- Tabela 3: Logaritmo (Log_{10}) do número de bactérias encontradas no experimento I nos meios seletivos NFb (*Azospirillum*), LG (*Azotobacter*) e JNFb (*Herbaspirillum*), nos tratamentos testemunha (Test) e N+P, nas frações endorizoplano (ER), rizoplano (RP) e solo da rizosfera (SR) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos..... 37
- Tabela 4: Logaritmo (Log_{10}) do número de bactérias encontradas no experimento II nos meios seletivos NFb (*Azospirillum*), LG (*Azotobacter*) e JNFb (*Herbaspirillum*), nas frações endorizoplano (ER), rizoplano (RP) e solo da rizosfera (SR) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos..... 38
- Tabela 5: Produção de matéria seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função de períodos e fertilização com fósforo e nitrogênio (N+P) e testemunha..... 39
- Tabela 6: Teor de nitrogênio na matéria seca de raiz (N-MSR) e parte aérea (N-MSPA) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função de períodos e fertilização com fósforo e nitrogênio (N+P) e testemunha..... 40
- Tabela 7: Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), teor de N no tecido (N), teor de N no tecido via FBN (N-FBN), taxa de fixação de N (TFN), N total acumulado no tecido (NTA), N acumulado via FBN (NA-FBN), N absorvido do solo (N-Solo), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos..... 41
- Tabela 8: Temperatura média mensal do ar do período experimental no interior da casa de vegetação nos meses de setembro a dezembro de 2012 e janeiro de 2013..... 55
- Tabela 9: Porcentagem de colonização micorrízica, número de esporos e atividade de fosfatase ácida no solo, em quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com fósforo (P) e nitrogênio (N). 59
- Tabela 10: Produção de matéria seca acumulada da parte aérea (MSAPA) e raiz (MSAR), e teor de fósforo (P) na parte aérea e raiz de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função da fertilização com fósforo (P) e nitrogênio (N). 60

Tabela 11: Valores de P total extraído por resina (P resina) e pH em água em solo cultivado com gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função da fertilização com fósforo (P) e nitrogênio (N).....	61
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama de ordenação das espécies *Andropogon lateralis* (AnLa), *Aristida laevis* (ArLa), *Axonopus affinis* (AxAf), *Paspalum notatum* (PaNo), nos tratamentos testemunha (T), fósforo (P) e nitrogênio + fósforo (NP), em função das variáveis: porcentagem de colonização (PC), teor de fósforo na raiz (PRaiz), teor de fósforo na parte aérea (PPA), fósforo no solo extraído por RTA (PRes), massa seca de raiz (MSR) e matéria seca acumulada de parte aérea (MSPA)..... 62

Sumário

INTRODUÇÃO	13
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 Atividade de microrganismos em pastagens naturais	15
1.2 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas nativas	17
1.3 Fungos micorrízicos arbusculares em gramíneas nativas	19
1.4 Referências	22
2. HIPÓTESES	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. CAPÍTULO I	28
FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GRAMÍNEAS NATIVAS DOS CAMPOS SULINOS	28
4.1 Introdução	29
4.2 Materiais e Métodos	30
4.2.1 Local, solo e espécies utilizadas.....	30
4.2.2 Condução dos experimentos e tratamentos.....	31
4.2.2.1 Experimento I.....	32
4.2.2.2 Experimento II.....	32
4.2.3 Coleta das amostras.....	32
4.2.3.1 Experimento I.....	33
4.2.3.2 Experimento II.....	33
4.2.4 Medidas e determinações.....	33
4.2.4.1 Experimento I.....	33
4.2.4.2 Experimento II.....	34
4.2.5 Análises estatística.....	35
4.2.5.1 Experimento I.....	35
4.2.5.2 Experimento II.....	36
4.3 Resultados	36
4.3.1 Número de bactérias diazotróficas.....	36
4.3.2 Produções de matéria seca e teor de nitrogênio.....	38

4.3.3 Abundância natural de ^{15}N	41
4.4 Discussão	42
4.4.1 Colonização por bactérias diazotróficas.....	42
4.4.2 Contribuição da FBN	44
4.5 Conclusões	46
4.6 Referencias Bibliográficas	46
5 CAPÍTULO II.....	51
FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NATIVOS EM GRAMÍNEAS DOS CAMPOS SULINOS	51
Resumo	51
Abstract	51
5.1 Introdução.....	52
5.2 Materiais e Métodos	54
5.2.1 Local, solo e espécies utilizadas.....	54
5.2.2 Condução e tratamentos	54
5.2.3 Medidas e determinações	55
5.2.4 Análises estatística	57
5.3 Resultados	58
5.3.1 Colonização micorrízica e atividade de fosfatase ácida no solo	58
5.3.2 Matéria seca acumulada e teor de P no tecido.....	59
5.3.3 Fósforo disponível e pH do solo.....	61
5.3.4 Análise multivariada	61
5.4 Discussão	63
5.4.1 Dependência micorrízica.....	63
5.4.2 Efeito da adubação na colonização micorrízica	65
5.5 Conclusões.....	67
5.6 Referências.....	67
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

INTRODUÇÃO

Os solos ocorrentes sobre pastagens naturais no Rio Grande do Sul na sua maioria são pobres em fósforo (P) e nitrogênio (N) disponíveis, sendo estes nutrientes os mais limitantes ao crescimento de gramíneas forrageiras nativas. A variabilidade de solo e clima, aos quais as espécies destas pastagens naturais foram submetidas, proporcionaram a existência de uma significativa quantidade de gramíneas, responsáveis pela maior parte da massa de forragem.

Dentre as mais de 400 espécies de gramíneas, existem espécies de crescimento rápido, adaptadas a solos de maior fertilidade, e espécies de crescimento mais lento, adaptadas a solos mais pobres, sendo esta, uma forma de se adaptarem à fertilidade natural destes solos. Estas espécies, ao longo de sua evolução, desenvolveram outros mecanismos de sobrevivência à restrição de P e N no solo para manutenção do seu crescimento e persistência, como a associação com microrganismos.

Considerando a nutrição de P e N, e os aspectos relacionados à associação das gramíneas nativas com microrganismos do solo, destaca-se a importância dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada pelas bactérias diazotróficas, como mecanismos de obtenção destes nutrientes em solos de baixa disponibilidade de nutrientes.

O P é um macronutriente presente nos solos tropicais em baixas concentrações nas formas disponíveis às plantas, sendo pouco móvel em solos intemperizados, como os dos Campos Sulinos. Nessas condições os FMAs assumem papel importante na sobrevivência de espécies vegetais.

As espécies que apresentam dependência da associação com FMAs não crescem satisfatoriamente na ausência destes microrganismos, principalmente em solos com baixos teores de nutrientes. As espécies que apresentam baixa dependência apresentam sistema radicular bem desenvolvido, com muitas raízes finas e pêlos radiculares. Apesar disso, são plantas ruderais que se desenvolvem, em geral, em solos com altos teores de nutrientes disponíveis, apresentando também competitividade em solos pobres em P, devido à plasticidade do sistema radicular.

As espécies mais dependentes da associação com microrganismos, quando submetidas à elevação no teor de nutrientes, em geral, não alteram a sua micorrização radicular, uma característica de dependência que pode ser atribuída às espécies de crescimento mais lento. Já as espécies com crescimento mais rápido apresentam uma redução na colonização, comportamento que pode ser atribuído a sua plasticidade em resposta ao aumento da fertilidade.

A FBN é uma via importante para a entrada de N no solo, sendo um processo realizado por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos, que associados a gramíneas forrageiras, são de vida livre, podem contribuir com o fornecimento de nitrogênio aos ecossistemas naturais. A FBN é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 , tem sua atividade regulada pela presença de N no solo e atividade das plantas.

Em pastagens nativas, a FBN pode responder pela entrada de boa parte do N que estas espécies necessitam. Aparentemente, a fixação associada a gramíneas funciona como uma alternativa da planta frente à necessidade de sobrevivência em baixa disponibilidade de N, e não como forma efetiva para aumentos da produção. A FBN está relacionada com o crescimento vegetal, características do solo e diferentes manejos adotados, como a adubação, que podem modificar a atividade destes microrganismos no solo.

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar a colonização por micorrizas arbusculares e a fixação biológica de nitrogênio em quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com P e N.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Atividade de microrganismos em pastagens naturais

O solo é capaz de sustentar uma comunidade microbiana extremamente grande, com uma dinâmica muito complexa, atuante nos processos de decomposição da matéria orgânica e nos ciclos dos nutrientes, mediando sua disponibilidade. A biomassa microbiana total no solo funciona como um reservatório de nutrientes para as plantas, com atividade influenciada por fatores bióticos e abióticos do ambiente (FILHO & MINHONI, 2007), desta forma, um solo com alta atividade microbiana pode ser caracterizado como de boa qualidade. Estima-se que a comunidade microbiana ocupe menos de 5% do espaço poroso do solo, e que cerca de 90% da sua atividade seja realizada por bactérias e fungos (ANDREOLA & FERNANDES, 2007).

Das distintas regiões do solo onde ocorrem estas interações, na rizosfera observa-se a maior atividade dos microrganismos, devido principalmente, à influência direta da atividade das raízes, que proporcionam características físico-químicas diferenciadas das demais frações do solo, e que desta forma tornam-se responsáveis pela maior parte das interações entre microrganismos e plantas (DANTAS et al., 2009), estando relacionadas a capacidade de promover o crescimento vegetal pela disponibilização, principalmente, de nitrogênio (N) e fósforo (P).

A atividade biológica do solo compreende uma série de reações, sendo as reações bioquímicas catalisadas por enzimas responsáveis por acelerarem a reciclagem da matéria orgânica e o fluxo de nutrientes para formas disponíveis. As enzimas extracelulares constituem uma estratégia que permite estender o volume de solo explorado, além de implicar de forma direta na mobilização de nutrientes, podem atuar como sinais simbióticos aos microrganismos.

As fosfomonoesterases, que genericamente recebem a denominação de fosfatases, são as enzimas mais estudadas, por atuarem na mobilização de fósforo inorgânico utilizando como substrato ortofosfatos de monoésteres (GATIBONI et al., 2008). Os trabalhos conduzidos em condições hidropônicas não detectaram atividade de fosfatases alcalinas em material vegetal, sugerindo que as raízes produzem apenas fosfatases ácidas. A produção de fosfatases ácidas é atribuída à atividade metabólica de raízes e fungos (DAKORA & PHILLIPS, 2002).

A concentração de nutrientes na solução do solo regula a atividade das enzimas extracelulares de origem vegetal. Assim, a baixa concentração de fósforo nas raízes, como resultado de deficiência desse nutriente na solução do solo, induz a síntese de fosfatases intra e extracelular, seguido por um aumento na liberação de fosfatases extracelulares dentro dos exsudatos radiculares (DAKORA & PHILLIPS, 2002). O aporte de adubos fosfatados solúveis promove um aumento da forma inorgânica do fósforo e, em consequência, a diminuição na atividade de fosfatases, pela baixa necessidade de uso das formas orgânicas como fonte de fósforo pelas plantas (GATIBONI et al, 2008).

Desta forma, os processos biológicos têm um papel importante no fluxo de nutrientes em pastagens naturais, regulando a disponibilidade do fósforo e de outros nutrientes ao crescimento vegetal. Em sistemas naturais, como campos nativos, o fornecimento de P às plantas mostra-se dependente da ciclagem do P orgânico, principalmente em solos de regiões tropicais e subtropicais (STEWART & TIESSEN, 1987).

Conforme Oliveira et al. (2011), o P imobilizado na biomassa microbiana, constitui reserva potencial de P capaz de suprir a demanda de espécies nativas nas pastagens naturais, sendo o P microbiano um indicador sensível para detectar as alterações promovidas pelo pastejo. O efeito do pastejo promove incremento temporário no conteúdo de P microbiano, isto ocorre porque o corte de folhas das plantas causa a morte de parte do sistema radicular, liberando resíduos de fácil decomposição ricos em nutrientes, que estimulam o crescimento da biomassa microbiana do solo. A grande proporção de P microbiano no P orgânico e no P total do solo evidencia que o P microbiano é a maior e mais importante fonte de reserva potencial de P para o crescimento e desenvolvimento das plantas em ecossistemas naturais, sem a adição de fertilizantes fosfatados, como o das pastagens naturais do Sul do Brasil (OLIVEIRA et al., 2011).

A atividade dos microrganismos no solo, também está relacionada com o ciclo do N, bem como na forma como este elemento move-se através dos vários compartimentos ou "reservatórios" nas pastagens nativas. As pastagens estão sujeitas a constantes ganhos e perdas do nutriente, seja através do solo, pasto, animais, clima, ou do sistema de manejo, que influenciam no ciclo deste nutriente e na possibilidade de perdas indesejáveis (O'CONNOR, 1983).

Atualmente sabe-se que o nitrogênio entra no sistema das pastagens nativas principalmente na forma de fertilizantes, mas existem outras fontes, como através da excreta de animais que recebem alimentação suplementar, por deposição atmosférica com descargas elétricas, e o N fixado biologicamente. Por outro lado, deixam as pastagens através de rotas desejáveis, na produção de forrageira e nos produtos animais, ou perdas gasosas, podendo ocorrer também a imobilização do N do solo na biomassa microbiana e lixiviação (O'CONNOR, 1983).

Nas pastagens nativas com gramíneas do tipo C₄, a relação C:N da liteira é alta, e favorece a imobilização do N inorgânico na biomassa microbiana, comprometendo a disponibilidade de nitrogênio ao sistema. No entanto, a imobilização do N na biomassa microbiana impede sua perda por volatilização ou lixiviação, e a partir da lise das células microbianas disponibiliza este nutriente gradativamente as gramíneas nativas, de forma condizente com o crescimento destas pastagens. Este processo de disponibilização de N a partir da biomassa microbiana pode também ser interessante quando se considera a existência de organismos diazotróficos, responsáveis pela transformação do N atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas. Embora possibilite a entrada de N no sistema, este processo é pouco caracterizado nos Campos Sulinos.

A microbiota do solo encontra-se em contínua interação, tanto entre seus componentes, como outras espécies, ocorrendo condições de sinergismo, antagonismo, parasitismo, mutualismo, entre outras. Estas interações biológicas têm um papel fundamental no funcionamento do solo, ou seja, na sua capacidade de sustentar a vida, principalmente de plantas em ecossistemas com baixa disponibilidade de nutrientes, como as pastagens nativas sul-brasileiras.

O estudo da atividade de microrganismos relacionado à ciclagem de N e P nos últimos anos tem se concentrado em dois grupos principais, nas bactérias diazotróficas, responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) e nos fungos de micorrizas arbusculares (FMAs). Compreender a dinâmica tanto de bactérias fixadoras de nitrogênio como FMAs nas pastagens nativas pode auxiliar no entendimento de sua dinâmica.

1.2 Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas nativas

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos. Os diazotróficos podem ser de vida livre, estarem associados às espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com leguminosas. A FBN é um processo regulado pela necessidade do ambiente e das espécies fixadoras, pois, a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N₂, é inativada quando submetida à presença de amônio (RUDNIK et al., 1997).

As bactérias associativas em gramíneas podem ser encontradas principalmente no solo da rizosfera, no rizoplano e no interior dos tecidos vegetais de gramíneas. As bactérias endofíticas facultativas, que habitam a rizosfera de gramíneas têm a capacidade de penetrar nas plantas, como o gênero *Azospirillum*. As bactérias que por sua habilidade de colonizar os tecidos internos das plantas e estabelecer intrínsecas relações de associação com seu hospedeiro, têm apresentado eficiente fixação de nitrogênio atmosférico, como é o caso de *Herbaspirillum* (SANTI et al., 2013).

No Brasil a pesquisa sobre diazotróficos e a sua importância para a FBN em gramíneas foi iniciada há mais de 40 anos pela pesquisadora Johanna Döbereiner. Seu primeiro trabalho com bactérias diazotróficas foi em 1953 no qual relatou pela primeira vez a ocorrência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos. A contribuição da fixação biológica de N₂ associativa que ocorre em gramíneas nativas, não é tão significativa como as simbioses, entretanto se for considerada a grande extensão de áreas recobertas por pastagens nativas esta se torna importante, em termos globais.

Tem-se verificado que áreas de pastagem com gramíneas nativas durante anos têm mantido níveis razoáveis de produtividade sem aplicação de fertilizantes nitrogenados. Conforme Thompson et al. (1984), a fixação de nitrogênio por microrganismos de vida livre provêm o maior aporte de N em muitos ecossistemas naturais, como os Campos Sulinos.

A espécie *A. paspali* é a mais estudada ecologicamente (DÖBEREINER et al., 1995), apresentando uma associação bastante específica com a gramínea *Paspalum notatum* (DÖBEREINER, 1966). Em um estudo mais detalhado da ocorrência desta bactéria diazotrófica em outras espécies de *Paspalum* (*P. plicatum*, *P. dilatatum*, *P. vergatum*), pode-se confirmar a estreita associação com a espécie *P. notatum* (DÖBEREINER, 1970). Boddey et al. (1983) utilizando a técnica de diluição de ¹⁵N demonstrou que a contribuição da fixação biológica de nitrogênio de *A. paspali* em *Paspalum notatum* é de 20 kg N ha⁻¹ ano⁻¹. Em *P.*

notatum a maior atividade de nitrogenase foi observada no solo rizosférico aderido às raízes, enquanto que somente o solo não rizosférico apresentou baixa atividade (DÖBEREINER et al., 1973).

Em trabalho realizado por Thompson et al. (1984) com raízes de 39 gramíneas nativas, entre elas *Axonopus affinis*, *P. plicatulum* e *P. dilatatum*, de ocorrência nos Campos Sulinos, foi observada a atividade da enzima nitrogenase associada a suas raízes, sendo o gênero *Azospirillum* o responsável pela maior atividade.

Resultados da medição de atividade de redução de acetileno (ARA) em solo com gramíneas nativas, entre elas *P. urvillei*, nativa dos Campos Sulinos, mostrou claramente que, embora houvesse alguma atividade nas áreas nuas, longe das plantas, esta foi bastante reforçada pela presença de plantas de *P. urvillei*, devido ao maior desenvolvimento da raiz e maior atividade ARA por unidade de massa de raízes, aparentemente incentivada pelo maior teor de umidade do solo onde esta espécie estava localizada, que para os primeiros dois anos proporcionou acréscimos de 76 Kg de N ha⁻¹, enquanto que nos anos 3 e 4 a quantidade reduziu para 37 Kg de N ha⁻¹ (MAASDORP, 1987).

Evidencia-se que modificações significativas nas propriedades físico-químicas do solo causadas por diversos usos, seja por adição ou remoção de elementos e/ou práticas de cultivo, poderão causar alterações na comunidade microbiana (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Diante disto, diversos fatores afetam os organismos do solo, tornando suas populações extremamente variáveis, sendo dependentes do tipo de solo, da vegetação e das condições climáticas, podendo ser encontradas grandes variações entre ecossistemas distintos, na mesma região ou mesmo de distintas regiões geográficas.

1.3 Fungos micorrízicos arbusculares em gramíneas nativas

As micorrizas são associações entre determinados fungos do solo e as raízes das plantas, ocorrendo de uma forma geral na natureza. Os tipos mais comuns são as micorrizas arbusculares, que ocorrem entre os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e mais de 80% das espécies vegetais, especialmente nas plantas exploradas pelo homem, existindo uma baixa especificidade de associação entre FMAs e plantas hospedeiras, pois existem em torno de 150

espécies de fungos identificados para um número muito superior de plantas que podem formar micorrizas arbusculares (BRUNDRETT, 1991).

O papel das associações micorrízicas na nutrição vegetal, em especial na absorção de fósforo, está bem comprovado. Em troca de fotossintatos, usados como fonte de energia para a formação, manutenção e funcionamento das estruturas micorrízicas, até 80% do fósforo das hifas de FMA podem ser disponibilizados ao metabolismo vegetal (MARSCHNER & DELL, 1994).

As micorrizas estendem a zona de absorção para áreas mais distantes do sistema radicular, aumentando sua área superficial específica, diminuindo as distâncias do fluxo difusivo dos íons fosfato e interceptando o fósforo após a mineralização e a solubilização mediada por outros microorganismos do solo, o que possibilita a absorção do nutriente de fontes não acessíveis ou de forma mais eficiente do que plantas não micorrizadas (GRANT et al., 2005).

Assim, com o aumento gradativo de fósforo solúvel no solo, os benefícios das micorrizas podem diminuir. Em níveis relativamente extremos de disponibilidade de fósforo e de acordo com o grau de dependência micorrízica, o crescimento de plantas micorrizadas pode ser menor do que plantas não micorrizadas, demonstrando que as relações entre os simbioss e as condições edáficas regulam os efeitos das micorrizas (GRANT et al., 2005).

Em trabalho realizado por Ryan e Ash (1999), ao avaliarem a associação micorrízica utilizando solos de três áreas de pastagens que não recebiam fertilização, ou que recebiam periódicas adições de P e N, com um histórico médio de 17 anos com tais manejos, a colonização das espécies forrageiras foi inferior nos solos fertilizados, presumivelmente porque o nível de P no solo era de duas a três vezes maiores do que os solos que não receberam fertilização.

A eficiência e a magnitude do efeito da micorriza na nutrição fosfatada para as plantas dependem de uma série de interações entre a capacidade da planta de satisfazer sua necessidade de fósforo através da associação (dependência micorrízica), a capacidade do fungo de infectar a planta hospedeira e translocar fósforo do solo para esta (eficiência fúngica) e as quantidades relativas das diferentes formas de fósforo no solo (BRUNDRETT, 1991).

Com base nas características de crescimento e morfologia radicular vegetal, apresentadas na Tabela 1, e nas relações de dependência micorrízica sugeridas por Brundrett

(1991), a plasticidade e o crescimento do sistema radicular, que estabelecem a habilidade da planta em responder as mudanças nas condições de fertilidade do solo, podem determinar a dependência da associação micorrízica. Assim, espécies de menor desenvolvimento radicular são mais dependentes da associação micorrízica e plantas com sistema radicular mais plástico, com mais raízes laterais, podem alterar facilmente a colonização, apresentando menor dependência.

Tabela 1: Características do sistema radicular correlacionados com dependência micorrízica (Brundrett, 1991).

Características	Dependência micorrízica	
	Alta	Baixa
Área de absorção superficial das raízes	Baixa	Alta
Relação comprimento / biomassa radicular	Baixa	Alta
Ramificação de raízes laterais	Pouco	Mais
Frequência de ramificação	Espaçado	Frequente
Pelos radiculares / comprimento	Poucos/curtos	Muitos/longos
Atividade do sistema radicular	Baixa	Alta
Crescimento das raízes	Baixo	Rápido
Capacidade de resposta ¹	Baixa	Alta
Formação de micorrizas	Bem regulada	Pode ser inibida

¹ Resposta das raízes a condições temporárias ou localizadas de fertilidade.

As espécies com baixa dependência micorrízica na maioria das vezes têm sistemas radiculares com raízes mais finas, com o córtex estreito, e sistemas radiculares extensos. Estas espécies possuiriam uma taxa de crescimento radicular mais rápida, principalmente quando estas são submetidas a condições de alta disponibilidade de nutrientes. As espécies de maior dependência micorrízica apresentam raízes mais grosseiras com poucos pêlos radiculares e crescimento mais lento, sendo adaptadas a ambientes menos férteis.

Em um estudo realizado por Tiecher et al. (2013) avaliando a dinâmica de uma pastagem natural no Rio Grande do Sul, submetida a um histórico de fontes de P e presença de calcário, os autores observaram uma correlação negativa da espécie *A. laevis* à elevação do pH

do solo, sugerindo que esta espécie seja mais adaptada a solos ácidos. Sendo esta espécie caracterizada por possuir lento crescimento (MACHADO et al., 2013) e considerando que, os FMAs nativos possuem uma correlação negativa com a elevação do pH (RHEINHEIMER & KAMINSKI, 1994), e que *A. laevis* seja uma espécie de dependência micorrízica, o uso do calcário não favoreceria a presença significativa desta espécie.

Estudos relacionados à micorrizas arbusculares em pastagens naturais são menos frequentes do que para sistemas agrícolas (WILSON & HARTNETT, 1997). A associação entre FMAs e gramíneas nativas pode ser considerada um importante mecanismo para a obtenção de P e água em ecossistemas naturais (BRUNDRETT, 1991), que se caracterizam pela coexistência de espécies (CHEN et al., 2005), como para as gramíneas de via metabólica C₄ existentes na América do Sul (LUGO et al., 2012).

O papel das micorrizas na obtenção de recursos no solo dos Campos Sulinos está relacionado a uma ampla gama de fatores que interagem para determinar o grau das associações, a presença de nutrientes e a resposta das espécies vegetais à elevação da fertilidade, estabelecendo o grau de dependência destas com os FMAs. Os FMAs, como um mecanismo de obtenção de nutrientes, tem o potencial de influenciar diferentes espécies de plantas, sendo o favorecimento ou não deste grupo de microrganismos um fator que pode influenciar a diversidade e sucessão de espécies de plantas neste sistema.

1.4 Referências

ANDREOLA, F.; FERNANDES, S.A.P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. In: FREITAS, S. dos S.; SILVEIRA, A. P. D. da. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. São Paulo: Instituto Agronômico de Campinas, 2007. p. 21-37.

BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizas in natural ecosystems, **Advanced Ecology Research**, v. 21, p. 171-313, 1991.

CHEN, X.; TANG, J.; ZHI, G.; HU, S. Arbuscular mycorrhizal colonization and phosphorus acquisition of plants: effects of coexisting plant species, **Soil Ecology** v. 28, p. 259–269, 2005.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P. de; FARIAS, M. F. de; FÁTIMA V. de. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, p. 213-218, 2009.

DAKORA, F,D.; PHILLIPS, D,A, Root exudates as mediators of mineral acquisition Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments, *Plant and Soil*, v. 245, p. 35-47, 2002.

DÖBEREINER, J. **Azotobacter em solos ácidos. Boletim do Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícolas**, Rio de Janeiro v. 11, p. 1-36, 1953.

DÖBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum*. **Zentralblatt fuer Bakteriologie, Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene**, v. 124, p. 233-230, 1970.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

FILHO, J. A. C.; MINHONI, M. T. de A. Interações Microbianas e Controle de Fitopatógenos na Rizosfera. In: FREITAS, S. dos S.; SILVEIRA, A. P. D. da. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. São Paulo:Instituto Agronômico de Campinas, 2007. p. 239-258.

GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. dos S.; BRUNETTO, G. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1085-1091, 2008.

GRANT, C.; BITTMAN, S.; MONTREAL, M.; PLENCHETTE, C.; MOREL, C. Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, p. 3–14, 2005.

HARTNETT, D.C.; WILSON. G.W.T. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. **Plant and Soil**. v. 244, p. 319–331, 2002.

LUGO, M.A.; NEGRITTO, M.A.; JOFRE, M.; ANTON, A.; GALETTO, L. Colonization of native Andean grasses by arbuscular mycorrhizal fungi in Puna: a matter of altitude, host photosynthetic pathway and host life cycles. **Microbiology Ecology**, v. 81, p. 455–466, 2012.

MAASDORP, B. V. Contribution of associative N₂-fixation (acetylene reduction) in some grassland ecosystems in Zimbabwe. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, p. 7-12, 1987.

MACHADO, J.M.; ROCHA, M.G DA.; QUADROS, F.L.F.DE.; CONFORTIN, A.C.C.; SANTOS, A.B.DOS.; SICHONANY, M.J.DE.O.; RIBEIRO, L.A.; ROSA, A.T.N.DA.; Morphogenesis of native grasses of Pampa Biome under nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p. 22-29, 2013.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, p. 159, v. 89-102, 1994.

MOHAMMADI, K.; KHALESRO, K.; SOHRABI, Y.; HEIDARI, G. A Review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. **Journal of Applied Environmental and Biological Sciences**, v. 1, p. 310-319, 2011.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2^a ad. UFLA, Lavras, Brasil. 2006, 729 p.

OLIVEIRA, L. B. de; TIECHER, T.; QUADROS, F.L.F. de; SANTOS, D.R.dos. Fósforo microbiano em solos sob pastagem natural submetida à queima e pastejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1509-1515, 2011.

O'CONNOR, K. F. Nitrogen balances in natural grasslands and extensively-managed grassland systems. **New Zealand Journal of Ecology**, v. 6, p. 1-18, 1983.

RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. Resposta do capim-pensacola à adubação fosfatada e à micorrização em solo com diferentes valores de pH. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 201-205, 1994.

RUDNIK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology Biochemistry**, v. 29, p. 831-841, 1997.

RYAN, M.; ASH, J. Effects of phosphorus and nitrogen on growth of pasture plants and VAM fungi in SE Australian soils with contrasting fertiliser histories (conventional and biodynamic). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 73, p. 51–62, 1999.

SANTI, C.; BOGUS, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743 –767, 2013.

TIECHER, T.; SANTOS, D.R.DOS.; KAMINSKI, J.; CALEGARI, A. Forms of inorganic phosphorus in soil under different long term soil tillage systems and winter crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36 p. 271-281, 2012.

TIESSEN, H.; STEWART, W.B.; MOIR, J.O. Changes in organic and inorganic phosphorus composition of two grassland soils and their particle size fractions during 60-90 years of cultivation. **European Journal of Soil Science**, v. 34, p. 815-823, 1983.

WILSON, G.T.; HARTNETTE, D.C. Effects of mycorrhizae on plant growth and dynamics in experimental tallgrass prairie microcosms. **American Journal of Botany**, v. 84, p. 478-482, 1997.

2. HIPÓTESES

Nos ecossistemas de pastagens naturais, as limitações de fertilidade impostas pelo solo condicionaram as espécies vegetais, ao longo do processo evolutivo, a desenvolverem mecanismos que auxiliassem na captura e obtenção de recursos, em especial nutrientes. Uma das respostas adaptativas das plantas à baixa disponibilidade de nitrogênio (N) é a associação com bactérias diazotróficas, uma forma de obter N, via microrganismos. Considerando a nutrição de fósforo (P), a associação com fungos micorrízicos arbusculares é um importante mecanismo que ocorre nos ecossistemas naturais e que auxilia na absorção deste nutriente. As pastagens dos Campos Sulinos são compostas por um grande número de gramíneas forrageiras nativas, normalmente dotadas de estratégias de aquisição de nutrientes. Nos ambientes onde a limitação de fertilidade é maior, ocorrem espécies com lentas taxas de crescimento. Nos locais com maior disponibilidade de nutrientes, ocorrem espécies com maior capacidade de resposta à fertilização, podendo o aumento da fertilidade do solo apresentar efeitos sobre estas associações. Considerando estes aspectos foram criadas as seguintes hipóteses.

(a) O uso de adubação com N e P tem um efeito negativo sob a ocorrência dos principais gêneros de bactérias diazotróficas. As espécies nativas de menor taxa de crescimento relativo apresentem uma maior contribuição do N via FBN, enquanto que as espécies com características de crescimento relativamente mais rápido são mais dependentes de outros mecanismos de captura de nutrientes do solo.

(b) As gramíneas nativas dos Campos Sulinos de maior resposta à fertilização, adaptadas a ambientes mais férteis, possuem baixa dependência micorrízica, e quando submetidas a elevação na disponibilidade de nutrientes reduzem a micorrização, já as espécies de maior dependência micorrízica, quando submetidas a elevação na disponibilidade de nutrientes, não alteram a sua micorrização radicular, sendo espécies mais adaptadas a ambientes de menor fertilidade.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar aspectos microbiológicos e bioquímicos envolvidos na dinâmica do fósforo e nitrogênio na associação micorrízica e fixação biológica de nitrogênio em gramíneas forrageiras nativas dos Campos Sulinos.

3.2 Objetivos específicos

Foram elaborados dois objetivos específicos, os quais serviram também de estratégia de estudo, sendo abordado um em cada estudo do presente trabalho.

- 1- Avaliar a ocorrência de três gêneros de bactérias diazotróficas no sistema radicular sob fertilização com N e P, e determinar a contribuição de N via FBN em quatro espécies de gramíneas nativas de maior contribuição na massa de forragem das pastagens naturais dos Campos Sulinos.
- 2- Avaliar o comportamento da associação entre FMAs e quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com P e N.

4. CAPÍTULO I

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM GRAMÍNEAS NATIVAS DOS CAMPOS SULINOS

Resumo: As bactérias diazotróficas associativas com gramíneas desempenham papel relevante para as espécies das pastagens naturais sob solos pobres, podendo o uso de fertilizantes afetar esta associação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta da associação de quatro gramíneas nativas e três gêneros de bactérias diazotróficas, sob fertilização com N e P, e determinar a contribuição da FBN através da técnica da abundância natural de ^{15}N . Foram utilizadas quatro gramíneas de maior abundância nas pastagens naturais dos Campos Sulinos no Rio Grande do Sul: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* e *Aristida laevis* cultivadas em vasos de 5 Kg, em casa de vegetação, arranjados em blocos casualizados com quatro repetições, sendo conduzidos dois estudos. No primeiro foram aplicados dois tratamentos: 50 mg Kg^{-1} de solo de P + 100 mg Kg^{-1} de N solo (NP); e uma testemunha. Foram avaliados, o número de bactérias diazotróficas com os meios LG, NFB e JNFb, utilizados para o isolamento dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, respectivamente, na rizosfera, rizoplane e endorizoplane, e o teor de N na matéria seca de parte aérea e raiz. No segundo estudo foi determinada a contribuição da FBN através da técnica da abundância natural de ^{15}N . A colonização aumentou com o tempo, no entanto a adubação com N e P reduziu a colonização. A adubação aumentou o teor de N na parte aérea, e a produção de matéria seca. A espécie *A. laevis* demonstrou ser mais dependente da fixação biológica de N que as demais espécies. A espécie *P. notatum* em comparação às demais espécies demonstrou ser mais hábil em absorver o N disponível no solo. Desta forma conclui-se que a adubação com N e P reduz a colonização de bactérias diazotróficas, aumentando a produção de matéria seca e teor de N no tecido. A espécie *A. laevis* apresentou a maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio, já *P. notatum* apresentou maior acúmulo de N do solo.

Palavras-chave: Rizosfera. Exsudatos radiculares. Abundância natural de ^{15}N . Bactérias associativas.

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN NATIVE GRASSES OF THE SOUTHERN FIELDS

Abstract: Diazotrophic bacteria associated with grasses play a relevant role for the species from natural grasslands in low fertility soils and the use of fertilizers could affect this association. The objective of this study was to evaluate the association of four native grasses and three genera of diazotrophic bacteria under fertilization with N and P, to determine the contribution of BNF using the technique of the natural abundance of ^{15}N . Four most abundant grasses in natural pastures of Campos grasslands at Rio Grande do Sul were used: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* and *Aristida laevis* grown in pots of 5 Kg in a greenhouse in a randomized block design with four replications, being conducted two studies. In the first two treatments were applied: 50 mg kg^{-1} soil P and 100 mg kg^{-1} of soil N (NP); and a control. Number of diazotrophic bacteria was assessed with LG, NFB and JNFb means used for the isolation of the genera *Azotobacter*, *Azospirillum* and *Herbaspirillum*, respectively, in the rhizosphere soil, surface of the washed roots (rhizoplane) and macerated roots (endorizoplane) and also N content in dry matter of shoot and root. In the second study the contribution of BNF was determined by the technique of natural ^{15}N abundance. Colonization increased with periods because of greater root exudation; however, fertilization with N and P reduced colonization, possibly being related to lower exudation and decreased root colonization. Fertilization stimulated a higher N content and higher dry matter production. *A. laevis* demonstrate to be more dependent on biological N fixation than the other species. The grass *P. notatum* compared with other species demonstrated to be more efficient to absorb available soil N. Thus it is concluded that fertilization with N and P reduces colonization of diazotrophic bacteria, increasing the dry matter production and N content in the tissue. *A. laevis* showed the highest contribution of biological nitrogen fixation, while *P. notatum* showed higher N accumulation in soil.

Key words: Rhizosphere. Root exudates. Natural abundance of ^{15}N . Associative bacteria.

4.1 Introdução

As pastagens naturais existentes no sul do Brasil são caracterizadas por apresentar solos de baixa fertilidade natural (PALLARÉS et al., 2005), sendo compostas majoritariamente por gramíneas C₄ (BURKAT, 1975). A principal atividade socioeconômica desenvolvida sob estas pastagens é a pecuária de corte, conduzida na sua maioria de maneira extensiva, com a alimentação do rebanho constituída, principalmente, por espécies forrageiras nativas.

As gramíneas existentes neste ecossistema são adaptadas a estas condições de clima e solo, produzindo expressiva quantidade de forragem, mesmo sob tais condições de fertilidade. Em geral no manejo destas pastagens a aplicação de fertilizantes é baixa, embora existam trabalhos que sugerem o uso de adubação fosfatada (GATIBONI et al., 2000) e nitrogenada (SANTOS et al., 2008; SIEWERDT et al., 1995) para o aumento da produção de forragem.

Nestes agroecossistemas, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), associada às gramíneas constitui uma etapa importante no ciclo do nitrogênio (N) (O'CONNOR, 1983) e está relacionada à produtividade natural do ecossistema. A FBN é o processo de incorporação do N atmosférico à biomassa vegetal. Este processo é realizado por uma pequena parcela de microrganismos procariotos através da enzima nitrogenase, responsável por transformar o N₂ na forma inorgânica NH₃, tornando o N disponível as plantas. Os organismos com esse aparato enzimático são denominados diazotróficos (SANTI et al., 2013).

As bactérias diazotróficas dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* são importantes na disponibilização do N atmosférico às gramíneas nativas (BRASIL et al., 2005; DÖBEREINER et al., 1973; THOMPSON et al., 1984). A FBN por microorganismos de vida livre em ambientes naturais, como no caso das pastagens naturais, é uma das principais formas de entrada de N para a nutrição e manutenção do crescimento de espécies não leguminosas (THOMPSON et al., 1984; MEDINA & IZAGUIRRE, 2004). Nesse sentido, trabalhos de pesquisas realizadas nas décadas de 60 a 80 evidenciaram a contribuição considerável da FBN para a nutrição nitrogenada de algumas gramíneas forrageiras.

Através da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, Boddey et al. (1983) demonstraram que a gramínea *Paspalum notatum* ecotipo Batatais obteve 10 % de seu N (20 kg ha⁻¹ ano⁻¹) via FBN. Ainda em *Paspalum notatum*, Döbereiner et al. (1973) demonstraram que a atividade de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas pode fixar até 90 kg N ha⁻¹ ano⁻¹. Em estudo de

Maasdorp (1987) com gramíneas nativas, foi observado um aumento da FBN pela presença de plantas de *P. urvillei*, espécie nativa dos Campos Sulinos, com acréscimos variando de 37 a 76 Kg de N ha⁻¹ ano⁻¹, conforme maior teor de umidade do solo onde esta espécie estava localizada. Assim, as bactérias diazotróficas podem contribuir no suprimento de parte do N necessário às gramíneas nativas, onde em ambientes naturais, a FBN por microorganismos de vida livre, proporciona o maior aporte de N que entra nestes sistemas (THOMPSON et al., 1984).

Mesmo assim, há poucas informações disponíveis publicadas sobre a incorporação do N proveniente da associação das bactérias diazotróficas com as mais de 400 gramíneas nativas dos Campos Sulinos, já caracterizadas por possuírem distintas taxas de crescimento relativo (MACHADO et al., 2013; QUADROS et al., 2009; SANTOS et al., 2013).

Assim, o presente trabalho foi conduzido com os objetivos de (a) avaliar a ocorrência de três gêneros de bactérias diazotróficas no sistema radicular de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com N e P, e (b) quantificar a contribuição do N fixado via FBN nestas plantas.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Local, solo e espécies utilizadas

Para atender o objetivo do presente trabalho foram realizados dois estudos conduzidos no período de maio de 2012 a maio de 2013, em casa de vegetação, em Santa Maria, Rio Grande do Sul (29°43' S, 53°42' W). Em ambos, foi utilizado um Argissolo Vermelho distrófico, coletado na camada de 0-20 cm, em uma área de pastagem natural, sem histórico de adição de fertilizante. Após a coleta, o solo foi seco á sombra e ao ar, peneirado em malha de 4 mm e acomodado em vasos de 5 Kg. As principais características físicas e químicas do solo são: 18% de Argila; 25 g kg⁻¹ de matéria orgânica; pH_(água 1:1) de 4,6; 30,6% de Al; 26,5% de saturação de bases; 6,2 cmol_c dm⁻³ de CTC efetiva; 2,8 cmol_c dm⁻³ de Ca, 1,4 cmol_c dm⁻³ de Mg, 3 mg kg⁻¹ de P_(Mehlich⁻¹) e 76 mg kg⁻¹ de K_(Mehlich⁻¹).

Para os dois estudos, foram selecionadas quatro gramíneas forrageiras de maior ocorrência nas pastagens naturais dos Campos Sulinos, no Rio Grande do Sul: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* e *Aristida laevis*. As espécies de plantas foram coletadas no mês de maio em uma pastagem natural de onde se utilizou o solo e foram transplantadas para os vasos na forma de mudas (5 filhotes por vaso).

4.2.2 Condução dos experimentos e tratamentos

Para ambos os estudos a umidade do solo foi mantida a 70% da capacidade de campo com a pesagem diária dos vasos. Para a coleta dos valores de temperatura (Tabela 2), foi utilizado um data logger marca HOBO[®], modelo U12.

Tabela 2: Temperatura média mensal do ar no interior da casa de vegetação durante o período de condução dos estudos.

Ano	Mês	Dias	Temperatura média (°C)
2012	Setembro [*]	11-30	20,1
	Outubro [*]	1-31	22,1
	Novembro [*]	1-30	24,1
	Dezembro [*]	1-31	26,3
	Janeiro [*]	1-31	26,1
	Fevereiro ^{**}	5-28	24,1
2013	Março ^{**}	1-31	22,2
	Abril ^{**}	1-30	20,3
	Maió ^{**}	1-14	20,1

^{*}Período de condução do primeiro estudo; ^{**}Período de condução do segundo estudo.

4.2.2.1 Experimento I

Para o Experimento I, as espécies passaram por um período de aclimação de maio a setembro de 2012. Em 12 de setembro foi realizado um corte de uniformização a 5 cm do solo e foram aplicados os seguintes tratamentos: aplicação de 50 mg kg⁻¹ de P + 100 mg kg⁻¹ de N (N+P); e uma testemunha, sem aplicação de P e N. A forma de aplicação de P foi o fosfato de potássio (KH₂PO₄) e de N foi nitrato de amônio (NH₄NO₃). Na testemunha, o nível de potássio foi equilibrado ao tratamento N+P com cloreto de potássio (KCl). As espécies em combinação com os tratamentos foram arranjadas em um delineamento de blocos completamente casualizados, com quatro repetições, cada repetição em triplicata, referentes a três períodos de coleta. O critério de bloqueamento foi um gradiente de temperatura existente na casa de vegetação.

4.2.2.2 Experimento II

No experimento II, foram cultivadas as mesmas espécies do experimento anterior implantadas em 5 de fevereiro de 2013 e cultivadas até 14 de maio de 2013. O experimento foi conduzido em um delineamento de blocos completamente casualizados, com quatro repetições, e as espécies foram considerados os tratamentos. Além das quatro espécies testes foram cultivadas, como plantas testemunhas não fixadoras de nitrogênio, *Raphanus sativus* L., *Bidens pilosa* e *Sida rhombifolia* L.

4.2.3 Coleta das amostras

O critério determinante para a coleta das espécies foi a duração da alongação foliar de 2,5 folhas, expressa em graus dias (GD), 832,5 GD para *Aristida laevis* e 437 GD para as espécies *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis* (Machado et al., 2013). Sendo a soma térmica o intervalo entre coletas, o uso deste critério visa respeitar os diferentes ritmos de crescimento que estas espécies possuem.

4.2.3.1 Experimento I

Para o primeiro ensaio as espécies foram coletadas em três períodos distintos. *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis* foram coletadas nos dias 27/10, 10/11 e 27/11/2012, equivalente a 45, 60 e 76 dias após o início do estudo. *Aristida laevis* 27/11, 15/12/2012 e 03/01/2013, equivalente a 76, 95 e 113 dias após o início do estudo. As plantas foram separadas nos componentes parte aérea e raiz. Para retirada das raízes, o solo dos vasos foi peneirado em malha de 4 mm, após as raízes foram lavadas com água destilada. O material da parte aérea e radicular foi acondicionado em sacos de papel, e seco em estufa com circulação de ar a 65 °C por 72 horas até peso constante para determinação da massa de matéria seca. Após pesado, o material seco foi moído em moinho tipo Wiley em malha de 1 mm para determinação da concentração de N no tecido. Foram coletadas amostras úmidas de raízes com solo aderido, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor e armazenadas em geladeira, por até sete dias, até a análise.

4.2.3.2 Experimento II

No segundo estudo, a data da coleta das espécies foi quatro vezes a soma térmica estimada. *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis* foram coletadas no dia 8 de abril, 62 dias após o início do experimento (4×437 GD). *Aristida laevis* foi coletada dia 14 de maio, 98 dias após o início do estudo (4×832,5 GD). O material da parte aérea foi acondicionado em sacos de papel e seco em estufa com circulação de ar a 65°C por 72 horas até peso constante para determinação da matéria seca. Após pesado, o material foi moído em moinho tipo Wiley em malha de 1 mm, e macerado em almofariz de porcelana, para determinação do teor de N total e do delta de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$).

4.2.4 Medidas e determinações

4.2.4.1 Experimento I

A análise do teor de nitrogênio total foi realizada conforme Tedesco et al., (1995), com a digestão de 0,2 g de tecido com 0,7 g de mistura de digestão (100 g de Na₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O e 1 g de selênio) em ácido sulfúrico (H₂SO₄) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em bloco a 350 °C, após 20 mL do estrato foi destilado com 5 mL de NaOH 10M, em destilador de arraste de vapor micro-Kjeldahl, até se coletar 40 mL, e este titulado com H₂SO₄ (0,025 M) até atingir coloração rosada.

Para a determinação do número de bactérias diazotróficas, utilizou-se o método do Número Mais Provável (NMP) (DÖBEREINER et al., 1995). As amostras úmidas foram separadas em três frações: rizosfera (solo aderido às raízes), rizoplano (superfície das raízes lavadas com água destilada), e endorizoplano (raízes desinfestadas com cloramina-T 1 % e maceradas com solução salina). Retirou-se 1g das frações rizosfera e rizoplano, que foram agitadas em 9 mL de solução salina por cinco minutos. O endorizoplano foi obtido a partir de 1g das raízes esterilizadas e maceradas em 9 mL de solução salina. Alíquotas de 1 mL de cada fração foram diluídas de forma seriada em 9 mL de solução salina, feitas diluições 10⁻² até 10⁻⁵. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas em triplicata em frascos de 12 mL contendo 5 mL dos meios semi-sólidos sem nitrogênio LG, NFb e JNFb, utilizados para o isolamento de *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, respectivamente. O gênero *Herbaspirillum* foi quantificado somente na endorizosfera, pois é caracterizado por ser principalmente endofítico (MONTEIRO et al., 2012). Os meios de cultura foram incubados a 28 °C por sete dias. Após foi realizada a contagem dos tubos negativos e positivos, sendo considerados tubos com crescimento positivo aqueles que apresentavam a película característica de crescimento de bactérias diazotróficas na condição microaerofílica. A determinação do número de bactérias foi realizada utilizando a tabela de Mc Crady para três diluições.

4.2.4.2 Experimento II

A avaliação da contribuição da FBN associada às espécies nativas, foi estimada em analisador elementar (modelo FlashEA 1112, Thermo Finnigan, Milan, Itália), utilizando-se a técnica da abundância natural de ¹⁵N (SHEARERE & KOHL, 1986). De acordo com esta

técnica, a contribuição percentual de nitrogênio derivado da FBN para as espécies foi calculada através da fórmula:

$$\% FBN = \left(\frac{(\delta^{15} \text{ N na planta testemunha} - \delta^{15} \text{ N na planta teste})}{(\delta^{15} \text{ N na planta testemunha} - B)} \right) * 100$$

Onde: $\delta^{15} \text{ N}$ da planta testemunha: valor de $\delta^{15} \text{ N}$ do solo obtido através de plantas não fixadoras, utilizadas como referência; $\delta^{15} \text{ N}$ da planta teste: valor de $\delta^{15} \text{ N}$ da planta fixadora de N_2 (pastagem); B: valor da discriminação isotópica de ^{15}N feita pelas plantas durante o processo de FBN. Em plantas não nodulantes, o fracionamento isotópico, parece não ser da mesma magnitude que em plantas nodulantes, portanto para gramíneas, o valor B da fórmula geral foi considerado 0 (zero) (SHEARERE & KOHL, 1986).

A partir desta análise, com base no teor de N total e do valor de $\delta^{15}\text{N}$, se obteve a taxa de fixação de N, teor de N no tecido, teor de N no tecido derivado da FBN. Multiplicando-se o teor de N pela massa produzida calculou-se o N total acumulado no tecido. Multiplicando a massa produzida pelo teor de N via FBN obteve-se o N acumulado via FBN. Subtraindo o N acumulado via FBN do N total acumulado no tecido obteve-se o N absorvido do solo.

4.2.5 Análises estatística

4.2.5.1 Experimento I

A análise estatística do número de bactérias foi realizada por um teste de comparação de médias via aleatorização, com os valores previamente transformados em logaritmo, utilizando a distância euclidiana como medida de semelhança, em que a adubação, período e fração foram os fatores de agrupamento, sendo consideradas as diferenças apenas quando $p < 0,05$. A análise multivariada foi realizada no software MULTIV (Pillar, 2006). A escolha da abordagem analítica com estatística não paramétrica se deveu a falta de normalidade e homocedasticidade dos erros experimentais nos valores, pressupostos para a análise de variância paramétrica.

A análise de variância (ANOVA) dos valores de produção de matéria seca de raiz e parte aérea, e teor de N na raiz e parte aérea, foram testadas quanto a sua homocedasticidade,

quando necessário, se utilizou transformação logarítmica. As variáveis foram analisadas para cada espécie de planta seguindo o modelo bifatorial, período × tratamento, como segue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + (AD)_{ij} + B_k + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} é o valor observado, referente a variável Y ; μ = média geral experimental; A_i = o efeito do fator A, período ($i = 1, 2, 3$); D_j o efeito do fator D, adubação ($j = 1, 2$); $(AD)_{ij}$: é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível j do fator D; B_k é o efeito aleatório do bloco k ; e_{ijk} = erro experimental. Quando os efeitos dos tratamentos foram significativos a 5% de probabilidade, as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

4.2.5.2 Experimento II

Para o segundo estudo, os valores de cada variável foram analisados quanto a sua homocedasticidade, quando necessário, se utilizou transformação logarítmica. A análise de variância (ANOVA) de todas as variáveis foi realizada comparando as espécies, seguindo o modelo matemático em blocos casualizados, com quatro repetições, como segue:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + T_j + e_{ij}$$

Onde Y_{ij} é o valor observado, referente a variável Y ; μ = média geral experimental; B = blocos ($i = 1, 2, 3, 4$); T = o efeito das tratamentos, espécies ($j = 1, 2, 3, 4$); e_{ij} = erro experimental. Quando os efeitos dos tratamentos foram significativos a 5% de probabilidade, as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

4.3 Resultados

4.3.1 Número de bactérias diazotróficas

A ocorrência dos gêneros de bactérias *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* nas plantas foi confirmada (Tabelas 3 e 6). O número de bactérias, no experimento I, do gênero *Azotobacter* na média das quatro espécies de plantas foi 13% menor com a adição de N+P em relação à testemunha. Para o gênero *Azospirillum* ocorreu redução de 10 a 16% no número de organismos com a aplicação de N+P, exceto para a espécie *A. laevis*. O número de bactérias do

gênero *Herbaspirillum* para a espécie e *A. laevis* foi semelhante, no entanto, para *A. affinis*, *P. notatum* e *A. lateralis* foi 17, 15 e 6% menor com a adição de N+P, respectivamente.

Para as quatro espécies de planta, o número de bactérias dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* foi crescente, apresentando no terceiro período, em média, 34, 61 e 66%, respectivamente, maior em relação ao primeiro período (Tabela 3). Para todas as espécies, a colonização de bactérias do gênero *Azotobacter* e *Azospirillum* foi 10% maior nas frações rizoplano e rizosfera em relação ao endorizoplano.

Tabela 3: Logaritmo (Log_{10}) do número de bactérias encontradas no experimento I nos meios seletivos NFb (*Azospirillum*), LG (*Azotobacter*) e JNFb (*Herbaspirillum*), nos tratamentos testemunha (Test) e N+P, nas frações endorizoplano (ER), rizoplano (RP) e solo da rizosfera (SR) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos.

Espécie	Tratamento		Período			Fração		
	Test	N+P	27/10-27/11*	10/11-15/12*	27/11-03/01*	ED	RP	SR
----- LG (<i>Azotobacter</i>) -----								
<i>Axonopus affinis</i>	6,1 ^a	5,2 ^b	4,7 ^c	5,7 ^b	6,6 ^a	5,3 ^b	5,9 ^a	5,8 ^a
<i>Paspalum notatum</i>	6,0 ^a	5,2 ^b	4,7 ^c	5,5 ^b	6,6 ^a	5,4 ^b	5,8 ^a	5,7 ^a
<i>Andropogon lateralis</i>	6,6 ^a	5,7 ^b	5,7 ^c	6,1 ^b	6,8 ^a	5,8 ^b	6,4 ^a	6,3 ^a
<i>Aristida laevis</i>	6,1 ^a	5,4 ^b	5,1 ^b	5,4 ^b	7,0 ^a	5,5 ^b	5,9 ^a	6,1 ^a
----- NFb (<i>Azospirillum</i>) -----								
<i>Axonopus affinis</i>	6,1 ^a	5,3 ^b	4,4 ^c	5,3 ^b	7,2 ^a	5,4 ^b	5,9 ^a	5,8 ^a
<i>Paspalum notatum</i>	6,2 ^a	5,2 ^b	4,2 ^c	5,1 ^b	7,8 ^a	5,5 ^b	5,9 ^a	5,8 ^a
<i>Andropogon lateralis</i>	6,4 ^a	5,7 ^b	4,8 ^c	5,9 ^b	7,4 ^a	5,7 ^b	6,0 ^a	6,1 ^a
<i>Aristida laevis</i>	5,7 ^{ns}	5,9	4,9 ^c	5,7 ^b	6,9 ^a	5,4 ^b	6,0 ^a	6,1 ^a
----- JNFb (<i>Herbaspirillum</i>) -----								
<i>Axonopus affinis</i>	6,3 ^a	5,2 ^b	4,7 ^b	5,0 ^b	7,4 ^a			
<i>Paspalum notatum</i>	6,6 ^a	5,6 ^b	5,1 ^b	5,3 ^b	8,0 ^a			
<i>Andropogon lateralis</i>	6,1 ^a	5,8 ^b	5,2 ^b	5,1 ^b	7,5 ^a			
<i>Aristida laevis</i>	5,3 ^{ns}	5,0	3,8 ^b	3,9 ^b	7,8 ^a			

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ns= não significativo. * As datas 27/11/2012; 15/12/2012 e 03/01/2013 são referentes à espécie *Aristida laevis*.

No experimento II a colonização dos gêneros *Azotobacter* e *Azospirillum* foi igual para as quatro espécies de plantas (Tabela 4). O gênero *Herbaspirillum* apresentou a maior colonização na espécie *A. laevis*. Os gêneros *Azotobacter* e *Azospirillum* apresentaram a maior colonização no rizoplano e no solo da rizosfera, mesmo comportamento do experimento I.

Tabela 4: Logaritmo (Log_{10}) do número de bactérias encontradas no experimento II nos meios seletivos NFb (*Azospirillum*), LG (*Azotobacter*) e JNFb (*Herbaspirillum*), nas frações endorizoplano (ER), rizoplano (RP) e solo da rizosfera (SR) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos.

Espécie				Fração		
<i>Axonopus affinis</i>	<i>Paspalum notatum</i>	<i>Andropogon lateralis</i>	<i>Aristida laevis</i>	ER	RP	SR
----- LG (<i>Azotobacter</i>) -----						
4,5 ^a	4,7 ^a	4,7 ^a	4,6 ^a	4,2 ^b	4,8 ^a	4,9 ^a
----- NFb (<i>Azospirillum</i>) -----						
5,1 ^a	5,2 ^a	4,9 ^a	5,2 ^a	4,5 ^b	5,5 ^a	5,2 ^a
----- JNFb (<i>Herbaspirillum</i>) -----						
5,3 ^b	5,2 ^b	5,1 ^b	5,9 ^a			

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.3 2 Produções de matéria seca e teor de nitrogênio

Para as espécies *A. affinis*, *P. notatum*, *A. lateralis* e *A. laevis* a produção de matéria seca de raiz (MSR) com a adubação de N+P foi 45, 43, 45 e 81% maior em relação a testemunha, respectivamente, (Tabela 5). No terceiro período, a produção de MSR para *A. affinis*, *P. notatum*, *A. lateralis* e *A. laevis* foi 144, 128, 272 e 319% maior em relação ao primeiro período.

Tabela 5: Produção de matéria seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função de períodos e fertilização com fósforo e nitrogênio (N+P) e testemunha.

	Espécies			
	<i>Axonopus affinis</i>	<i>Paspalum notatum</i>	<i>Andropogon lateralis</i>	<i>Aristida laevis</i>
	MSR (g vaso ⁻¹)			
<i>Tratamento</i>				
Testemunha	4.0 ^b	7.6 ^b	5.5 ^b	3.8 ^b
N+P	5.8 ^a	10.9 ^a	8.0 ^a	6.9 ^a
<i>Período</i>				
27/10-27/11***	2.9 ^c	5.7 ^c	3.3 ^b	2.1 ^b
10/11-15/12***	4.7 ^b	9.1 ^b	4.7 ^b	5.2 ^a
27/11-03/01***	7.1 ^a	13.0 ^a	12.3 ^a	8.8 ^a
<i>Nível de significância (P=)</i>				
Tratamento (T)	**	**	*	*
Período (P)	**	**	**	**
Interação T×P	ns	ns	ns	ns
CV ¹	13	8	23	35
	MSPA (g vaso ⁻¹)			
<i>Tratamento</i>				
Testemunha	8.5 ^b	15.1 ^b	4.9 ^b	8.3 ^b
N+P	22.5 ^a	28.8 ^a	11.1 ^a	13.5 ^a
<i>Período</i>				
27/10-27/11***	9.3 ^c	12.7 ^b	2.2 ^c	5.1 ^b
10/11-15/12***	14.2 ^b	24.1 ^a	8.5 ^b	13.7 ^a
27/11-03/01***	22.9 ^a	29.1 ^a	13.4 ^a	14.0 ^a
<i>Nível de significância (P=)</i>				
Tratamento (T)	**	**	**	*
Período (P)	**	**	**	**
Interação T×P	ns	ns	ns	ns
CV ¹	5	7	14	19

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ($p \geq 0.05$); ** Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$); ¹ Coeficiente de variação; *** As datas 27/11/2012; 15/12/2012 e 03/01/2013 são referentes à espécie *Aristida laevis*.

A produção de matéria seca de parte aérea (MSPA) com N+P foi, 164, 90, 126, e 62 % maior em relação a testemunhas para as espécies, *A. affinis*, *P. notatum*, *A. lateralis* e *A. laevis* respectivamente. No terceiro período de avaliação a produção de MSPA foi 146, 129, 509 e 174% maior em relação ao primeiro período, para as espécies, *A. affinis*, *P. notatum*, *A. lateralis* e *A. laevis* respectivamente.

O teor de N na MSR de *A. affinis* e *P. notatum* foi similar entre a testemunha e a adubação com N+P, para *A. lateralis* e *A. laevis* o teor de N na MSR com a adubação de N+P foi 28 e 16% maior em relação a testemunha, respectivamente, (Tabela 6). No terceiro período,

o teor de N na MSR para as espécies foi similar ao primeiro período, embora a espécie *A. affinis* tenha diluído 30% do N da MSR em relação ao primeiro período.

Tabela 6: Teor de nitrogênio na matéria seca de raiz (N-MSR) e parte aérea (N-MSPA) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função de períodos e fertilização com fósforo e nitrogênio (N+P) e testemunha.

	Espécies			
	<i>Axonopus affinis</i>	<i>Paspalum notatum</i>	<i>Andropogon lateralis</i>	<i>Aristida laevis</i>
	N-MSR (%)			
<i>Tratamento</i>				
Testemunha	0,9 ^a	0,5 ^a	0,7 ^b	0,6 ^b
N+P	0,9 ^a	0,6 ^a	0,9 ^a	0,8 ^a
<i>Período</i>				
27/10-27/11 ***	1,0 ^a	0,6	0,7 ^a	0,7
10/11-15/12 ***	0,9 ^a	0,5	0,7 ^a	0,7
27/11-03/01 ***	0,7 ^b	0,5	0,8 ^a	0,6
<i>Nível de significância (P=)</i>				
Tratamento (T)	**	**	**	**
Período (P)	**	ns	**	ns
Interação T×P	ns	ns	ns	ns
CV ¹	14	18	16	17
	N-MSPA (%)			
<i>Tratamento</i>				
Testemunha	1,2 ^b	1,0 ^b	1,2 ^b	1,0 ^b
N+P	1,7 ^a	1,5 ^a	1,8 ^a	1,2 ^a
<i>Período</i>				
27/10-27/11 ***	1,9 ^a	1,6 ^a	1,8 ^a	1,3 ^a
10/11-15/12 ***	1,5 ^b	1,1 ^b	1,6 ^b	1,0 ^b
27/11-03/01 ***	0,8 ^c	1,0 ^b	1,2 ^c	1,0 ^b
<i>Nível de significância (P=)</i>				
Tratamento (T)	**	**	**	**
Período (P)	ns	*	**	**
Interação T×P	ns	ns	ns	ns
CV ¹	11	10	9	13

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ($p \geq 0.05$); ** Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0.01$); * significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$); ¹ Coeficiente de variação; *** As datas 27/11/2012; 15/12/2012 e 03/01/2013 são referentes à espécie *Aristida laevis*.

O teor de N na MSPA de todas as espécies foi maior com a adubação de N+P (Tabela 6). No terceiro período, o teor de N na MSPA para *A. affinis*, *P. notatum*, *A. lateralis* foi 41, 50 e 50% maior na adubação com N+P, já *A. laevis* apresentou 20% de aumento. Em relação aos períodos, as espécies *A. affinis*, *P. notatum*, *A. lateralis* e *A. laevis* apresentaram aumentos de 57, 37, 33 e 23%, em relação ao primeiro período.

4.3.3 Abundância natural de ^{15}N

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ para as espécies *A. affinis*, *A. lateralis* e *A. laevis* foram em média 10,3% menores em relação a *P. notatum* (Tabela 7). O teor de N no tecido da parte aérea foi maior nas espécies *A. lateralis* e *A. laevis*, em comparação as espécies *A. affinis* e *P. notatum* (Tabela 7). O teor de N via FBN (N-FBN) e a taxa de fixação de N (TFN) da espécie *A. laevis* foram maiores em relação às demais espécies. O menor teor de N-FBN e TFN foi da espécie *P. notatum*.

Tabela 7: Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), teor de N no tecido (N), teor de N no tecido via FBN (N-FBN), taxa de fixação de N (TFN), N total acumulado no tecido (NTA), N acumulado via FBN (NA-FBN), N absorvido do solo (N-Solo), matéria seca de parte aérea (MSPA) e matéria seca de raiz (MSR) de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos.

Espécie	$\delta^{15}\text{N}$	-----%-----			-----g-----				
		N	N-FBN	TFN	NTA	NA-FBN	N-Solo	MSPA	MSR
<i>Axonopus affinis</i>	6,4 ^b	0,9 ^b	0,3 ^b	33 ^b	6,0 ^a	2,0 ^a	3,8 ^c	6,1 ^a	2,7 ^b
<i>Paspalum notatum</i>	7,1 ^a	0,9 ^b	0,2 ^c	22 ^d	7,4 ^a	1,6 ^a	5,2 ^a	6,8 ^a	5,6 ^a
<i>Andropogon lateralis</i>	6,6 ^b	1,2 ^a	0,3 ^b	25 ^c	4,3 ^b	1,1 ^b	3,2 ^b	3,5 ^b	3,3 ^b
<i>Aristida laevis</i>	6,1 ^b	1,1 ^a	0,4 ^a	36 ^a	5,2 ^b	1,9 ^a	3,0 ^b	4,4 ^b	0,8 ^c
CV ¹ (%)	6,6	11	9	6	18	17	22	18	36

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ¹ Coeficiente de variação.

O N total acumulado (NTA) foi maior no tecido das espécies *A. affinis* e *P. notatum*, em relação às espécies *A. lateralis* e *A. laevis*. No entanto, o N acumulado via FBN (NA-FBN) das espécies *A. laevis*, *A. affinis* e *P. notatum* foram similares, mas superiores ao da espécie *A. lateralis*.

O N absorvido do solo (N-Solo) da espécie *P. notatum* foi 1,56 vezes maior que a média das demais espécies. A matéria seca (MS) de parte aérea e raiz produzida pela espécie *P.*

notatum foi maior que as MS das demais espécies. A MS de parte aérea produzida pela espécie *A. lateralis* foi similar a da espécie *A. laevis*.

4.4 Discussão

4.4.1 Colonização por bactérias diazotróficas

Todas as gramíneas avaliadas possuem gêneros de bactérias com capacidade de fixação de N atmosférico em seu sistema radicular, esta associação pode explicar a existência destas gramíneas em solos de baixa fertilidade há centenas de anos de evolução, bem como o uso destas pastagens por vários séculos como fonte forrageira sem a entrada de fertilizantes nitrogenados. A contribuição da FBN medida, apresentou diferença entre as espécies, menor para o *P. notatum* que demonstrou alta capacidade de absorção de N justificando sua uniforme ocorrência nas pastagens sul-brasileiras em relação às demais espécies, assim como alta contribuição da FBN para a espécie *A. laevis*, o que pode justificar sua adaptabilidade em solos de baixa fertilidade.

A adubação com N+P apresentou um efeito negativo na ocorrência dos três gêneros de bactérias diazotróficas reduzindo significativamente o número de bactérias independentemente do período e da fração do sistema radicular avaliado (rizosfera, rizoplano e endorizoplano). A maior colonização bacteriana na testemunha pode ser relacionada às quantidades de exsudatos radiculares secretados pelas espécies nativas. A maneira pela qual as plantas obtêm nutrientes da região rizosférica pode influenciar o desenvolvimento de bactérias no sistema radicular. A produção de substâncias extracelulares que servem como fonte de energia aos microrganismos, assim como, a redução na exsudação pode diminuir a colonização (DAKORA & PHILLIPS, 2002).

O aumento na disponibilidade de P, pode diminuir a quantidade de exsudatos radiculares, aumentando a concentração de fosfolipídeos nas células radiculares diminuindo a permeabilidade da membrana, reduzindo a deposição de exsudatos na rizosfera (GRAHAM et al., 1981) com impacto negativo sob a colonização das bactérias diazotróficas.

A adubação com N pode inibir a colonização por bactérias diazotróficas de forma indireta, pois o aumento na disponibilidade de N estimula a produção de matéria seca, assim, aumentando o uso de fotoassimilados para a formação de compostos estruturais, diminuindo o carbono (C) prontamente disponível na rizosfera, reduzindo assim a colonização desta região (KAVADIA et al., 2011).

A espécie *A. laevis*, que apresentou o menor aumento na produção de MSPA sob adubação com N+P, por possuir um lento crescimento relativo, possivelmente não alterou a deposição de C a níveis significativos, não apresentando alteração na colonização para os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*. Segundo Cohen et al, (2009), o aumento no carbono disponível na rizosfera aumenta a FBN, no entanto, a medida que a planta demanda mais C a FBN é prejudicada (WERY et al., 1986).

A colonização similar entre os tratamentos testemunha e N+P em *A. laevis* (Tabela 3), pode indicar que estes gêneros associativos são importantes para esta espécie. O gênero *Azospirillum*, é um dos mais estudados atualmente sendo altamente eficiente na FBN, possui estirpes utilizadas como inoculantes em milho (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e arroz (*Oryza sativa*) (SANTI et al., 2013).

O gênero *Herbaspirillum* é caracterizado por realizar principalmente associação endofítica (MONTEIRO et al., 2012), esta forma de associação é considerada mais eficiente que a associação realizada por bactérias que habitam a rizosfera, pois a FBN realizada no interior das raízes das gramíneas é mais propícia à atividade da nitrogenase e posterior transferência do N fixado às plantas hospedeiras. Considerando estes aspectos do gênero *Herbaspirillum* relacionados à associação com *A. laevis*, e a maior colonização no experimento II (Tabela 4), a FBN apresentaria uma grande contribuição para o N total na planta, conforme se evidencia na Tabela 7.

O aumento da colonização nos períodos, esta relacionado com crescimento e estágio de desenvolvimento das plantas, e o efeito da rizosfera, com o avanço do ciclo das espécies, ocorre também o aumento da produção de mucilagens excretadas pelas células radiculares na rizosfera (WALKER et al., 2003), podendo também ser da descamação das células decorrentes do atrito com o solo à medida que crescem, bem como da senescência destas (MONTEIRO et al., 2012). Este efeito da rizosfera possivelmente é o responsável também pela maior atividade dos gêneros *Azotobacter* e *Azospirillum* no rizoplano e rizosfera (Tabela 3), embora possam

colonizar a endorizosfera, estes gêneros são caracterizados como sendo principalmente de vida livre e assim apresentariam melhor colonização na fração externa das raízes (SANTI et al., 2013).

Mesmo com a redução da colonização, há maior teor de N com a aplicação de N+P, existe um aumento na produção de matéria seca total, embora com valores condizentes com as taxas de crescimento das espécies, assim, embora exista a redução da colonização, o aumento da matéria seca não representaria um efeito negativo imediato sob a composição botânica. O teor de N na MSR das espécies *A. affinis* e *P. notatum* similar na testemunha e na presença de N+P (Tabela 6), é uma resposta da maior capacidade de obter quantidades significativas de N do solo mesmo sob uma condição de baixa disponibilidade (Tabela 7). A capacidade de captura de N do solo por *A. affinis* e *P. notatum*, aliada a suas características de crescimento rápido, resultam em maior produção de MSPA (Tabelas 5 e 7), assim como, diluição de N no tecido (Tabela 6), sendo *A. affinis* a espécie que apresentou a maior diluição de N na MSPA (Tabela 6). A menor capacidade de resposta da espécie *A. laevis* a adubação, devido ao lento crescimento (Tabela 5), faz com que esta espécie produza menores quantidades de MSPA, resultando em um maior acúmulo de N na MSPA, também influenciado pelo maior teor de N fixado biologicamente (Tabela 7).

4.4.2 Contribuição da FBN

O maior valor de $\delta^{15}\text{N}$ para *P. notatum* em relação as demais espécies esta relacionado a sua menor TFN, em geral quanto maior for a TFN das espécies, menor são os valores de $\delta^{15}\text{N}$, como se pode observar para *A. laevis* (Tabela 7). Em leguminosas nativas a grande eficiência da FBN gera valores de $\delta^{15}\text{N}$ negativos, como nas savanas Sul Americanas, onde *Stylosanthes guyanensis* obteve valores de -1,4 (MEDINA & IZAGUIRRE, 2004).

A maior taxa de fixação de N (TFN) medida pela técnica de abundância natural de ^{15}N para *A. laevis*, indica que esta espécie, possui uma maior associação com estes microrganismos, ou associação com espécies de bactérias mais eficientes para FBN, assim como discutido anteriormente, sendo uma espécie de crescimento mais lento, mais adaptada a ambientes de menor fertilidade, as bactérias diazotróficas são uma importante via de fornecimento de N para esta espécie.

A alta contribuição do N via FBN na *A. laevis*, aliado a suas características de crescimento, facilitam a adaptação a ambientes de menor fertilidade, tornando-a uma espécie interessante. Em ecossistemas naturais, com baixa fertilidade natural, pode estar desempenhando um importante serviço ecossistêmico, possibilitando a entrada de N no sistema, e a partir da decomposição do seu material senescente, disponibilizaria N às demais espécies, como as espécies de captura de recursos. Assim, embora a *A. laevis* possua um baixo valor forrageiro (SANTOS et al., 2013), a sua contribuição através da FBN a torna importante para as pastagens nativas.

Se considerarmos as condições climáticas dos campos sulinos, em eras geológicas passadas, de baixas temperaturas e baixa pluviosidade, condição em que espécies com características similares a *A. laevis*, conseguiriam se adaptar, estas espécies podem ter auxiliado as demais espécies que necessitariam de um maior aporte de nutrientes, a colonizarem estas áreas. Portanto, esta espécie é importante para o ciclo biogeoquímico do N nos ecossistemas de pastagens naturais, assim como outras espécies com características de crescimento similares, porém ainda não estudadas.

Em estudo de Medina & Izaguirre (2004), em savanas da América do Sul, para *Aristida* sp., do N total acumulado pela espécie, 25% do total obtido foi via FBN, inferior ao valor obtido neste estudo, sendo uma gramínea de ciclo fotossintético C₄, é adaptável aos solos pobres em N, dominando paisagens de savana nos trópicos de todos os continentes, característica, possivelmente, reforçada pela sua capacidade de usar N fixado biologicamente, como observado para *A. laevis*.

Considerando o N absorvido do solo na Tabela 7, a espécie *P. notatum* apresentou o maior acúmulo de N do solo, em torno de 1,5 vezes mais que as demais espécies, o que confirma a hipótese de Quadros et al. (2009) de que esta é uma espécie de captura de recursos, como se pode observar pela maior MS de raiz produzida (Tabela 7). Esta característica faz com que seja menos dependente da associação com microrganismos, assim, distúrbios que possam vir a afetar os microrganismos do solo, como fogo e pastejo, não afetariam esta espécie, considerando sua habilidade para obtenção de nutrientes sob uma condição natural.

O estudo da FBN relacionada ao ciclo biogeoquímico do N é essencial para as pastagens naturais, pois o N é de grande importância para todos os organismos que dependem deste ecossistema, sendo muitas vezes um fator limitante ao crescimento das pastagens. A

compreensão da FBN para os Campos Sulinos é fundamental para o entendimento da função do ecossistema, e para prever as respostas futuras para as mudanças ambientais globais (REED et al, 2011). O aumento das concentrações atmosféricas de CO₂ resultantes da queima de combustíveis fósseis e do desmatamento nos trópicos pode aumentar a capacidade fotossintética das gramíneas nas pastagens naturais. Este, por sua vez, pode estimular a FBN por associações entre microorganismos e plantas, uma vez que a sua atividade é limitada pela oferta de energia em forma de açúcares solúveis liberados pelas plantas hospedeiras, desta forma, contribuindo com parte do N₂ globalmente fixado via FBN (REED et al, 2011).

4.5 Conclusões

A adubação com N e P reduz a colonização de bactérias diazotróficas, mas aumenta a produção de matéria seca e acúmulo de N no tecido.

A. laevis é a gramínea com maior contribuição da fixação biológica de nitrogênio. A espécie *P. notatum* apresenta o maior acúmulo de N do solo.

4.6 Referencias Bibliográficas

BODDEY, R.M.; VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen-fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v.90, p.265-294, 1986.

BODDEY, R.M.; CLARK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, p.1036-1045, 1983.

BRASIL, M. da S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a Gramíneas forrageiras do pantanal sul-matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.179-190, 2005.

BURKAT, A, Evolution of grasses and grasslands in South America, **Taxon**, v. 24, p. 53-66, 1975.

COHEN, R.A.; WALKER, K.; CARPENTER, E.J. Polysaccharide addition effects on rhizosphere nitrogen fixation rates of the california cordgrass, *Spartina foliosa*. **Wetlands**, v. 29, p. 1063–1069, 2009.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Rhizosphere associations between grasses and nitrogen-fixing bacteria: effect of O₂ on nitrogenase activity in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.5, p.57-159, 1973.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A, Root exudates as mediators of mineral acquisition Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments, **Plant and Soil**, v,245, p,35-47, 2002

GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; PELLEGRINI, J.B.R.; BRUNETTO, G.; SAGGIN, A.; FLORES, J.P.C. Influência da adubação fosfatada e da introdução de espécies forrageiras de inverno na oferta de forragem de pastagem natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1663-1668, 2000.

GRAHAM, J. H.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, V.68, p. 548-552, 1981.

KAVADIA, A.; VAYENAS, D.V.; PAVLOU, S.; AGGELIS, G. Dynamics of a free-living nitrogen-fixing bacteria population lacking of competitive advantage towards an antagonistic population. **The Open Environmental Engineering Journal**, v. 4, p. 190-198, 2011.

REES, D.C.; TEZCAN, F.A.; HAYNES, C.A.; WALTON, M.Y; ANDRADE, S.; EINSLE, O.; HOWARD, J.B. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.363, p.971–984, 1995.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.42, P.489–512, 2011.

MAASDORP, B. V. Contribution of associative N₂-fixation (acetylene reduction) in some grassland ecosystems in Zimbabwe. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, p. 7-12, 1987.

MACHADO, J.M.; ROCHA, M.G DA.; QUADROS, F.L.F.DE.; CONFORTIN, A.C.C.; SANTOS, A.B.DOS.; SICHONANY, M.J.DE.O.; RIBEIRO, L.A.; ROSA, A.T.N.DA.; Morphogenesis of native grasses of Pampa Biome under nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.22-29, 2013.

MEDINA, E.; IZAGUIRRE, M.L. N₂-fixation in tropical American savannas evaluated by the natural abundance of ¹⁵N in plant tissues and soil organic matter, **Tropical Ecology**, v. 45, p. 87-95, 2004.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A.M.; SANTOS, L.B.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA,E.M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v.356, p.175-196, 2012.

O'CONNOR, K.F. Nitrogen balances in natural grasslands and extensively-managed grassland. **New Zealand Journal of Ecology**, v.6, p.1-18, 1983.

PALLARÉS, O.R.; BARRETA, E.J.; MARASCHING, G.E. The South American Campos ecosystem. In: SUTTIE J.M.; REYNOLDS, S.G.; BATELLO, C. **Grasslands of the world**. Rome: FAO, Serie n° 34, p. 171–219, 2005.

PILLAR V.D. **MULTIV, Multivariate exploratory analysis, randomization testing and bootstrap resampling**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. Disponível em: <<http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

QUADROS, F.L.F.; TRINDADE, J.P.P e BORBA, M.A. Abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. In: PILLAR, V. DE P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M. DE S.; JACQUES, A.V.Á. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009, p. 206-213.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, A.; HE, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of proteobacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.831-841, 1997.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, V.111, P.743-767, 2013.

SANTOS, A.B.dos; QUADROS, F.L.F.de; ROSSI, G.E.; PEREIRA, L.P.de; KUINCHTNER, B.C.; CARVALHO, R.M.R.de. Valor nutritivo de gramíneas nativas do Rio Grande do Sul/Brasil, classificadas segundo uma tipologia funcional, sob queima e pastejo. **Ciência Rural**, v.43, p.342-347, 2013.

SANTOS, D.T. DOS; CARVALHO, P.C. DE F.; NABINGER, C.; CARASSAI, I.J. GOMES, L.H. Eficiência bioeconômica da adubação de pastagem natural no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.437-444, 2008.

SHEARER, G.B.; KOHL, H. N₂-fixation infield settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p. 699-756, 1986.

SIEWERDT, L; NUNES, A.P.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Efeito da adubação nitrogenada na produção e qualidade da matéria seca de um campo natural de planossolo no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, n3, p.157-162, 1995.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

THOMPSON, J.A.; GEMELL, L.G.; ROUGHLEY, R.J.;EVANS, J.; NICHOLLS, P.J. Nitrogenase activity associated with pasture grasses in northern new south wales. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16, p. 217-222, 1984.

WALKER, T.S.; BAIS, H. P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J. M. Root Exudation and Rhizosphere Biology. **Plant Physiology**, V.132, P.44-51, 2003.

WERY, J.; TURC, O.; SALSAC, L. Relationship between growth, nitrogen fixation and assimilation in a legume (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 96, p. 17-29, 1986.

5 CAPÍTULO II

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NATIVOS EM GRAMÍNEAS DOS CAMPOS SULINOS

Resumo: O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento da associação entre FMAs em quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com P e N. Os tratamentos consistiram na aplicação de 50 mg de P Kg⁻¹ de solo (P); aplicação de 50 mg de P Kg⁻¹ de solo + 100 mg de N Kg⁻¹ de solo (N+P); e uma testemunha, sem aplicação de P e N. Foram utilizadas quatro gramíneas de maior abundância nas pastagens naturais dos Campos Sulinos no Rio Grande do Sul, cultivadas em casa de vegetação: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis*, analisadas 76 dias após o início do experimento, e *Aristida laevis*, analisada 113 dias após o início do estudo. As diferentes datas são devido às diferenças nas taxas de crescimento das espécies. Na coleta, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz, a partir da matéria seca obteve o P acumulado no tecido e com a análise de raízes frescas se obteve a colonização micorrízica. A matéria seca e o P acumulado na parte aérea sob adubação N+P foi maior para *A. affinis* e *P. notatum*. O P acumulado na matéria seca de raiz da espécie *P. notatum* foi maior quando submetida à adubação com N+P, quatro vezes mais em relação a testemunha, as espécies *A. laevis*, *A. lateralis* e *A. affinis* não diferiram entre as adubações com P e N+P. A colonização micorrízica foi semelhante entre a testemunha, P e N+P para as raízes de *A. lateralis* e *A. laevis*, apresentando assim uma maior dependência da associação micorrízica, estando relacionada a menor taxa de crescimento e acúmulo de matéria seca. Diferentemente, nas espécies *A. affinis* e *P. notatum*, a colonização micorrízica foi menor quando submetidas a adubação com P e N+P, apresentando assim uma menor dependência, devido a maior taxa de crescimento e acúmulo de matéria seca. Conclui-se assim, que as espécies *A. laevis* e *A. lateralis* apresentam maior dependência da micorrização que as espécies *A. affinis* e *P. notatum*. A adubação com P e N reduz a porcentagem de colonização micorrízica das espécies menos dependentes *A. affinis* e *P. notatum*.

Palavras-chave: Pastagem nativa. Fertilização fosfatada. Colonização micorrízica. Dependência micorrízica.

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI NATIVE IN GRASSES OF THE SOUTHERN FIELDS

Abstract: The objective of this study was to evaluate the association between AMF in four native grasses of Campos Grasslands under fertilization with phosphorus (P) and nitrogen (N). The treatments consisted of applying 50 mg kg⁻¹ soil P (P), application of 50 mg kg⁻¹ soil P and 100 mg kg⁻¹ of soil N (NP), and a control without application of P and N. Four most abundant grasses in natural grasslands of Rio Grande do Sul were used: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis* analyzed 76 days after the start of the experiment, and *Aristida laevis* analyzed 113 days after the start of the study. The different dates are due to differences in growth rates of the species. During sampling, the plants were separated into shoot and root, from dry matter of these fractions was obtained P accumulated in tissue, with analysis of fresh roots was obtained mycorrhizal colonization. The dry matter and the P accumulation in shoots of the *A. affinis* e *P. notatum* was higher with the application of N+P. Phosphorous accumulated in root dry matter of *P. notatum* was higher when subjected to fertilization with N+P, four times as compared to control. *A. laevis*, *A. lateralis* and *A. affinis* did not differ between fertilization with P and N+P for P accumulated in root dry matter. The mycorrhizal colonization was similar between the control, P and N+P to the roots of *A. lateralis* and *A. laevis*, thus presenting a greater dependence on the mycorrhizal association. This is related to a lower growth rate and dry matter accumulation. In contrast, in *A. affinis* and *P. notatum*, the mycorrhizal colonization was lower when subjected to fertilization with P and N+P, thus presenting a lower dependence. Due to the higher growth rate and dry matter accumulation. It is concluded that the species *A. laevis* and *A. lateralis* show greater dependence of mycorrhizae than *A. affinis* and *P. notatum*. Fertilization with N and P reduces the percentage of mycorrhizal colonization of the less dependent species *A. affinis* and *P. notatum*.

Key words: Native Grassland. P fertilization. Mycorrhizal colonization. Mycorrhizal dependency

5.1 Introdução

Os Campos Sulinos desde a metade sul do estado do Rio Grande do Sul (RS), no Brasil, até Argentina e Uruguai, são compostos naturalmente por pastagens nativas. A vegetação natural destas pastagens é composta majoritariamente por gramíneas megatérmicas (BURKAT, 1975). É um ecossistema complexo, com predominância de clima subtropical, e solos ácidos, com baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente deficientes em fósforo (P) disponível (PALLARÉS et al., 2005).

Em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, as espécies vegetais ao longo do processo evolutivo desenvolveram mecanismos que auxiliassem na captura de recursos, em especial água e nutrientes (MOHAMMADI et al., 2011). Uma das respostas adaptativas das plantas à baixa disponibilidade de P no solo é sua associação com microrganismos que auxiliam na absorção deste nutriente, como os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (BRUNDRETT, 2009).

Os FMAs são microrganismos pertencentes à ordem Glomales, realizam uma associação caracterizada como mutualística benéfica (MOHAMMADI et al., 2011), onde a planta supre o fungo com compostos de carbono (C), fixado via processos fotossintéticos, em especial carboidratos, enquanto os fungos provêm às plantas água e nutrientes, em especial os de baixa mobilidade no solo, como o P (GRANT et al., 2005; HARTNETT & WILSON, 2002). A atenção dada ao P é devido a sua importância para o crescimento das plantas, pois é um elemento imprescindível para várias funções vitais, sendo componente estrutural de ácidos nucleicos, fosfolípidios e açúcares fosfatados, também apresentando função regulatória de rotas metabólicas no citoplasma e nos cloroplastos, atuando nos processos de respiração e fotossíntese (TAIZ & ZEIGER, 2013).

O aumento na absorção de P, propiciada pelos FMAs, é atribuído ao aumento do volume de solo explorado pelas hifas e ao pequeno diâmetro destas, o que as permite explorar espaços no solo inatingíveis pelas raízes, além da zona de depleção de nutrientes próxima às raízes (MOHAMMADI et al., 2011), proporcionando maiores taxas de influxo por unidade de superfície, onde uma raiz associada a FMAs pode transportar fosfato em uma taxa quatro vezes mais rápida que uma raiz não associada a micorrizas (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Entretanto, existem diferenças entre as espécies quanto a sua dependência dos FMAs. São consideradas mais dependentes de FMAs, espécies de plantas com características de crescimento lento, sistemas radiculares mais ruderais, com poucos pêlos radiculares, e raízes mais grossas, em geral, adaptadas aos ambientes de menor disponibilidade de nutrientes e água. Podendo a dependência micorrízica ser observada através da colonização radicular por FMAs entre gradientes de fertilidade, ou seja, espécies mais dependentes não alteram a colonização por FMAs mesmo sob a elevação da disponibilidade de nutrientes no solo (BRUNDRETT, 2009).

No solo, a reciclagem de fósforo envolve a atividade da enzima fosfatase ácida, que possui a capacidade de transformar o P orgânico (Po) em P inorgânico (Pi), sendo sua atividade regulada por diversos fatores ambientais e da planta, como a baixa disponibilidade de P no solo, que leva ao aumento da atividade dessa enzima (DUFF et al., 1994). Sua atividade na planta, em resposta a disponibilidade de P, pode ter relação também com a sua atividade no solo, pois segundo Dakora & Phillips (2002), a atividade de fosfatases ácidas no solo é atribuída a fungos, como os FMAs, e a atividade da planta, onde através do sistema radicular, estas enzimas são secretadas para a região da rizosfera.

Ao se considerar o manejo das pastagens naturais dos Campos Sulinos, o uso de fertilizantes minerais contendo, principalmente P e nitrogênio (N), prática utilizada visando aumentar a produção de forragem (GATIBONI et al., 2000), deve ser considerado como um fator que pode impactar o desenvolvimento das plantas e a atividade dos microrganismos. A aplicação de fertilizantes fosfatados, visando aumentar o teor de P disponível no solo, pode diminuir a colonização pelos FMAs no sistema radicular vegetal (GRANT et al., 2005; RYAN & ASH, 1999), assim como reduzir a atividade da fosfatase ácida no solo (GATIBONI et al., 2008).

Os estudos relacionados à micorrizas arbusculares nas pastagens naturais dos Campos Sulinos são pouco frequentes, assim, os padrões de dependência das espécies destas pastagens são ainda desconhecidos. A hipótese do estudo sugere que espécies com baixa dependência micorrízica, sejam espécies de maior resposta a fertilização, adaptadas a ambientes mais férteis, quando submetidas à elevação na disponibilidade de nutrientes reduzem a micorrização, aumentando o acúmulo de P no tecido, já as espécies de maior dependência micorrízica, quando submetidas à elevação na disponibilidade de nutrientes, não alteram a sua micorrização

radicular, sendo espécies mais adaptadas a ambientes de menor fertilidade, com menor acúmulo de P no tecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar a dependência da micorrização em quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com P e N, e a relação com o acúmulo de P e matéria seca.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Local, solo e espécies utilizadas

O estudo foi conduzido no período de maio de 2012 a janeiro de 2013, em casa de vegetação, no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul (29°43' S, 53°42' W). Foi utilizado um Argissolo Vermelho distrófico, coletado na camada de 0-20 cm, em uma área de pastagem natural, sem histórico de adição de fertilizante. Após a coleta, o solo foi seco ao ar e peneirado em malha de 4 mm e acomodado em vasos de 5 Kg. As principais características físicas e químicas do solo são: 18% de Argila; 25 g kg⁻¹ de matéria orgânica; pH_(água 1:1) de 4,6; 30,6% de Al; 26,5% de Saturação de bases; 6,2 cmol_c dm⁻³ de CTC efetiva; 2,8 cmol_c dm⁻³ de Ca, 1,4 cmol_c dm⁻³ de Mg, 3 mg kg⁻¹ de P_(Mehlich⁻¹) e 76 mg kg⁻¹ de K_(Mehlich⁻¹).

Para o estudo foram selecionadas quatro gramíneas forrageiras de maior abundância nas pastagens naturais dos Campos Sulinos no Rio Grande do Sul: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum*, *Andropogon lateralis* e *Aristida laevis*. Estas foram coletadas no mês de maio, mesma pastagem natural de onde se utilizou o solo, e foram transplantadas para os vasos na forma de mudas (5 filhotes por vaso).

5.2.2 Condução e tratamentos

No período de maio a setembro de 2012 as espécies transplantadas passaram por um período de aclimação. Em 12 de setembro foram aplicados os tratamentos e realizado corte de uniformização a 5 cm do solo, e estas foram cultivadas até janeiro.

As espécies foram arranjadas em um delineamento de blocos completamente casualizados, com quatro repetições. O fator determinante do bloqueamento foi o gradiente de temperatura existente na casa de vegetação. Os tratamentos foram constituídos da aplicação de: 50 mg de P Kg⁻¹ de solo (P); aplicação de 50 mg de P Kg⁻¹ de solo + 100 mg de N Kg⁻¹ solo (N+P); e uma testemunha, sem aplicação de P e N. A forma de aplicação de P foi o fosfato de potássio (KH₂PO₄) e de N foi nitrato de amônio (NH₄NO₃). Na testemunha, o nível de potássio foi corrigido com cloreto de potássio (KCl) nas quantidades equivalentes às aplicadas nos dois tratamentos. A umidade do solo foi mantida a 70% da capacidade de campo com a pesagem diária dos vasos. Para a coleta dos valores de temperatura (Tabela 8), foi utilizada um data logger marca HOBO[®], modelo U12.

Tabela 8: Temperatura média mensal do ar do período experimental no interior da casa de vegetação nos meses de setembro a dezembro de 2012 e janeiro de 2013.

Ano	Mês	Dias	Temperatura média (°C)
2012	Setembro	11-30	20,1
	Outubro	1-31	22,1
	Novembro	1-30	24,1
	Dezembro	1-31	26,3
2013	Janeiro	1-3	23,1

5.2.3 Medidas e determinações

O critério determinante para a coleta das espécies foi a duração da alongação foliar de 2,5 folhas, expressa em graus dias (GD), 832,5 GD para *Aristida laevis* e 437 GD para as espécies *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis* (MACHADO et al., 2013). O uso deste critério visou respeitar as diferentes taxas de crescimento que estas espécies possuem.

As espécies *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* e *Andropogon lateralis* foram analisadas no dia 27/11/2012, 76 dias após o início do experimento (4×437), e *Aristida laevis* foi coletada dia 03/01/2013, 113 após o início do estudo (4×832,5).

As plantas foram separadas nos componentes parte aérea e raiz. Para retirada das raízes, o solo dos vasos foi peneirado em malha de 4 mm, após as raízes foram lavadas com água destilada. O material da parte aérea e radicular foi acondicionado em sacos de papel, e seco em estufa com circulação de ar a 65°C por 72 horas até peso constante para determinação da massa de matéria seca. Após pesado, o material seco foi moído em moinho tipo Wiley em malha de 1 mm para determinação da concentração de P no tecido. A análise de P total no tecido das espécies foi realizada conforme Tedesco et al., (1995), com a digestão de 0,200 g de tecido com 0,700 g de mistura de digestão (100 g de Na₂SO₄, 10 g de CuSO₄.5H₂O e 1 g de selênio) em ácido sulfúrico (H₂SO₄) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em bloco a 350 °C. A determinação do fósforo nos extratos dos tecidos das plantas foi realizada por colorimetria, conforme Murphy & Riley (1962).

Foram coletadas amostras úmidas de solo, e amostras de raízes, ambas conservadas em geladeira a 4°C, para avaliação da colonização micorrízica, contagem de esporos, e quantificação de fosfatase ácida no solo. No solo seco foi determinado o pH em água (10 mL de solo : 10 mL de água) (TEDESCO et al., 1995). O teor de P disponível, foi estimado pelo método de extração com resina de troca aniônica (RTA) com membrana AR 103 placa 434 QDP (TIECHER et al., 2012), saturada com bicarbonato (NaHCO₃), brevemente descrito a seguir: 1,0 g de amostra de solo foi colocada em tubos de centrífuga de 15 mL (solo/extrator, relação 1:10), com 10 mL de água destilada, e uma membrana RTA, os tubos foram agitados por 16 h a 25 °C em agitador, as membranas foram removidas e lavadas em 10 mL de solução 0,5 M de HCl, o P foi determinada colorimetricamente pelo método de Murphy e Riley (1962).

Para determinar a porcentagem de colonização (PCM), 20 fragmentos de 2 cm de raízes, foram clarificadas com KOH 10% em capela a 90°C por 30 min, lavadas com HCl 1% por 5 minutos, e coloridas com solução de Tripán blue em lactofenos 0,05% a 90°C em capela por 15 min na concentração de 1:1800 (PHILLIPS & HAYMAN, 1970). A PCM foi avaliada em lupa, conforme Giovannetti & Mosse (1980), observando os pontos de interseção entre os fragmentos de raízes e as linhas de uma placa quadriculada, avaliando a ocorrência ou não de colonização (hifas, vesículas ou arbúsculos). O cálculo da PCM foi realizada pela relação entre o número de fragmentos positivos e o total de pontos analisados.

A quantificação dos esporos seguiu metodologia de Gerdemann & Nicolson (1963), 50 mL de uma amostra úmida de solo foi centrifugadas em água a 3000 rpm por três minutos,

descartou-se o sobrenadante, o material residual do tubo foi centrifugado novamente a 2000 rpm por 2 minutos com solução de sacarose 45%. Verceu-se o sobrenadante sobre uma peneira de 0,053 mm, o material retido na peneira foi transferido para uma placa canelada e a contagem realizada em lupa.

A determinação da atividade da fosfatase ácida foi realizada segundo método de Tabatabai & Bremner (1969) descrita a seguir: as amostras de solo (1,0 g) foram colocadas em duplicata em erlenmeyer de 50 mL, utilizando um controle para cada amostra, onde só foi adicionado o substrato após a incubação. Em cada amostra de solo foram adicionados 4,0 mL da solução MUB pH 6,5 e 1,0 mL de substrato ρ -nitrofenil fosfato 0,05 M. Os erlenmeyers foram fechados e incubados a 37° C por uma hora. Após a incubação, foram adicionados 1,0 mL de CaCl₂ 0,5 M, 4,0 mL de NaOH 0,5 M e 1,0 mL de ρ -nitrofenil fosfato 0,05 M (o ultimo somente aos controles), procedendo-se em seguida à filtragem em papel de filtro nº 02. A intensidade da coloração amarela do filtrado foi determinada em espectrofotômetro a 410 nm. A quantidade de ρ -nitrofenol formada em cada amostra foi determinada com base em uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de ρ -nitrofenol (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg de ρ -nitrofenol mL⁻¹). A atividade enzimática foi expressa em mg de ρ -nitrofenol liberado por hora por grama de solo (mg ρ -nitrofenol h⁻¹ g⁻¹ solo).

5.2.4 Análises estatística

Os valores de cada variável foram analisados quanto a sua homocedasticidade, quando necessário, se utilizou transformação logarítmica. As variáveis foram analisadas para cada espécie de planta seguindo o modelo bifatorial, Espécie \times Tratamento, como segue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + (AD)_{ij} + B_k + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} é o valor observado, referente a variável Y; μ = média geral experimental; A_i = o efeito do fator A, espécie ($i = 1, 2, 3, 4$); D_j o efeito do fator D, adubação ($j = 1, 2, 3$); $(AD)_{ij}$: é o efeito da interação do nível i do fator A com o nível j do fator D; B_k é o efeito aleatório do bloco k ; e_{ijk} = erro experimental. Quando os efeitos dos tratamentos foram significativos a 5% de probabilidade, as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Foram utilizadas análises multivariadas de ordenação e agrupamento para se testar as hipóteses, sobre a relação entre a colonização micorrízica e as demais variáveis determinadas. A ordenação foi realizada pelo método de coordenadas principais (PCoA) com os dados previamente transformados vetorialmente pela amplitude total. A medida de semelhança utilizada entre as unidades amostrais (tratamentos) foi a Distância Euclidiana. As análises multivariadas foram realizadas no software MULTIV (PILLAR, 2006).

5.3 Resultados

5.3.1 Colonização micorrízica e atividade de fosfatase ácida no solo

A colonização micorrízica foi semelhante entre os tratamentos P e N+P para as raízes das espécies *A. lateralis* e *A. laevis* (Tabela 9). Diferentemente, para as espécies *A. affinis* e *P. notatum*, a colonização micorrízica foi menor quando submetidas à adubação com P e N+P em relação à testemunha. A colonização na testemunha foi maior para *A. affinis*, no tratamento N+P *A. laevis* apresentou a maior colonização.

O número de esporos não foi alterado significativamente pela adição de P e N+P em relação à testemunha. Entre as espécies, o número de esporos foi maior para *A. lateralis* e *A. laevis*, mais dependente que *A. affinis* e *P. notatum*.

A atividade da fosfatase ácida foi menor com a adição de P para todas as espécies, com exceção do *P. notatum* (Tabela 9). Para a espécie *A. laevis*, a atividade da fosfatase ácida foi maior com a adição de N+P. Para a espécie *A. lateralis*, a atividade da fosfatase ácida foi maior na testemunha em relação aos demais tratamentos, e para a espécie *A. affinis* a adição de N+P foi semelhante à testemunha.

Tabela 9: Porcentagem de colonização micorrízica, número de esporos e atividade de fosfatase ácida no solo, em quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos sob fertilização com fósforo (P) e nitrogênio (N).

Espécies	Testemunha	P	N+P	Média
<i>Axonopus affinis</i>	42,2 ^{aA}	23,1 ^{aB}	14,6 ^{bB}	26,7
<i>Paspalum notatum</i>	26,2 ^{bA}	10,9 ^{bB}	15,1 ^{bB}	17,4
<i>Andropogon lateralis</i>	14,1 ^{cA}	14,0 ^{bA}	9,1 ^{bA}	12,4
<i>Aristida laevis</i>	27,5 ^{bA}	22,7 ^{aA}	22,5 ^{aA}	24,2
Média	27,5	17,7	15,3	
	Número de esporos (esporo 50 mL solo ⁻¹)			
<i>Axonopus affinis</i>	831	498	600	643 ^b
<i>Paspalum notatum</i>	553	351	447	450 ^b
<i>Andropogon lateralis</i>	1202	1048	1148	1133 ^a
<i>Aristida laevis</i>	866	971	870	902 ^a
Média	863 ^A	717 ^A	766 ^A	
	Atividade da fosfatase ácida ($\mu\text{g } \rho\text{-nitrofenol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ solo)			
<i>Axonopus affinis</i>	340,9 ^{aB}	244,2 ^{aC}	406,3 ^{aA}	330,5
<i>Paspalum notatum</i>	156,7 ^{bA}	122,7 ^{bA}	128,5 ^{cA}	136,0
<i>Andropogon lateralis</i>	338,9 ^{aA}	158,5 ^{bB}	172,4 ^{bB}	223,2
<i>Aristida laevis</i>	53,5 ^{cB}	27,6 ^{cB}	116,7 ^{cA}	66,0
Média	222,5	138,3	206,0	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.3.2 Matéria seca acumulada e teor de P no tecido

A matéria seca acumulada da parte aérea (MSAPA) das espécies nativas foi maior com a aplicação de N+P (Tabela 10), com aumento médio de 150% em relação a testemunha. A adubação com P proporcionou na média de todas as espécies um aumento na MSAPA das espécies de 62% em relação a testemunha. A MSAPA de *A. affinis* e *P. notatum* foi maior que as espécies *A. lateralis* e *A. laevis* nos tratamentos P e N+P.

A matéria seca acumulada de raiz (MSAR), para as quatro espécies nativas na testemunha foi menor em comparação a obtida com P e N+P (Tabela 10). Para todas as espécies, a MSAR foi maior no N+P. A produção média de MSAR obtida pelas espécies

quando submetidas a adubação com P e N+P corresponderam a acréscimos de 36 e 65 %, respectivamente, em relação à testemunha.

Tabela 10: Produção de matéria seca acumulada da parte aérea (MSAPA) e raiz (MSAR), e teor de fósforo (P) na parte aérea e raiz de quatro gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função da fertilização com fósforo (P) e nitrogênio (N).

Espécies	Testemunha	P	N+P	Média
	MSAPA (g vaso ⁻¹)			
<i>Axonopus affinis</i>	11,7 ^{bc}	21,1 ^{ab}	34,1 ^{Aa}	22,2
<i>Paspalum notatum</i>	19,7 ^{ab}	23,3 ^{ab}	38,4 ^{aA}	27,1
<i>Andropogon lateralis</i>	7,1 ^{bc}	14,1 ^{bb}	19,6 ^{ba}	13,5
<i>Aristida laevis</i>	8,3 ^{bb}	12,4 ^{bb}	19,6 ^{ba}	13,4
Média	11,7	17,6	28,6	
MSAR (g vaso ⁻¹)				
<i>Axonopus affinis</i>	5,6	6,5	8,4	6,8 ^b
<i>Paspalum notatum</i>	10,4	12,1	15,5	12,6 ^a
<i>Andropogon lateralis</i>	9,5	15,6	15,1	13,4 ^a
<i>Aristida laevis</i>	5,7	8,5	11,7	8,6 ^b
Média	7,8 ^c	10,7 ^B	12,7 ^A	
P parte aérea (g vaso ⁻¹)				
<i>Axonopus affinis</i>	3,6 ^{aC}	18,7 ^{ab}	31,3 ^{ba}	18,1
<i>Paspalum notatum</i>	5,6 ^{aC}	18,4 ^{ab}	41,0 ^{aA}	21,7
<i>Andropogon lateralis</i>	3,7 ^{aC}	10,5 ^{bb}	17,9 ^{ca}	10,7
<i>Aristida laevis</i>	4,0 ^{aC}	9,1 ^{bb}	15,8 ^{ca}	9,6
Média	4,2	14,2	26,5	
P raiz (g vaso ⁻¹)				
<i>Axonopus affinis</i>	0,9 ^{ab}	2,7 ^{ba}	4,0 ^{ba}	2,5
<i>Paspalum notatum</i>	1,4 ^{aC}	3,6 ^{bb}	5,5 ^{ba}	3,5
<i>Andropogon lateralis</i>	2,3 ^{aC}	6,7 ^{Ab}	8,9 ^{aA}	6,0
<i>Aristida laevis</i>	1,4 ^{ab}	2,9 ^{bb}	4,7 ^{ba}	3,0
Média	1,5	4,0	5,8	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

§O P acumulado na MSAPA foi maior para todas as espécies no tratamento N+P, em relação aos demais tratamentos. As espécies *A. affinis* e *P. notatum* acumularam mais P na MSAPA que *A. lateralis* e *A. laevis*, quando submetidos a adubação com P e N+P, em relação a

testemunha. O P acumulado na MSAR da espécie *P. notatum*, *A. lateralis* e *A. laevis* foi maior quando submetida à adubação com N+P, *A. affinis* não diferiu entre as adubações com P e N+P.

5.3.3 Fósforo disponível e pH do solo

O P disponível no solo extraído por RTA, do tratamento com P foi semelhante ao tratamento com N+P (Tabela 11). Na média, o P disponível no solo foi 4,5 vezes maior nos tratamentos com P e N+P em relação à testemunha.

O pH em água do solo cultivado com a espécie *A. affinis* e *P. notatum* foi igual entre os tratamentos, para *A. lateralis* e *A. laevis* foi maior no tratamento com P. Nos tratamentos testemunha e N+P o pH foi maior para o solo cultivado com *A. affinis* e *P. notatum*, em comparação com *A. lateralis* e *A. laevis*.

Tabela 11: Valores de P total extraído por resina (P resina) e pH em água em solo cultivado com gramíneas nativas dos Campos Sulinos em função da fertilização com fósforo (P) e nitrogênio (N)

Espécies	Testemunha	P	N+P	Média
	P resina (mg kg ⁻¹)			
<i>Axonopus affinis</i>	2,1	9,0	9,4	6,8 ^a
<i>Paspalum notatum</i>	2,7	10,1	8,9	7,2 ^a
<i>Andropogon lateralis</i>	2,3	11,6	10,6	8,2 ^a
<i>Aristida laevis</i>	1,8	10,5	10,6	7,6 ^a
Média	2,2 ^B	10,3 ^A	9,9 ^A	
		pH H ₂ O		
<i>Axonopus affinis</i>	4,8 ^{aA}	5,0 ^{aA}	4,8 ^{aA}	4,8
<i>Paspalum notatum</i>	4,8 ^{aA}	4,9 ^{aA}	4,6 ^{aB}	4,8
<i>Andropogon lateralis</i>	4,5 ^{bB}	4,7 ^{aA}	4,4 ^{bB}	4,5
<i>Aristida laevis</i>	4,4 ^{bB}	5,1 ^{aA}	4,4 ^{bB}	4,6
Média	4,6	4,9	4,5	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.3.4 Análise multivariada

A análise de agrupamento separou as espécies de plantas nos tratamentos em quatro grupos nítidos ($P < 0,1$) para o conjunto de variáveis representadas no diagrama de ordenação (Figura 1). A PCoA foi capaz de representar 86% da variação destes resultados.

Todas as espécies nativas cultivadas na testemunha foram agrupadas em um grupo distinto dos demais. Este grupo foi associado a maior porcentagem de colonização micorrízica e ao menor teor de P na parte aérea.

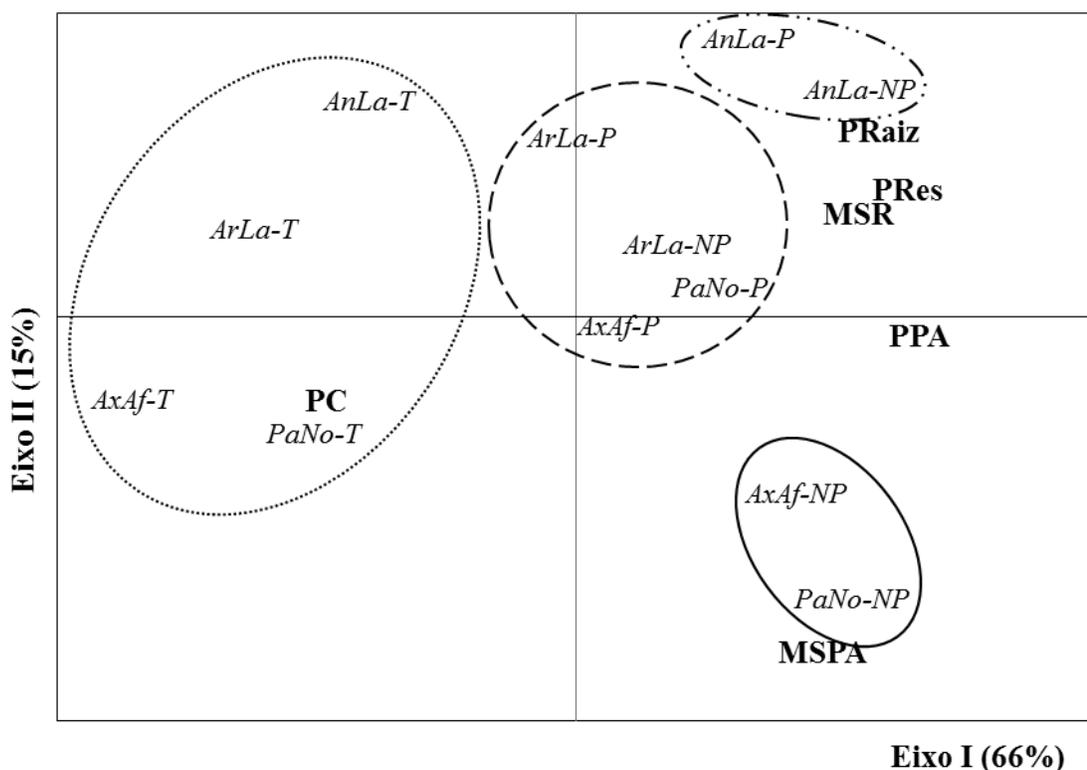


Figura 1: Diagrama de ordenação das espécies *Andropogon lateralis* (AnLa), *Aristida laevis* (ArLa), *Axonopus affinis* (AxAf), *Paspalum notatum* (PaNo), nos tratamentos testemunha (T), fósforo (P) e nitrogênio + fósforo (NP), em função das variáveis: porcentagem de colonização (PC), teor de fósforo na raiz (PRAiz), teor de fósforo na parte aérea (PPA), fósforo no solo extraído por RTA (PRes), massa seca de raiz (MSR) e matéria seca acumulada de parte aérea (MSPA).

A espécie *A. laevis* cultivada com a adição de P e N+P foi agrupada com as espécies *A. affinis* e *P. notatum*, adubadas com P. Este grupo tem como característica menor colonização micorrízica em relação ao grupo formado por todas as espécies na testemunha.

Já o grupo formado pelas espécies *A. affinis* e *P. notatum* cultivadas no N+P demonstrou o potencial de resposta em MSAPA destas espécies em relação aos demais grupos e menor colonização micorrízica em relação aos dois grupos acima comentados. Além destes, o grupo formado pela espécie *A. lateralis*, cultivada com P e N+P, foi mais correlacionado com a maior MSR.

5.4 Discussão

5.4.1 Dependência micorrízica

As quatro espécies estudadas apresentaram boas condições de colonização radicular por FMAs nativos (HARTNETT & WILSON, 2002; LUGO et al., 2012; RHEINHEIMER et al., 1994). No entanto, se compararmos a testemunha aos tratamentos com a adição de P e N+P, levando em consideração o P na MSAPA, observamos que a associação com fungos micorrízicos nativos não foi um fator determinante para maiores concentrações de P nas plantas não adubadas.

Com base no que sugere Brundrett (1991) em relação à colonização micorrízica, a plasticidade e o crescimento do sistema radicular, que estabelecem a habilidade da planta em responder às mudanças nas condições de fertilidade do solo, podem determinar a dependência da associação micorrízica.

Espécies de menor desenvolvimento radicular, com lento crescimento, são mais dependentes da associação micorrízica. Entre as espécies estudadas, esta característica de crescimento é atribuída a *A. lateralis* e *A. laevis*, (MACHADO et al., 2013). A colonização micorrízica semelhante entre os tratamentos testados para as raízes das espécies *A. lateralis* e *A. laevis* (Tabela 9), pode indicar que a associação com FMAs representa um mecanismo importante para estas duas espécies. Considerando principalmente a ausência de redução da colonização quando submetidas à elevação do teor de P no solo, pode-se considerar que estas espécies possuem maior dependência da associação com FMAs, facilitando a adaptação em ambientes menos férteis, e com limitações climáticas.

Em estudo de Martins et al., (1999), com *Aristida setifolia* Kunth, uma gramínea nativa e pioneira, em condições de acidez elevada e baixa disponibilidade de P, foi observado que os FMAs apresentaram uma considerável contribuição no crescimento desta gramínea, destacando que estes microrganismos nativos contribuem significativamente para o estabelecimento desta espécie nos solos naturais e de áreas degradadas.

O não favorecimento da presença de FMAs no solo cultivado com espécies de plantas dependentes de micorrização, entre elas *Sorghastrum nutans* e *Andropogon gerardii*, reduziu a participação destas duas espécies na biomassa total da comunidade, favorecendo a contribuição relativa das espécies não dependentes de micorrizas (WILSON & HARTNETT, 1997). As espécies *A. laevis* e *S. pellitum*, conforme classificação funcional de Quadros et al. (2009), estão agrupadas no TF D, caracterizadas como gramíneas C₄, com hábito de crescimento cespitoso (formação de touceiras), de conservação de recursos, com lenta taxa de crescimento. Desta forma pode-se considerar que as espécies com tais características de crescimento sejam mais dependentes da micorrização, como sugerem outros trabalhos (WILSON & HARTNETT, 1997; HARTNETT & WILSON, 2002; BRUNDRETT, 2009; LUGO et al., 2012).

Plantas com sistema radicular mais plástico, com mais raízes laterais, podem alterar facilmente a colonização, apresentando menor dependência (HARTNETT & WILSON, 2002). Espécies com baixa dependência micorrízica na maioria das vezes têm sistemas radiculares com o córtex estreito, raízes mais finas, e com sistemas radiculares extensos. Estas espécies possuiriam uma taxa de crescimento mais rápida, principalmente quando estas são submetidas a condições de alta disponibilidade de nutrientes, características das espécies *A. affinis* e *P. notatum* (MACHADO et al., 2013).

O comportamento das espécies *A. affinis* e *P. notatum*, reduzindo a colonização micorrízica, indica uma baixa dependência da associação. Estas espécies descritas como espécies com maior plasticidade, e crescimento mais rápido, caracterizadas como de captura de recursos, de maior abundância em ambientes com maior fertilidade do solo e/ou disponibilidade hídrica (CRUZ et al., 2010), sob uma condição de maior disponibilidade de P e N, apresentaram redução na colonização radicular. Estas espécies são agrupadas segundo Quadros et al. (2009) no TFs A e B, assim pode-se considerar as espécies pertencentes a este TFs como de baixa dependência da associação com FMAs.

Considerando o trabalho de Rheinheimer et al., (1994), em estudo realizado com *P. notatum* Flugge var. saureae, a porcentagem da infecção foi inversamente relacionada ao suprimento de P e a colonização radicular de FMAs foi reduzida quando ocorreu adição de altas doses de P no solo, estando de acordo com o que foi observado no presente estudo.

5.4.2 Efeito da adubação na colonização micorrízica

O número de esporos não apresentou variação entre os tratamentos, no entanto, foi superior para as espécies *A. lateralis* e *A. laevis*, mais dependentes da associação com FMAs que *A. affinis* e *P. notatum*. A alteração que a colonização por FMAs apresenta após elevação do teor de P no solo, está relacionada com o estímulo ao crescimento que a planta recebe. Ao absorver mais P do solo, a planta altera a morfologia de crescimento das raízes, estas alterações morfológicas impedem a formação das estruturas que possibilitaram a associação, como os arbúsculos. As espécies de crescimento mais lento, não apresentam alterações severas na morfologia estrutural das raízes, possibilitando a associação, devido a isto, as espécies *A. laevis* e *A. lateralis* caracterizadas por possuírem crescimento lento (MACHADO et al., 2013), não alteram a colonização sob elevação do teor de P no solo. Já as espécies *A. affinis* e *P. notatum* reduzem a colonização por apresentam maior resposta a adubação.

Outro possível efeito da disponibilidade de P no solo sobre a micorrização parece ser indireto. O aumento do acúmulo de P no tecido vegetal pode ser o fator determinante para a associação. Isto foi demonstrado em estudos onde a colonização das raízes por FMAs foi semelhante, mesmo na presença de altas concentrações de P no solo, enquanto a concentração de P na planta em geral foi baixa. Isto sugere que o teor de P no solo não influencia a colonização de plantas antes que inicie a absorção de quantidades significativas de P (BRUNDRETT, 2009; DAKORA & PHILLIPS, 2002), como observado na Tabela 10, em que as espécies *A. affinis* e *P. notatum* acumularam mais P na MSAPA que *A. laevis* e *A. lateralis* sob adubação com P e N+P.

Esse comportamento também pode estar relacionada com o trabalho de Graham et al. (1981), onde os autores observaram que raízes de plantas deficientes em P secretaram até 3 vezes mais aminoácidos na rizosfera, do que plantas com fornecimento de níveis adequados de P no solo. A magnitude de diferença na exsudação de aminoácidos e açúcares entre plantas

deficientes e bem nutridas em P poderia parcialmente ser um reflexo do conteúdo de P na planta. Segundo os autores, a permeabilidade da membrana das células radiculares é alterada quando a planta encontra-se em déficit de P, sendo correlacionado o aumento na exsudação com menores níveis de fosfolipídios.

Altos níveis de exsudatos de raiz deficientes em P na rizosfera estimulam o crescimento e desenvolvimento dos propágulos de FMAs, sob a forma de esporos, hifas, ou fragmentos de raízes infectadas (DAKORA & PHILLIPS, 2002). A redução de exsudação pelas raízes em resposta a maior disponibilidade de P no solo pode ser evidenciada através da maior atividade das fosfatases ácidas na testemunha em comparação com a adição de P, para as espécies *A. lateralis*, *A. laevis* e *A. affinis*.

Considerando a Figura 1 e a correlação da colonização micorrízica com as demais variáveis, obtiveram-se valores negativos principalmente com o aumento da MS de raiz (-0.57), P na MSAPA (-0.53) e P na MSAR (-0.51), concordando com a afirmação de Brundrett (2009) e Hartnett & Wilson (2002) que o aumento da MS de raiz diminui a micorrização. Assim, as espécies *A. affinis* e *P. notatum*, de maior resposta a adubação tendem a aumentar a matéria seca produzida, diminuindo a micorrização.

Com exceção do *P. notatum*, as espécies apresentaram redução na atividade enzimática quando adubadas somente com P. Segundo Gatiboni et al. (2008), existe uma correlação negativa entre a atividade da fosfatase ácida e teores de P no solo, o que indica que a atividade de fosfatases aumenta com o decréscimo do teor de P disponível, como já discutido anteriormente. A atividade de fosfatase ácida no solo apresentou correlação positiva com a micorrização (0,05). No entanto, o valor foi inferior à correlação com a MS de parte aérea (0,12), concordando com Dakora & Phillips (2002), que afirmam que os FMAs apresentam uma relação com o aumento da atividade das fosfatases ácidas no solo, mas a atividade das fosfatases via exsudatos radiculares seria o principal fator, sendo atribuída, portanto às plantas, grande parte do aumento destas enzimas no solo.

O aumento do pH no solo com a adição de P (Tabela 11) está relacionado com a atividade do sistema radicular e os mecanismos de absorção de P utilizados pelas plantas. Quando a absorção de cátions excede a de ânions, ocorre uma extrusão líquida de H^+ causando acidez na rizosfera, quando ânions são mais absorvidos que cátions, ocorre extrusão líquida de

HCO₃⁻ com conseqüente elevação do pH (HINSINGER et al., 2003; DAKORA & PHILLIPS, 2002).

A colonização por FMAs nas gramíneas de pastagens dos Campos Sulinos variou significativamente entre as espécies, com comportamentos distintos em relação à presença da adubação. Assim, se observa a existência de diferenças nos padrões de dependência entre FMAs e as gramíneas nativas, o que pode auxiliar na caracterização destas quanto a suas capacidades para se desenvolverem em ambientes com diferentes condições climáticas e de fertilidade. A presença ou ausência de FMAs, e as diferenças gerais na dependência micorrízica entre as espécies, podem também contribuir no entendimento dos padrões de sucessão neste tipo de comunidade, como um fator que pode influenciar os padrões de sucessão ecológica.

5.5 Conclusões

As espécies *A. laevis* e *A. lateralis* apresentam maior dependência da micorrização que as espécies *A. affinis* e *P. notatum*. A adubação com P e N reduz a porcentagem de colonização micorrízica das espécies menos dependentes *A. affinis* e *P. notatum*.

5.6 Referências

BRUNDRETT, M.C. Mycorrhizas in natural ecosystems, **Advanced Ecology Research**, v,21, p,171-313, 1991,

BURKAT, A, Evolution of grasses and grasslands in South America, **Taxon**, v, 24, p, 53-66, 1975.

CRUZ, P.; QUADROS, F.L.F. DE.; THEAU, J.P.; FRIZZO, A.; JOUANY, C.; DURU, M.; CARVALHO, P.C.F. Leaf traits as functional descriptors of the intensity of continuous grazing in native grasslands in the south of Brazil, **Rangeland Ecology & Management**, v.63, p.350-358, 2010.

DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A, Root exsudates as mediators of mineral acquisition Root exsudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments, **Plant and Soil**, v,245, p,35-47, 2002

DUFF, S.M.G.; SARATH, G.; PLAXTON, W.C, The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism, **Plant Physiology**, v,90, p,791-800, 1994.

GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; PELLEGRINI, J.B.R.; BRUNETTO, G.; SAGGIN, A.; FLORES, J.P.C. Influência da adubação fosfatada e da introdução de espécies forrageiras de inverno na oferta de forragem de pastagem natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1663-1668, 2000.

GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. dos S.; BRUNETTO, G. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1085-1091, 2008.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Trans Mycol Soe**, v. 46, p. 235-279, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B, An evaluation of techniques to measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots, **New Phytologist**, v,84, p,489-500, 1980

GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Membrane-Mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, v.68, p.548-552, 1981.

GRANT, C.; BITTMAN, S.; MONTREAL, M.; PLENCHETTE, C.; MOREL, C. Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. **Canadian Journal of Plant Science**, v.85, p.3-14, 2005.

HARTNETT, D.C.; WILSON, G.W.T. The role of mycorrhizas in plant community structure and dynamics: lessons from grasslands. **Plant and Soil**. V.244, p.319–331, 2002.

HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; TANG, C.; JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. **Plant and Soil**, v, 248, p. 43-59, 2003.

LUGO, M.A.; NEGRITTO, M.A.; JOFRE, M.; ANTON, A.; GALETTO, L. Colonization of native Andean grasses by arbuscular mycorrhizal fungi in Puna: a matter of altitude, host photosynthetic pathway and host life cycles. **Microbiology Ecology**, v. 81, p.455–466, 2012.

MACHADO, J.M.; ROCHA, M.G DA.; QUADROS, F.L.F.DE.; CONFORTIN, A.C.C.; SANTOS, A.B.DOS.; SICHONANY, M.J.DE.O.; RIBEIRO, L.A.; ROSA, A.T.N.DA.; Morphogenesis of native grasses of Campos Biome under nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.22-29, 2013.

MARTINS, C.R.; MIRANDA, J.C.C.M.; MIRANDA, L.N. Contribuição de fungos micorrízicos arbusculares nativos no estabelecimento de *Aristida setifolia* kunth em áreas degradadas do cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.665-674, 1999.

MOHAMMADI, K.; KHALESRO, K.; SOHRABI, Y.; HEIDARI, G. A Review: Beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. v.1, p.310-319, 2011.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

PALLARÉS, O.R.; BARRETA, E.J.; MARASCHING, G.E. The South American Campos ecosystem. In: SUTTIE J.M.; REYNOLDS, S.G.; BATELLO, C. **Grasslands of the world**. Rome: FAO, Serie n° 34, p. 171–219, 2005.

PILLAR V.D. MULTIV, **Multivariate exploratory analysis, randomization testing and bootstrap resampling**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. Disponível em: <<http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedure for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Trans Br Mycol Soc**, London, v. 55, p. 158-161, 1970.

QUADROS, F.L.F.; TRINDADE, J.P.P e BORBA, M.A. Abordagem funcional da ecologia campestre como instrumento de pesquisa e apropriação do conhecimento pelos produtores rurais. In: PILLAR, V. DE P.; MÜLLER, S.C.; CASTILHOS, Z.M. DE S.; JACQUES, A.V.Á. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2009, p. 206-213.

RHEINHEIMER, D. S.; KAMINSKI, J. Resposta do capim-pensacola à adubação fosfatada e à micorrização em solo com diferentes valores de pH. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 201-205, 1994.

RYAN, M.; ASH, J. Effects of phosphorus and nitrogen on growth of pasture plants and VAM fungi in SE Australian soils with contrasting fertiliser histories (conventional and biodynamic). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.73, p.51–62, 1999.

TABATABAI, M,A,; BREMNER, J,M, Use of *p*-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity, **Soil Biology & Biochemistry**, v,1, p,301-307, 1969.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 964p.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

TIECHER, T.; SANTOS, D.R.DOS.; KAMINSKI, J.; CALEGARI, A. Forms of inorganic phosphorus in soil under different long term soil tillage systems and winter crops. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36 p.271-281, 2012.

WILSON, G.T.; HARTNETTE, D.C. Effects of mycorrhizae on plant growth and dynamics in experimental tallgrass prairie microcosms. **American Journal of Botany**, v.84, p.478-482, 1997.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou a complexidade dos ecossistemas campestres em relação aos aspectos microbiológicos e bioquímicos envolvidos na associação com bactérias diazotróficas e fungos de micorrizas arbusculares (FMAs), que atuam na dinâmica do fósforo e nitrogênio nas gramíneas forrageiras nativas dos Campos Sulinos.

As limitações de fertilidade impostas pelo solo, de fato condicionaram as espécies vegetais a utilizarem estes mecanismos associativos para a obtenção de nutrientes. No entanto, o nível de associação, bem como a dependência das gramíneas varia conforme suas características de crescimento. As espécies com lenta taxa de crescimento, mais adaptadas a ambientes caracterizados por severas limitações de fertilidade, apresentam uma associação mais específica, ou mais dependente. As espécies com maiores taxas de crescimento, que possuem uma maior capacidade de resposta à adubação, em geral de maior ocorrência nos locais de alta disponibilidade de nutrientes, apresentam reduções mais severas na associação. No entanto, possuem uma maior capacidade de aumento em produção de matéria seca sob adubação.

O presente estudo confirmou que as gramíneas nativas dos Campos Sulinos realizam associação com bactérias diazotróficas, e o uso de adubação com N e P tem um efeito negativo sob a ocorrência dos gêneros de bactérias diazotróficas quantificados. A contribuição da FBN medida, apresentou diferença entre as espécies, menor para o *P. notatum*, espécie de maior taxa de crescimento, que demonstrou alta capacidade de absorção de N do solo, justificando sua maior frequência nos Campos Sulinos em relação às demais espécies. A alta contribuição da FBN para a espécie *A. laevis*, caracterizada pelo lento crescimento, pode justificar sua adaptabilidade em solos de baixa fertilidade.

Considerando a nutrição em P e a associação com micorrizas arbusculares, as espécies de lento crescimento, como *A. laevis* apresentaram uma maior dependência micorrízica, e quando submetidas à elevação na disponibilidade de nutrientes não reduziram a micorrização. As espécies de menor dependência micorrízica, como *P. notatum*, sob condições de maior disponibilidade de nutrientes, alteram a sua micorrização radicular, sendo uma espécie mais adaptada a ambientes de maior fertilidade. Desta forma, apresentam uma maior produção de matéria seca sob elevação na disponibilidade de nutrientes embora, diminuam a associação.

Os estudos da FBN e dos FMAs relacionados aos ciclos biogeoquímico do N e P, são essenciais para os Campos Sulinos, pois são nutrientes de grande importância para todos os organismos que dependem deste ecossistema, sendo muitas vezes fatores limitantes ao crescimento das pastagens. Novas pesquisas devem avançar visando esclarecer como as associações que ocorrem entre microrganismos e as gramíneas forrageiras destas pastagens podem influenciar na dinâmica da vegetação, assim como, identificar quais os efeitos que manejos, como o pastejo e adubação apresentam sobre o crescimento destas espécies, com ênfase no sistema radicular, e quais as relações destes com alterações em nível de exsudatos

radiculares. Assim como, explorar as variações de dependência existentes entre as espécies com hábito de crescimento cespitoso e prostrado, e a partir disso, determinar o nível de importância que estas espécies possuem para os ciclos biogeoquímicos, podendo estas espécies desempenharem importantes serviços ecossistêmicos, como este trabalho sugere.