

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LUCIANA DELLA COLETTA

**Estudo da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas (família  
Fabaceae) arbóreas tropicais através do enriquecimento isotópico  
do  $^{15}\text{N}$**

Piracicaba

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LUCIANA DELLA COLETTA

**Estudo da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas (família Fabaceae) arbóreas tropicais através do enriquecimento isotópico do  $^{15}\text{N}$**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Martinelli

Piracicaba

2010

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Della Coletta, Luciana

Estudo da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas (família Fabaceae) arbóreas tropicais através do enriquecimento isotópico do  $^{15}\text{N}$  / Luciana Della Coletta; orientador Luiz Antonio Martinelli. - - Piracicaba, 2010.  
99 f.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ecologia florestal 2. Inoculação 3. Isótopos estáveis 4. Leguminosae  
5. Nodulação I. Título

CDU 631.461.5:621.039.8

*Aos meus queridos pais,  
Marcos e Sirlei pelo apoio  
e amor incondicional a  
seus filhos!*

Dedico

*Ao meu irmão Rafinha, meu  
grande companheiro nesta  
jornada, o meu maior  
orgulho!*

Ofereço

## AGRADECIMENTOS

Expresso aqui minha gratidão a todos aqueles cuja contribuição direta ou indireta foi de fundamental importância à realização do presente trabalho e indispensável ao contínuo aprendizado e amadurecimento pessoal e profissional.

A meu orientador Luiz Antonio Martinelli, por toda a orientação durante o desenvolvimento deste projeto, sua disposição em ensinar e incentivar sempre! Por apostar na minha capacidade, e com isso me permitir enxergar o mundo científico de forma tão interessante. Também agradeço pelas oportunidades oferecidas, as quais aumentaram o meu fascínio pela ciência.

Aos meus pais, meus amores, por terem feito tudo que estava ao alcance para me ajudar. Agradeço-os pelo carinho e amor, por me ensinarem, me corrigirem, me incentivarem, são meus verdadeiros exemplos de vida!

A meu irmão Rafinha pelo grande exemplo e companheirismo. Obrigada por agüentar as minhas crises e pela paciência enorme que só você tem, eu sei que morar só com a irmã se torna uma tarefa um pouco complicada, mas só de vez em quando. E por encarar comigo o grande calor da estufa nos dias de verão e também por várias vezes ter me ajudado a molhar todas as minhas plantas.

A toda a minha família pelo grande apoio recebido, incentivando-me a estudar e a lutar pelo futuro. Um agradecimento especial a minha querida bisavó Santa (*in memoriam*), meu exemplo de fé e luta, que ficou feliz da vida ao saber que eu seguiria a carreira acadêmica! Aos meus lindos avôs: Irma e Pedro, Maria e Domingos exemplos de dedicação, amor e muito carinho que só vó e vô sabem dar a seus netos! E também aos meus tios e primos que ficam sempre na torcida por mim!

Ao Prof. Takashi do CENA/USP pelos valiosos ensinamentos durante o projeto, por toda a atenção e grande ajuda com toda a parte experimental e também científica.

Ao Prof. José Albertino Bendassoli, pela ajuda desde o início do experimento e principalmente por todas as análises isotópicas enriquecidas realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP.

Ao Prof. Ricardo Ribeiro Rodrigues da ESALQ/USP que colaborou no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. José Leonardo da ESALQ/USP que esteve disponível em tirar todas as minhas dúvidas na fase inicial do projeto.

Ao Pesquisador Fabiano Balieiro da Embrapa Solos, RJ pela ajuda na elaboração inicial do projeto.

Ao Prof. Orivaldo Saggin Junior da Embrapa Agrobiologia, RJ pelos ensinamentos e preciosas dicas com as inoculações.

Ao Prof. Márcio Lambais da ESALQ/USP, e seus alunos Sandra e Éder pelas explicações e ajuda na hora de realizar o experimento de redução de acetileno.

Aos Professores Plínio Camargo e Marisa Piccolo pela convivência e ajudas necessárias no decorrer do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CAPES.

Ao Énio Tiago de Oliveira do CEBTEC (ESALQ/USP), por disponibilizar a estufa para o experimento e suas valiosas dicas na condução deste experimento

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Agrobiologia – Seropédica, RJ, por disponibilizar os inoculantes de rizóbio, os fungos micorrízicos e as sementes para o experimento.

Ao Rildo Moreira e Moreira e sua equipe da Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga, por nos receber e nos permitir a coleta de solos.

Ao Edmar, Duzão e Bethe, pela grande força (literalmente) com a coleta da tonelada de solo.

Ao Guerreiro e Sebastião, que disponibilizaram o seu tempo para me ajudar a fertilizar e montar os meus vasos.

Ao Chico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) pela ajuda com as inoculações no vaso.

A Helena Pescarin Chamma do Laboratório de Sementes (ESALQ/USP), pela ajuda e disponibilidade do laboratório para germinar minhas sementes.

Ao João Savalador (CENA/USP), que foi a minha salvação em me ajudar a eliminar todas as pragas que estavam atacando as minhas plantas.

A Gabriela Nardoto, pelo apoio, ajuda e grande incentivo que recebo durante estes anos.

A Fabiana pela constante ajuda e ensinamentos no laboratório e suas preciosas “dicas” no preparo e análise das amostras, e também a Simoni e ao Leo pela ajuda, principalmente no final do meu experimento quando eu estava quase louca com minhas plantinhas! E claro pela amizade e várias risadas durante estes anos!

A Toninha, Geraldo e ao Prof. Marcelo, pelas análises isotópicas realizadas no Laboratório de Ecologia Isotópica.

A estagiária Gabi, meu braço direito durante todas as fases do experimento, principalmente no “verão 40 °C” dentro da estufa, e também ao André que chegou no final, mas me ajudou muito com todas as amostras.

A Enriqueta do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (CENA/USP) por disponibilizar o moinho para que eu pudesse moer todas as minhas amostras;

A Mara e a Sandra do Laboratório de Fertilidade do Solo (CENA/USP) por todas as análises de fósforo.

Ao Prof. Angelo Pedro Jacomino, por disponibilizar o uso do cromatógrafo no Laboratório de Pós-Colheita (ESALQ/USP).

A Denise do Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ/USP) por me ensinar, ajudar e disponibilizar do seu tempo para analisar todas as minhas raízes para a contagem de fungos.

Ao Paulo, pela imensurável ajuda com os dados estatísticos, obrigada pelos ensinamentos e paciência.

A bibliotecária Marília, pela gentil revisão deste trabalho.

A todos estagiários do Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/USP que de alguma forma me ajudaram durante este projeto, e pela amizade e conversas na hora do cafezinho.

A minha grande amiga Bethe, companheira de “aventuras”, obrigada pelo incentivo, por compartilhar vários momentos de alegrias e também alguns de desesperadores durante estes anos, mas principalmente por sua amizade!

A Michela, grande amiga e exemplo de luta e coragem, obrigada por seus incentivos!

A todos os amigos do laboratório de Ecologia Isotópica. Os que já seguiram seu rumo: Michela, Zé Mauro, Jadson, Vânia, Joba, Maira, Maurício, Marquinhos, Susian, Sandrinha Furlan, Alessandra, Alexandre, Yoko, Anderson. E aos que ainda continuam na luta: Urso, Giovana, Nei, Robson, e principalmente aos amigos e companheiros de todos os dias da nossa sala: Tati, Silvia, Eráclito, Duzão, Luiz Felipe e Bethe.

As minhas amigas Rafa, Ju, Carol e Alicia que sempre estão presentes em todas as etapas da minha vida, obrigada pela nossa longa amizade.

Ao meu namorado Fernando pelo seu amor, carinho, dedicação, compreensão e muita paciência, e grande incentivador para eu seguir em frente com força e coragem e assim conseguir alcançar os meus objetivos. E também a toda a família Leme Godoy dos Santos pelo carinho.

A Deus sobre todas as coisas.

*O meu muito obrigada!*

*“Se não houver frutos  
valeu a beleza das flores.  
Se não houver flores  
valeu a sombra das folhas.  
Se não houver folhas  
valeu a intenção das sementes”*

*(Henfil)*

## RESUMO

DELLA COLETTA, L. **Estudo da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas (família Fabaceae) arbóreas tropicais através do enriquecimento isotópico do  $^{15}\text{N}$** . 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

A família Fabaceae abundante nos trópicos, desperta grande interesse para o uso em recuperação de áreas degradadas, já que em sua maioria, são lenhosas e perenes, se adaptam aos mais diversos ecossistemas brasileiros e são capazes de fazer associações simbióticas com bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, que fixam nitrogênio atmosférico fornecendo-o para a planta em uma forma reativa. Dentro deste contexto, o presente estudo avaliou em um experimento em casa de vegetação como a fixação biológica de nitrogênio em três espécies pertencentes a família Fabaceae variou em função da adição de nitrogênio mineral em diferentes doses e através de tratamentos incluindo-se a inoculação com bactérias do gênero *Rhizobium* e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Os resultados obtidos através da atividade da redução de acetileno indicaram que os nódulos se encontravam ativos no último mês de experimento nas três espécies fixadoras de  $\text{N}_2$ . Houve uma grande variação na porcentagem de N na planta proveniente da fixação (NPPfix). Quando as plantas cresceram em meio onde a disponibilidade de N era baixa, sem a aplicação deste nutriente no solo, a FBN foi favorecida, variando de 34 a 84%. Pelo contrário, foi possível observar que a fixação foi inibida em vasos onde a adição de nitrogênio foi elevada. Devido ao uso do solo não esterilizado, os inoculantes aplicados (bactérias e fungos) parecem ter competido com a microbiota nativa do solo, assim sendo, diferenças entre os tratamentos inoculados e o controle (sem inoculação) não foram encontradas neste estudo.

Palavras-chave: Fixação biológica do nitrogênio. Leguminosas. Restauração ecológica. Isótopos estáveis do nitrogênio. Fertilizante marcado.

## ABSTRACT

DELLA COLETTA, L. **Estimates of biological nitrogen fixation by tropical legume trees (Fabaceae) using  $^{15}\text{N}$  labeled fertilizer**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

Legumes (Fabaceae) are abundant in the tropics and considered as of great interest as restorer of degraded areas, since most of them are woody and perennials, adapted to several Brazilian ecosystems and able to make associations with bacteria belonging to *Rhizobium* genus, which fix atmospheric nitrogen, and giving it to the plants in a reactive form. In this context, this study evaluated in a greenhouse experiment how nitrogen biological fixation (FBN) varied in three species of Fabaceae family according to the N-mineral addition in different doses and according to treatments including inoculation with bacteria of *Rhizobium* genus and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The results obtained from the acetylene reduction activity indicate that the nodules were active in the last month of experiment in the three  $\text{N}_2$ -fixing species. There was a wide variation in the plant N percentage derived from fixation (NPPfix). When plants grew in a soil where N availability was low, without application of this nutrient in the soil, the BNF was favored, ranging the NPPfix from 34 to 84%. On the contrary, it was possible to observe that FBN was inhibited in the pots where N additions were higher. Due to the use of unsterilized soil, the applied inoculants (bacteria and fungi) appear to have competed with the native soil microbiota, thus differences between inoculated and control (without inoculation) could not be established in this study.

Keywords: Biological nitrogen fixation. Legumes. Ecological Restoration. Nitrogen stable isotope.  $^{15}\text{N}$  labeled fertilizer.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 Hipóteses.....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Uma Visão Geral do Ciclo do N, com Ênfase na Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) e na Simbiose Rizóbio-Leguminosa.....	15
2.2 Associações Micorrízicas.....	17
2.3 Interações entre Nitrogênio e Fósforo.....	19
2.4 Avaliação da Fixação Biológica do Nitrogênio.....	20
2.4.1 Composição Isotópica do Nitrogênio.....	20
2.4.2 Redução de Acetileno.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 Delineamento Experimental.....	24
3.1.1 Preparo e Caracterização do Solo.....	26
3.1.2 Pré-Germinação das Sementes.....	27
3.1.3 Semeadura das Espécies e Inoculação.....	28
3.1.4 Fertilização.....	30
3.2 Pragas.....	31
3.3 Clorose.....	31
3.4 Amostragem.....	33
3.5 Análises Químicas e Isotópicas.....	33
3.5.1 Determinações Isotópicas.....	34
3.5.2 Determinação de Fósforo e Micronutrientes.....	37
3.6 Atividade de Redução do Acetileno.....	38
3.7 Determinação de Micorrizas Arbusculares.....	39
3.8 Análises Estatísticas.....	41
<b>4 RESULTADOS</b> .....	42
4.1 Composição Isotópica e Concentração de N no Solo.....	42
4.2 Características Nutricionais das Espécies.....	44

4.2.1 <i>Acacia polyphylla</i> (espécie referência).....	44
4.2.2 <i>Enterolobium contortisiliquum</i> .....	49
4.2.3 <i>Erythrina speciosa</i> .....	54
4.2.4 <i>Mimosa caesalpinifolia</i> .....	59
4.3 Atividade da Redução de Acetileno.....	64
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	66
5.1 Fixação Biológica do Nitrogênio.....	66
5.2 Disponibilidade de Nitrogênio (N) e Fósforo (P).....	69
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
<b>ANEXOS</b> .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

Devido à acentuada perda de cobertura vegetal natural em nosso país houve um aumento considerável de iniciativas que visam restaurar este tipo de vegetação com o objetivo de se readquirir as funções e os processos ecossistêmicos (CLEWELL, 2000; SER, 2004) e preservar a biodiversidade (DOBSON et al., 1997; YONG, 2000; LAMB et al., 2005; CHAZDON, 2008).

Dada a magnitude das ações a serem realizadas para a restauração de ecossistemas florestais degradados, principalmente ao longo das matas ciliares e outras áreas destinadas à preservação permanente (RODRIGUES; GANDOLFI, 2004), a seleção de espécies adequadas assume grande importância não só para garantir a sobrevivência no campo, mas também para propiciar o ambiente adequado ao surgimento de outras espécies, a fim de facilitar a sucessão vegetal e reverter o processo de degradação (SOARES; RODRIGUES, 2008). A complexidade da estrutura e do funcionamento dos ecossistemas tropicais, além da escassez de informações sobre as exigências nutricionais das espécies, são alguns dos fatores que dificultam a restauração de áreas degradadas (SORREANO, 2006). Assim sendo o simples plantio de espécies da flora regional não garante a sobrevivência destas mudas, comprometendo a reconstrução da floresta (WHITMORE, 1989; 1996).

Nos ecossistemas terrestres, onde foi removida a cobertura florestal, acarretando o rompimento do fluxo de nutrientes entre a serapilheira e o componente vegetal vivo, o nitrogênio (N) torna-se um dos elementos mais limitante para a regeneração natural (VITOUSEK; HOWARTH, 1991). A disponibilidade de N pode atuar como um mecanismo importante no processo de sucessão natural. Em áreas degradadas tropicais, onde a disponibilidade é normalmente baixa, as leguminosas arbóreas mostram-se como uma fonte primária de nitrogênio capaz de permitir a recolonização vegetal e o aumento da biodiversidade (SIDDIQUE et al., 2008), contribuindo com a recuperação do solo pela deposição de material vegetal com baixa relação C:N (NARDOTO et al., 2008), aumentando a atividade biológica e atuando como agente formador e estabilizador da matéria orgânica do solo (LAVELLE, 2000; RESH et al., 2002).

Neste sentido, a família Fabaceae (Leguminosae) possui um papel importante, principalmente no que se refere ao seu uso para exploração econômica e para a recuperação de áreas degradadas (FRANCO; FARIA, 1997; SPRENT, 2001), pois em determinadas condições nota-se que algumas espécies de leguminosas, através de sua simbiose com

bactérias do gênero *Rhizobium*<sup>1</sup>, são capazes de adicionar nitrogênio reativo ao sistema, através da fixação biológica do nitrogênio (FBN) (JENNY, 1950; ROBERTSON; ROSSWALL, 1986; VITOUSEK; HOWARTH, 1991; CLEVELAND et al., 1999; CREWS, 1999; GALLOWAY et al., 2004). Neste processo as bactérias utilizam as plantas como fonte de carbono e energia, enquanto as mesmas liberam o N fixado que será convertido em N orgânico, para utilização pela planta (POOLE; ALLAWAY, 2000; LODWIG et al., 2003).

A família Fabaceae com mais de 19.000 espécies existentes amplamente distribuídas em todo o mundo, ocupa os mais variados habitats (LEWIS et al., 2005) e apresenta significativa riqueza na composição arbórea das formações florestais tropicais (VITOUSEK et al., 2002). No Brasil, é uma das mais diversas e abundantes famílias de plantas superiores, estando presente praticamente em todos os seus maiores biomas (ALLEN; ALLEN, 1981; FELFILI et al., 1993; MOREIRA et al., 1992; SOLBRIG, 1996). Segundo Sprent (1995), estas espécies evoluíram nos trópicos, desta maneira, as leguminosas se encontram bem adaptadas em regiões onde o solo é bastante intemperizado, com acidez elevada e baixa disponibilidade de fósforo (CREWS, 1999).

Como já observado, as plantas que crescem durante os primeiros estágios de sucessão de uma floresta tropical tendem a ser mais limitadas por N do que por fósforo (P) (HERBERT et al., 2003; DAVIDSON et al., 2007), principalmente em áreas degradadas que sofreram mudanças de uso da terra por um longo período (BUSCHBACHER et al., 1988; DAVIDSON et al., 2004). Espécies arbóreas de uma floresta secundária possuem uma variedade de estratégias na aquisição e uso do P e do N, incluindo baixas ou altas concentrações de nutrientes nos tecidos (DENICH, 1991; SIDDIQUE et al., 2008) e as árvores da família Fabaceae estão entre as mais abundantes nestas florestas tropicais (GÜSEWELL, 2004; VITOUSEK et al., 2002).

Espécies consideradas importantes no processo de restauração de sistemas degradados, como as leguminosas, necessitam de estudos ecofisiológicos mais aprofundados, não somente pelo seu interesse intrínseco, mas também porque um entendimento mais aprofundado sobre a aquisição de nitrogênio por essas plantas é essencial para um manejo adequado em ambientes degradados (SPRENT, 1995). Desta maneira, o objetivo deste estudo foi investigar como diferentes níveis de nitrogênio no solo em diferentes tratamentos, com inoculação de rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), interferem na fixação biológica de nitrogênio

---

<sup>1</sup> Por facilidade, no texto, serão empregados termos que se atribuem às leguminosas a capacidade de se fixar nitrogênio atmosférico, quando, na verdade, são bactérias simbióticas do gênero *Rhizobium* que tem essa capacidade.

atmosférico de espécies da família Fabaceae (Leguminosae) florestais nativas frequentemente utilizadas em programas de restauração ecológica no Estado de São Paulo.

### 1.1 Hipóteses

- Elevadas doses de N limitam a fixação de  $N_2$ , onde o aumento da disponibilidade de N no solo pode ter potencial para inibir a FBN em florestas tropicais, conseqüentemente a porcentagem de N na planta proveniente da fixação (NPPfix) será menor que a encontrada para a porcentagem de N derivado do solo (NPPS) e do fertilizante (NPPF), ou seja, a %NPPfix pode ser inibida pelo excesso de N disponível para a planta;
- A carência de nitrogênio induz a fixação de  $N_2$  pela FBN através da associação de algumas espécies de leguminosas com bactérias fixadoras de  $N_2$  e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), conseqüentemente a porcentagem de N na planta proveniente da fixação (NPPfix) será maior que a encontrada para a porcentagem de N derivado do solo (NPPS) e do fertilizante (NPPF).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Uma Visão Geral do Ciclo do N, com Ênfase na Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) e na Simbiose Rizóbio-Leguminosa

O nitrogênio é o componente mais abundante na atmosfera, encontrando-se numa forma combinada ( $N_2$ ) que as plantas não são capazes de utilizar. Nos sistemas terrestres, é o elemento químico mais limitante para o crescimento vegetal (VITOUSEK et al., 1997). As plantas requerem nitrogênio em quantidade superior a qualquer outro nutriente mineral, e a disponibilidade deste nutriente geralmente limita a produtividade das plantas em muitos ecossistemas naturais e agrícolas (EPSTEIN; BLOOM, 2005).

Na ausência de intervenção humana não há quantidade suficiente de N prontamente disponível no ambiente capaz de sustentar a população humana. Portanto, o ciclo global do N tem sido enormemente alterado principalmente porque o homem tem convertido o  $N_2$  inerte em formas reativas de N (MELILLO, 1996), principalmente em virtude do aumento das atividades agrícolas, da queimada de combustíveis fósseis, e outras atividades humanas (VITOUSEK et al., 1997; GALOWAY et al., 2003; HASTINGS et al., 2009). Dentro do cenário de desmatamento, da conversão da vegetação nativa em pastagem ou área agrícola, acompanhado pela intensificação e melhoramento das técnicas agrícolas, a expansão do cultivo de plantas que são capazes de fazer associações com bactérias fixadoras de  $N_2$  atmosférico, o aumento do consumo de fertilizantes nitrogenados, o crescimento populacional e a rápida urbanização, aparecem como principais responsáveis pelas alterações no ciclo do N nas regiões tropicais, sendo o Brasil um dos maiores contribuintes por essas alterações (FILOSO et al., 2006).

Em áreas degradadas ou fortemente alteradas pela ação antrópica, onde o teor de matéria orgânica do solo já é muito baixo (SOARES, 2007), o crescimento das plantas é induzido pela adição de grandes quantidades de adubos orgânicos, fertilizantes nitrogenados ou pelo processo natural da FBN, que constitui na quebra da ligação tripla do  $N_2$  atmosférico. No entanto, apenas uma parcela relativamente pequena de espécies de procariotos possui a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o  $N_2$  em N biologicamente disponível. Estes organismos são chamados de fixadores de  $N_2$  ou diazotróficos e são eles os mediadores do processo de FBN, que na sua maioria, envolve as formas de simbiose microrganismo-planta vascular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). É um processo que ocorre geralmente na ausência

de oxigênio. A fixação do nitrogênio é sensível ao O<sub>2</sub>, pois as duas proteínas que compõem a nitrogenase (Fe proteína e Fe-Mo proteína) são desnaturadas pelo O<sub>2</sub>. Quando as bactérias estão fixando o nitrogênio atmosférico, a leghemoglobina só é sintetizada se a planta e a bactéria estiverem em simbiose (ELLFOLK, 1972) e localizarem-se no citoplasma das células infectadas do nódulo (VERMA; BAL, 1976). O nódulo é uma estrutura que possui, entre outras funções, a de proteger a enzima nitrogenase (responsável pela FBN) contra o oxigênio que inativa a enzima. O oxigênio fica adsorvido à leghemoglobina, evitando, assim, sua inativação. A leghemoglobina tem a importante função de transportar oxigênio em taxas suficientes para o metabolismo aeróbio dos bacteróides, sem excessos que possam inibir a atividade da nitrogenase (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), promovendo uma coloração rósea no interior da porção central. Tal coloração normalmente é utilizada como indicativo de eficiência simbiótica (RIBEIRO; RAMOS, 2006).

A simbiose rizóbio-leguminosa forma nódulos radiculares, que são estruturas nas raízes habitadas por microrganismos específicos como as bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e os actinomicetos do gênero *Frankia*, que fixam o N<sub>2</sub> atmosférico. Esse N reativo entra nos processos do ciclo de N através das plantas, animais, microrganismos, solos, soluções e sedimentos. Nessa relação o microrganismo (rizóbio) utiliza a planta (leguminosa) como fonte de carbono, enquanto libera o N fixado que será convertido em N orgânico e utilizado pela planta ou liberado como N inorgânico reduzido (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (POOLE; ALLAWAY, 2000; LODWIG et al., 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Como simbioses intracelulares, a bactéria fixa o N<sub>2</sub> atmosférico utilizando o Mo como proteína da nitrogenase e fornece este N fixado para a planta, assumindo uma importância agrícola e ecológica como fonte disponível de N fixado para o crescimento das plantas (STACEY, 2006).

Esta simbiose constitui uma alternativa ecológica e econômica aos fertilizantes nitrogenados porque, além de dispensar o uso desses adubos, todo o N fixado biologicamente é aproveitado pela planta, quando em associação simbiótica, tornando-se uma importante ferramenta de recuperação de ecossistemas degradados (FRANCO; DÖBEREINEIR, 1994; FRANCO; FARIA, 1997). Porém, a ausência de nodulação ou nodulação ineficiente em determinada espécie sob determinadas condições ambientais, é decorrente de fatores limitantes ao estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose (DE SOUZA MOREIRA et al., 1992). Tanto os fatores bióticos como os abióticos podem atuar sobre a bactéria e/ou sobre o hospedeiro afetando a simbiose e seus efeitos também podem variar dependendo das espécies simbioses envolvidas, além do mais, as leguminosas precisam investir de 30 a 50% do carbono fixado para manter as bactérias nodulíferas já que a FBN é

um mecanismo de nutrição de nitrogênio que consome muita energia (BURRIS; ROBERTS, 1993). Os metabolismos do simbionte e do hospedeiro são complementares e cada um estimula o outro a produzir substâncias específicas. Para ocorrer a nodulação, a planta precisa ser susceptível e compatível com o tipo de rizóbio que, por sua vez deve ser capaz de multiplicar e sobreviver na raiz (KERBAUY, 2004). Quando a liberação de exudados pela planta não está adequada, a simbiose pode não ocorrer e dessa forma comprometer a FBN.

A família das leguminosas é muito diversificada, com padrões variáveis de FBN (SPRENT, 2005). Diferenças na ocorrência de nodulação e taxas de FBN são relacionadas com a evolução taxonômica dentro da família (SPRENT, 1995; CREWS, 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A maioria das espécies não nodulíferas pertencem ao grupo mais primitivo, as Caesalpinioideae (ALLEN; ALLEN, 1981; FARIA; LIMA, 1998; SPRENT, 2001). Nesse grupo, 76% das espécies já examinadas são incapazes de estabelecer simbiose com rizóbio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nas Mimosoideae e Papilonoideae, grupos mais evoluídos, predominam espécies nodulíferas (SPRENT, 2001), das espécies já analisadas 13% e 4% respectivamente, são incapazes de nodular (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), o que pode ser entendido como uma maior adaptação dos grupos evolutivamente mais recentes a esta interação. Assim, provavelmente, a nodulação nas leguminosas resultou de um processo evolutivo que selecionou a característica de fornecer nitrogênio mais eficientemente, de modo a atender às altas demandas desta família (MCKEY, 1994). Desta maneira, essas plantas interferem na dinâmica do nitrogênio de uma maneira distinta das espécies com menores concentrações de nitrogênio (REICH et al., 1999; AERTS; CHAPIN, 2000).

## **2.2 Associações Micorrízicas**

As micorrizas são associações simbióticas entre plantas e fungos. Nela, fungos micorrízicos, em troca de carboidratos, vitaminas e outros minerais, geralmente beneficiam seus hospedeiros por elevar a área de absorção do sistema radicular e a capacidade de assimilação de água e nutrientes, como N e P (HE et al., 2003; HOBBIIE et al., 2005).

Dentre os vários tipos de associações existentes, a micorriza arbuscular (MA) é a mais comumente observada em ambientes tropicais. Nos trópicos as MAs são cerca de dez vezes mais abundantes que as ectomicorrizas (JANOS, 1980a), incluindo quase todas as espécies de interesse agrônomo, pastoril e espécies florestais nativas dos trópicos (JAKOBSEN, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Nesta associação, os fungos colonizam as células do córtex radicular, bem como os espaços entre elas (STURMER; SIQUEIRA, 2006). Apesar de formar, em alguns grupos taxonômicos, vesículas e hifas, a estrutura mais característica desta associação é o arbúsculo, que são ramificações produzidas pelos fungos e que são revestidas pelo plasma de membrana das células do córtex (CHAPIN et al., 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Devido à importância desta associação, os fungos micorrízicos são de grande importância no estabelecimento de espécies em ambientes em processo de regeneração, principalmente em áreas degradadas (SCHMIDT et al., 1999; WALI, 1999), as quais são geralmente caracterizadas por apresentarem solos com deficiência de nutrientes, principalmente N e P (POUYU-ROJAS et al., 2006).

Programas de restauração florestal podem ser prejudicados pelo baixo estabelecimento e desenvolvimento inicial de mudas, em consequência de limitações químicas, que podem ocorrer tanto pelo fornecimento inadequado de nutrientes essenciais a planta ou pela toxidez de elementos nocivos que inibem o desenvolvimento das raízes (TELES et al., 1999). Desta forma, fungos micorrízicos favorecem a nutrição das plantas, melhorando a absorção de água e nutrientes do hospedeiro - principalmente o P, mas também N, Zn e Cu (CLARK; ZETO, 2000), aumentando não só as taxas de crescimento, bem, como a sobrevivência de mudas de muitas espécies florestais tropicais (JANOS, 1980b). Os fungos também podem interferir na agregação do solo, além de atuar como agente de controle biológico de microrganismos fitopatogênicos de raízes (BETHLENFALVAY; LINDERMAN, 1992; NEWSHAM et al., 1995; SAWYER et al., 2003), promovendo maior tolerância a estresses diversos (DE SOUZA; SILVA, 1996; FRANCO; BALIEIRO, 2000). De acordo com Norby e Jackson (2000), as próprias estruturas das micorrizas compreendem uma fração substancial da matéria orgânica, que podem ser consideradas fontes de nutrientes para o solo.

Estima-se que a grande maioria das espécies de plantas são capazes de formar MAs (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Desta forma, a prática da inoculação de espécies de FMAs selecionadas em mudas facilita o processo de revegetação, seja por favorecer o desenvolvimento destas mudas, seja por interferir benéficamente na dinâmica do processo de sucessão (JANOS, 1996, ZANGARO et al., 2000, 2002, 2003). A inoculação mostra-se ainda mais interessante no caso das leguminosas (nativas ou introduzidas), uma vez que características intrínsecas das plantas deste grupo permitem que estas promovam uma melhoria tanto pela deposição do material vegetal como pela reciclagem de nutrientes, permitindo assim o posterior estabelecimento de outras espécies vegetais mais exigentes no processo de sucessão (MARTINS et al., 2006).

### 2.3 Interações entre Nitrogênio e Fósforo

Por definição, os nutrientes minerais possuem funções específicas e essenciais no metabolismo das plantas. O N é um constituinte fundamental das proteínas, e, portanto, tem um papel essencial em todas as atividades enzimáticas, enquanto o P está intimamente envolvido na transferência de energia dentro da célula (ATP e NADPH) e, junto com o N, é um elemento estrutural importante dos ácidos nucleicos (MARSCHNER, 1995). Em nível de espécie, a razão N:P nas folhas tem sido usada como um indicador da limitação nutricional onde,  $N:P < 16$  indica uma maior limitação por N, valores entre  $14 < N:P < 16$  indica uma co-limitação entre N e P, e  $N:P > 16$  indica uma maior limitação por P (AERTS; CHAPIN, 2000). Alguns elementos como N e P são facilmente retranslocados de um órgão para outro dentro da planta (TAIZ; ZEIGER, 1991). Independente do tipo fenológico, a retranslocação tende a ser mais alta para P (~ 60 %) que para N (~ 40 %) nos ecossistemas tropicais (AERTS; CHAPIN, 2000).

A FBN requer vários nutrientes, tais como Mo, Fe e S, os quais são cofatores essenciais da nitrogenase. Além disso, devido ao alto custo energético da FBN, a planta necessita de uma elevada demanda de P, podendo a deficiência neste elemento afetar de modo generalizado as simbioses de leguminosas (ISRAEL, 1987; KENNEDY; COCKING, 1997; GEHRING et al., 1999; CHAPIN et al., 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Cole e Heil (1981) estimaram em média 7 kg de N ganho via FBN por kg de P adicionado como fertilizante, devido a um melhor estado nutricional da planta hospedeira e requerimento de P direto do rizóbio (BECK; MUNNS, 1984; SMART et al., 1984; ISRAEL, 1987; GILLER; WILSON, 1991).

Na bactéria, o fósforo parece ativar o gene para a síntese da nitrogenase (STOCK et al., 1990) e em muitos casos, a taxa de fixação de N parece ser controlada pela razão N:P no solo (CHAPIN et al., 1991). Alguns modelos sugerem que é energeticamente vantajoso, isto é, há um menor requerimento de fotossintato, para obter N via radicular do que fixar  $N_2$  atmosférico (VITOUSEK; FIELD, 2001), o que é consistente com o fato de que plantas dependentes unicamente da FBN possuem maiores concentrações de P (SPRENT, 1999) para atingir o crescimento ótimo do que plantas cujo suprimento de N é dependente do N disponível no solo, já que o fósforo é particularmente pouco móvel no solo e sua taxa de difusão fortemente limita sua disponibilidade para as raízes. Por exemplo, Sanginga et al. (1995) observaram que *Gliricidia sepium* noduladas, uma espécie amplamente utilizada em sistemas agroflorestais, somente apresentou uma resposta a P nos níveis mais altos de

aplicação deste fertilizante, o que provavelmente refletiu uma necessidade básica para a planta crescer. Ribet e Drevon (1996) encontraram para *Acacia mangium* um comportamento similar na aquisição de P para crescer em ambientes onde predominam a fixação de N<sub>2</sub>.

Nos casos onde há um suprimento adequado de N-mineral no solo, a tendência é de uma redução drástica na nodulação das leguminosas, como demonstrado por Moreira e Siqueira (1995) estudando quatro espécies de leguminosas nodulantes com diferentes fatores nutricionais limitantes, como o N e o P, isto porque a nodulação ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta. Na presença de N-mineral estas demandas são reduzidas não ocorrendo, portanto, estímulo à nodulação. Assim, espécies arbóreas podem ser mais afetadas pelo N combinado do que culturas anuais, porque ocorre ampla variação da FBN em virtude da idade e redistribuição do N na planta e no perfil do solo devido à mineralização da matéria orgânica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em florestas tropicais onde não há limitação por N (MARTINELLI et al., 1999), raramente há ocorrência de nódulos em leguminosas, no entanto, quando há uma restrição na disponibilidade de N, o processo de FBN aumenta. Em florestas primárias perturbadas (aberturas de pequenas clareiras e estradas) e florestas secundárias na Amazônia Central a ocorrência de nódulos em leguminosas é observada esporadicamente, ocorrendo mais frequentemente em solos cultivados onde geralmente há grandes perdas de N (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1980).

## 2.4 Avaliação da Fixação Biológica do Nitrogênio

### 2.4.1 Composição Isotópica do Nitrogênio

O nitrogênio possui dois isótopos estáveis <sup>14</sup>N e <sup>15</sup>N. O isótopo <sup>14</sup>N é o mais abundante, correspondendo a 99,6337% de N na atmosfera, enquanto o <sup>15</sup>N é de aproximadamente 0,3663% (JUNK; SVEC, 1958). A razão de <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N (0,0036765) na atmosfera é constante. Portanto, o N<sub>2</sub> atmosférico (0,3663% <sup>15</sup>N) é usado como o padrão nas análises de <sup>15</sup>N e que por definição seu δ<sup>15</sup>N é igual a 0‰ (MARIOTTI, 1983).

A razão entre os dois isótopos estáveis do nitrogênio (<sup>14</sup>N e <sup>15</sup>N) varia na biosfera como resultado de fracionamento em processos físicos, químicos e biológicos. Diante disso, o uso do <sup>15</sup>N tem-se tornado a forma mais prática de medir a fixação biológica do nitrogênio, principalmente em sistemas simbióticos com leguminosas (PEOPLES et al., 1989; BODDEY et al., 2000).

Neste estudo, dois métodos foram usados para quantificar, através da porcentagem de nitrogênio na planta proveniente da fixação (NPPfix), a contribuição relativa da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas:

- a) método com uso das variações naturais de  $^{15}\text{N}$  (abundância natural);
- b) método de marcação do solo com  $^{15}\text{N}$  ou de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ .

Estes são métodos idênticos, diferindo somente quanto à adição de  $^{15}\text{N}$  ao solo, para marcação.

#### *a) Abundância Natural de $^{15}\text{N}$*

Esta técnica explora diferenças de ocorrência natural na abundância de  $^{15}\text{N}$  entre o nitrogênio do solo disponível para as plantas e o  $\text{N}_2$  atmosférico (BODDEY et al., 2000). Ela se baseia no fenômeno comumente observado que o N mineral do solo ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) é naturalmente enriquecido em  $^{15}\text{N}$  comparado com o  $\text{N}_2$  atmosférico (SHEARER; KOHL, 1986).

Estimativas da fixação do  $\text{N}_2$  atmosférico em leguminosas com uso de variação natural de  $^{15}\text{N}$  requer que haja uma diferença mensurável na abundância de  $^{15}\text{N}$  entre as duas maiores fontes de N para a planta fixadora, ou seja, entre o  $\delta^{15}\text{N}$  do solo e o da  $\delta^{15}\text{N}$  da atmosfera (normalmente cerca de 3 a 4 ‰, ver SHEARER; KOHL, 1986). Para esta estimativa, a abundância de  $^{15}\text{N}$  no N mineral é obtida analisando uma planta referência não-fixadora de N, a qual é basicamente dependente do N presente solo para seu crescimento. Com o aumento da FBN, a abundância natural do  $^{15}\text{N}$  nas plantas fixadoras de N diminui, em função da “diluição” do N assimilado no solo pelo  $\text{N}_2$  atmosférico (PEOPLES et al., 1989), conseqüentemente, a assinatura isotópica das leguminosas quando estão fixando N da atmosfera, tende a ser aproximadamente de 0 a 2‰ (HÖGGER, 1997).

Dessa forma, variações regulares da razão isotópica de N ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) podem proporcionar informações úteis a respeito das fontes de N utilizadas pelas plantas.

#### *b) Marcação do solo com $^{15}\text{N}$ ou diluição do isótopo de $^{15}\text{N}$*

A técnica disponível mais adequada para quantificar a FBN é a diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (BODDEY; URQUIAGA, 1992). Tal técnica possui a vantagem de ser integrada, pois permite quantificar a contribuição da FBN durante o ciclo de uma planta e a avaliar o N

fixado que foi incorporado dentro da planta, tornando possível mensurar o benefício da FBN durante o crescimento da espécie em interesse (PEOPLES et al., 1989).

A técnica original de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  (MCAULIFFE et al., 1958) e suas modificações posteriores (FRIED; MIDDLEBOE, 1977; CHALK, 1985; LEDGARD et al., 1985; CHALK; SMITH, 1994), baseiam-se na alteração da proporção natural entre os isótopos  $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$ , acrescentando adubos nitrogenados artificialmente enriquecidos (% em átomos de  $^{15}\text{N} > 0,3663$ ) em proporção conhecida ao meio de crescimento de plantas fixadoras de  $\text{N}_2$ . A taxa de aplicação deste fertilizante deve ser adequada para que a fixação do  $\text{N}_2$  não seja inibida (HE et al., 2003). Portanto, as plantas que obtêm além do nitrogênio marcado proveniente do solo, o N atmosférico, sofrem uma diluição no seu enriquecimento em  $^{15}\text{N}$ . Quanto maior a magnitude da diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado, e conseqüentemente, maior a contribuição da FBN (HE et al., 2003; QUESADA, 2005).

A aplicação desta técnica depende da premissa básica de que as plantas fixadoras e as testemunhas (leguminosas não noduladas) devam absorver N do solo com a mesma marcação. Para satisfazer esta condição é necessário que a testemunha explore um volume de solo semelhante ao da planta nodulada e que apresente uma marcha de absorção de N do solo semelhante a planta fixadora (FRIED; MIDDLEBOE, 1977; BODDEY, 1987).

Desta maneira, o uso de traçadores de  $^{15}\text{N}$  permite seguir e quantificar este nutriente na planta em diferentes compartimentos de um sistema em estudo. A principal vantagem é que permite a distinção do nitrogênio na planta entre o solo e o fertilizante  $^{15}\text{N}$ , fornecendo informações acerca do sistema e estimando as taxas de transformação do N (TRIVELIN et al., 1994).

A maioria dos estudos realizados utilizando a fertilização com o  $^{15}\text{N}$  enriquecido são conduzidos na área agrônômica (TRIVELIN et al., 1994; GAVA et al., 2003; BOARETTO et al., 2007; FENILLI et al., 2007). No entanto, para espécies destinadas à restauração florestal, o conhecimento sobre a capacidade de fixar  $\text{N}_2$  através da simbiose rizóbio-leguminosa, sua participação no ciclo do nitrogênio e potencial contribuição para a reversão dos processos de degradação ainda é escasso, principalmente no que se diz respeito a experimentos conduzidos em casa de vegetação.

#### 2.4.2 Redução de Acetileno

A redução de acetileno é uma medida indireta da fixação biológica de nitrogênio. Nela, a atividade da nitrogenase (que reduz o  $N_2$  em  $NH_3$ ) é detectada por meio da redução do acetileno ( $C_2H_2$ ) em gás etileno ( $C_2H_4$ ), a qual ocorre em uma razão proporcional à primeira (DILWORTH, 1966; SCHOLLHORN; BURRIS, 1966).

O etileno é o único produto da reação de redução de acetileno, não inibindo a atividade da enzima, nem sendo reduzido pela nitrogenase (HARDY et al., 1968; BODDEY, 1987). A produção do etileno é então proporcional a atividade da nitrogenase do sistema na relação 3:1, ou seja, 3 moles de acetileno reduzido para cada 1 mol de N fixado (HARDY et al., 1968; VITOUSEK, 1994; VITOUSEK; HOBBIIE, 2000; CREWS et al., 2001; REED et al., 2008).

A atividade desta enzima é um forte indicativo da contribuição da FBN para as plantas além de ser uma medida simples e de alta sensibilidade nesta detecção. Sua utilização como método de quantificação da FBN para as plantas é muito questionada por diversos autores; muitos deles ressaltam que esta se trata de uma medida pontual, além da taxa de contribuição da FBN apresentar alterações sensíveis ao longo do dia (PEOPLES et al., 1989; DALTON; KRAMER, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi conduzido em estufa no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), Universidade de São Paulo, Campus “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, entre as coordenadas 22°42'39" S e 47°38'15" W. A temperatura da estufa manteve-se em 25°C, em média, e a umidade relativa do ar em torno de 70%.

#### 3.1 Delineamento Experimental

O delineamento utilizado foi experimento fatorial 3x4x4, sendo considerado os seguintes fatores: três tratamentos (sem inoculação, inoculação com rizóbio e inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares), quatro doses diferentes de nitrogênio, e quatro espécies, representada por um vaso com uma planta. Cada combinação dos níveis dos fatores foi repetida 4 vezes, perfazendo assim um total de 48 repetições por espécie e 192 vasos em todo o experimento. As espécies em questão foram indicadas pelo Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Rodrigues (ESALQ/USP), especialista em recuperação de áreas degradadas (Tabela 1). Das quatro espécies, três espécies de leguminosas são potencialmente fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico e uma leguminosa não-fixadora de N<sub>2</sub> atmosférico (espécie referência), todas pertencentes ao grupo das pioneiras e/ou secundárias iniciais (LORENZI, 1998).

Tabela 1 – Espécies mais comumente utilizadas ou recomendadas em projetos de restauração florestal no Estado de São Paulo, com ênfase nas formações ribeirinhas

Família/Sub-família	Nome científico	Autor	Nome Popular
	<b>Leguminosa não-fixadora de N<sub>2</sub> atmosférico – Espécie referência<sup>1</sup></b>		
Fabaceae/ Mimosoideae	<i>Acacia polyphylla</i>	D.C	Monjoleiro
	<b>Leguminosas potencialmente fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico<sup>2</sup></b>		
Fabaceae/Mimosoideae	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	(Vell.) Morong	Tamboril
Fabaceae/Papilionoideae	<i>Erythrina speciosa</i>	Andrews	Mulungu
Fabaceae/Mimosoideae	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	Bentham	Sabiá

<sup>1</sup> Ausência de nódulos comprovada segundo Faria et al. (1987); Faria e Lima (1998) e Soares (2007).

<sup>2</sup> Faria (1993) e Soares (2007).

O experimento foi conduzido por seis meses, de julho de 2009 a janeiro de 2010 quando teve início o desbaste das plantas, sendo delineado da seguinte maneira (Figura 1):

- *Leguminosas potencialmente fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico:*
  - 1º Tratamento: Sem inoculação (tratamento controle);
  - 2º Tratamento: Inoculação com rizóbio;
  - 3º Tratamento: Inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).
- *Leguminosa não-fixadora de N<sub>2</sub> atmosférico (espécie referência):*
  - 1º Tratamento: Sem inoculação (tratamento controle);
  - 2º Tratamento: Inoculação com rizóbio;
  - 3º Tratamento: Inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).

Todas as espécies assim como os três tratamentos receberam diferentes doses de nitrogênio: controle, sem adição do nutriente; 30 mg kg solo<sup>-1</sup>; 60 mg kg solo<sup>-1</sup> e 120 mg kg solo<sup>-1</sup>.



Figura 1 – Visão geral do experimento em estufa aos três meses após a semeadura nos vasos

### 3.1.1 Preparo e Caracterização do Solo

O solo escolhido para o experimento foi o Latossolo Vermelho-Amarelo, pois constitui o agrupamento de solos mais extenso do Estado de São Paulo (OLIVEIRA et al., 1999), e foi coletado a profundidade de 0,4 m a 0,6 m, na Estação Experimental de Itatinga - SP, pertencente à Universidade de São Paulo (USP) sob a administração do Departamento de Ciências Florestais da ESALQ. Esta profundidade foi escolhida devido à baixa fertilidade, principalmente em relação ao N e baixa concentração de matéria orgânica encontrada no horizonte B do solo, que são característicos de ambientes degradados. Ainda no campo este solo foi passado em peneira de malha 2 mm, totalizando 1000 kg de solo coletados para o preenchimento dos 192 vasos com capacidade de 5 kg cada um.

A análise granulométrica e químicas (Tabelas 2, 3 e 4) foram realizadas no Departamento de Solos e Nutrição Mineral de Plantas (ESALQ/USP) de acordo com os procedimentos usados pela Embrapa (1999).

Tabela 2 - Análise granulométrica do solo

Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Classe da Textura
79	1	20	Média arenosa

Metodologia: Método do Densímetro.

Tabela 3 - Características químicas do solo: M.O. (Matéria Orgânica); P (Fósforo total); S (enxofre); K (Potássio); Ca (Cálcio); Mg (Magnésio); H+Al (Alumínio); SB (Soma de Bases),  $\delta^{15}\text{N}$  (composição isotópica do N) e N (N total) e razão C:N

pH	M.O	P	S	K	Ca	Mg	H+Al	SB	V	m	$\delta^{15}\text{N}$	N	C:N
	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>			mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				%	%	‰	g kg <sup>-1</sup>	
3,9	22	2,3	6	0,1	1,6	1	39,3	2,8	6,7	77,7	8,8	0,3	18,2

S = Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 0,01 mol/L (10 mL TFSA / 25mL)

Tabela 4 - Micronutrientes do solo. B (Boro); Cu (Cobre); Fe (Ferro); Mn (manganês); Zn (Zinco)

B	Cu	Fe	Mn	Zn
mg dm <sup>-3</sup>				
0,24	1,3	335,7	0,23	0,13

Método Utilizado: Cu, Fe, Mn, Zn – DTPA – TEA; pH 7,3; B = BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,125% microondas (10 mL TFSA / 20 mL BaCl<sub>2</sub> 0,125%).

O solo utilizado no experimento não foi esterilizado devido a grande quantidade coletada (1 tonelada). Os nutrientes necessários para as plantas se desenvolverem foram corrigidos com a aplicação de fertilizantes (Figura 2 e item 3.1.4), e suas respectivas quantidades necessárias a serem aplicados em cada vaso foram definidas com base nos resultados de análise do solo (Tabela 3 e 4).

Primeiramente os vasos foram preenchidos com 5 kg de solo realizando uma mistura homogênea com os seguintes fertilizantes (Figura 2):

- 1) Calcáreo Dolomítico (PRNT = 104,6%): 8,5 g por vaso, para corrigir a acidez do solo - após dois meses de germinação das plantas o pH do solo encontrava-se em torno de 6.
- 2) Superfosfato Triplo: 200 mg kg solo<sup>-1</sup> de fósforo.

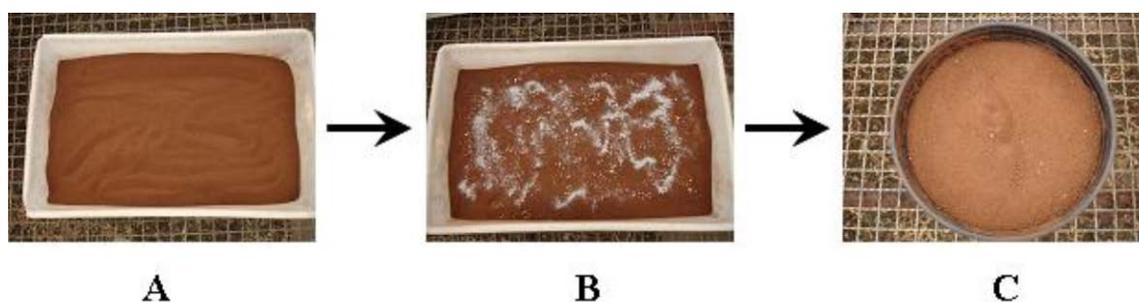


Figura 2 – Esquema de fertilização. A.- Latossolo Vermelho-Amarelo; B – Solo + Calcáreo Dolomítico e Superfosfato Triplo; C – Solo e fertilizantes homogeneizados no vaso (5 kg de solo)

### 3.1.2 Pré-Germinação das Sementes

As sementes de *A. polyphylla* e *E. speciosa* foram obtidas do viveiro BioFlora, localizado em Piracicaba – SP, e as sementes de *M. caesalpinifolia* e *E. contortisiliquum* foram enviadas pela Embrapa Agrobiologia (CNPAB), Seropédica – RJ. Todas as espécies, com exceção da *A. polyphylla*, sofreram quebra de dormência através de escarificação com lixa.

Para o semeio optou-se por colocar as sementes para pré-germinar enroladas em papel filtro úmido em uma câmara germinativa a 25°C no escuro, cerca de 300 sementes por espécie. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Sementes pertencente ao Departamento de Produção Vegetal (ESALQ/USP) (Figura 3).

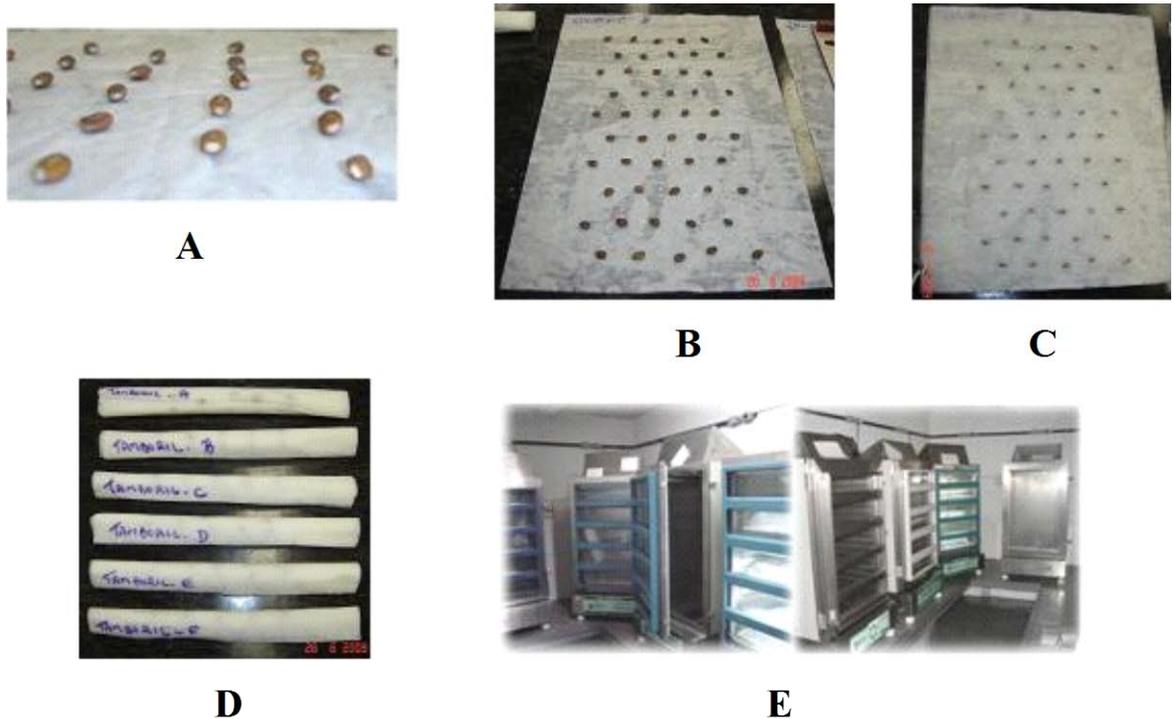


Figura 3 – Etapas da pré-germinação. A – Sementes escarificadas; B – Sementes colocadas sob 2 folhas de papel de germinação; C – 1 folha de papel de germinação sobre as sementes; D – Sementes enroladas no papel filtro; E – Câmara germinativa

### 3.1.3 Semeadura das Espécies e Inoculação

Após a germinação das sementes, quando as radículas tinham de 1 mm a 3 mm de comprimento, foram transplantadas três sementes por vaso, para posterior desbaste, deixando uma única planta por vaso.

No ato do transplante foram aplicados os inoculantes de rizóbio específico para cada espécie florestal (Tabela 5) e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (Tabela 6). Todos os inoculantes foram produzidos e recomendados pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica - RJ. Para os FMAs foram utilizados composto de solo, onde se cultivou capim braquiária (*Brachiaria decumbens*), contendo esporos, fragmentos de hifas e pedaços de raízes colonizadas e armazenados (23°C) por aproximadamente um mês, até serem utilizadas neste estudo.

Tabela 5 – Identificação dos inoculantes de rizóbio para cada espécie de leguminosa arbórea nativa

<b>Espécie</b>	<b>Identificação (Rizóbio)</b>
<i>Acacia polyphylla</i>	Coquetel de inoculantes *
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	BR-4406/BR-4407
<i>Erythrina speciosa</i>	BR-3609/BR-8205
<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	BR-3407/BR-3446

\* Não há inoculante específico para esta espécie, neste caso preparou-se um inoculante misto com diversas estirpes recomendadas para outras espécies de Acacia por isso optou-se por fazer uma mistura de inoculantes das espécies de Acacia já existentes na Embrapa Agrobiologia.

Tabela 6 - Identificação dos fungos micorrízicos arbusculares provenientes da Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da EMBRAPA – Agrobiologia (Seropédica, RJ)

<b>Código</b>	<b>Espécies de FMAs</b>
CNPAB 001	<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall
CNPAB 002	<i>Scutellospora heterogama</i> (Nicol.&Gerd.) Walk.&Sand
CNPAB 005	<i>Glomus clarum</i> Nicol. & Schenk
CNPAB 037	<i>Acaulospora morrowiae</i> Spain & Schenck
CNPAB 038	<i>Scutellospora calospora</i> (Nicol.&Gerd.) Walk.&Sand

Para uniformizar a inoculação de FMAs do experimento foi realizado um inóculo misto de todas as espécies de FMAs e aplicado em todas as sementes do tratamento que constituiu na interação entre rizóbio e FMAs (Prof. Orivaldo José Saggin Junior – comunicação pessoal).

Seguindo-se as recomendações da Embrapa Agrobiologia foram colocados no orifício de plantio, no ato da semeadura de 0,5 g a 1,0 g do inóculo misto dos FMAs por semente. O rizóbio, que estava em forma de turfa, foi diluído em água destilada (50 g de inoculante em 200 mL de água) e inoculado por pipetagem sobre as sementes (4 mL da solução por vaso) (Figura 4).

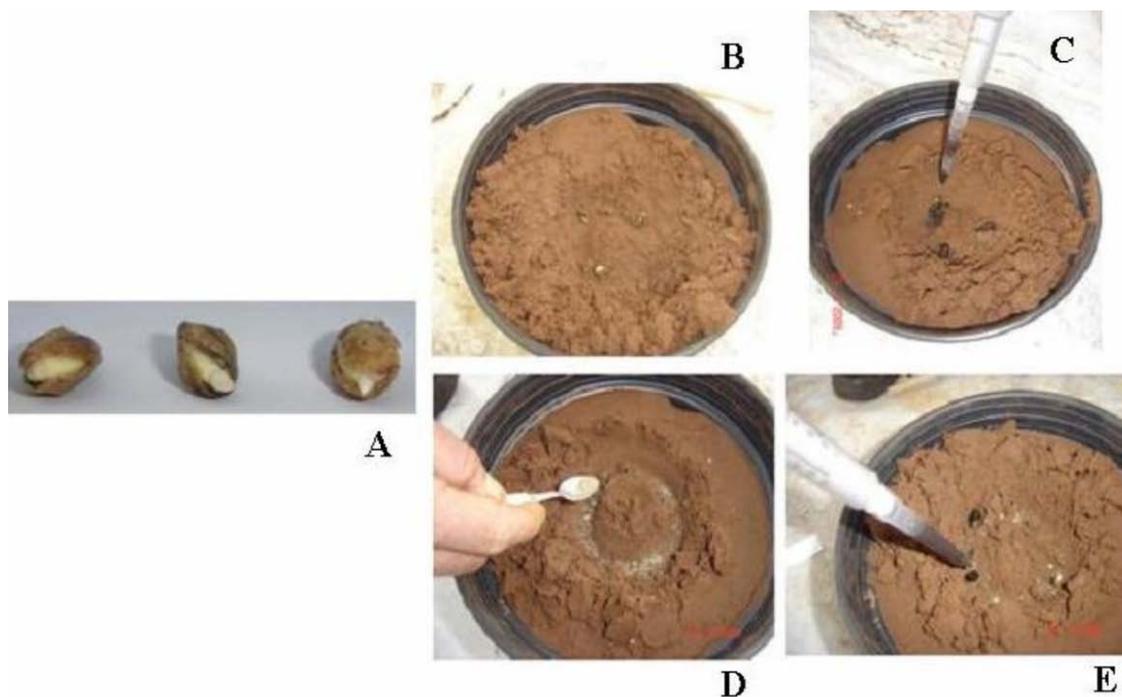


Figura 4 – Transplante das sementes pré-geminadas para o vaso e inoculação. A – emissão das radículas (~3 mm); B – Tratamento Controle (sem inoculação); C – Inoculação de Rizóbio; D – Aplicação de FMAs; E – Inoculação de FMAs + Rizóbio

### 3.1.4 Fertilização

Quando as mudas atingiram cerca 5 cm a 6 cm (20 a 30 dias após a germinação dependendo da espécie) foram desbastadas a fim de deixar uma planta por vaso. Após este processo, foi aplicado potássio na dose de  $50 \text{ mg kg solo}^{-1}$  na forma de cloreto de potássio (KCl), com aplicação de  $10 \text{ mL vaso}^{-1}$  da solução em todos os tratamentos e a adubação com micronutrientes foi realizada com aplicação de  $2 \text{ mL vaso}^{-1}$  de uma solução nutritiva contendo Cu, Mo, Mn, Zn e B. O nitrogênio foi aplicado nos três tratamentos nas doses  $30 \text{ mg N kg solo}^{-1}$ ,  $60 \text{ mg N kg solo}^{-1}$  e  $120 \text{ mg N kg solo}^{-1}$  ( $5 \text{ mL vaso}^{-1}$  da solução) como sulfato de amônio enriquecido a 5% de átomos de  $^{15}\text{N}$  [ $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ] produzido pelo Laboratório de Isótopos Estáveis (CENA/USP). Os vasos foram umedecidos sempre que necessário com água filtrada por osmose reversa para manter a umidade a aproximadamente 70% da capacidade de campo.

### 3.2 Pragas

Após dois meses da germinação das plantas apareceram pragas em algumas espécies do experimento, que foram identificadas pelo Departamento de Entomologia da ESALQ/USP como tripes (inseto raspador-sugador), na parte inferior e superior das folhas, e ácaros (parte inferior da folha).

A espécie mais atingida e danificada pelo tripes e ácaros foi a *M. caesalpinifolia* seguida da *E. speciosa* (Figura 5). A *E. contortisiliquum* e a *A. polyphylla* foram atingidas em menor proporção apenas pelo tripes.

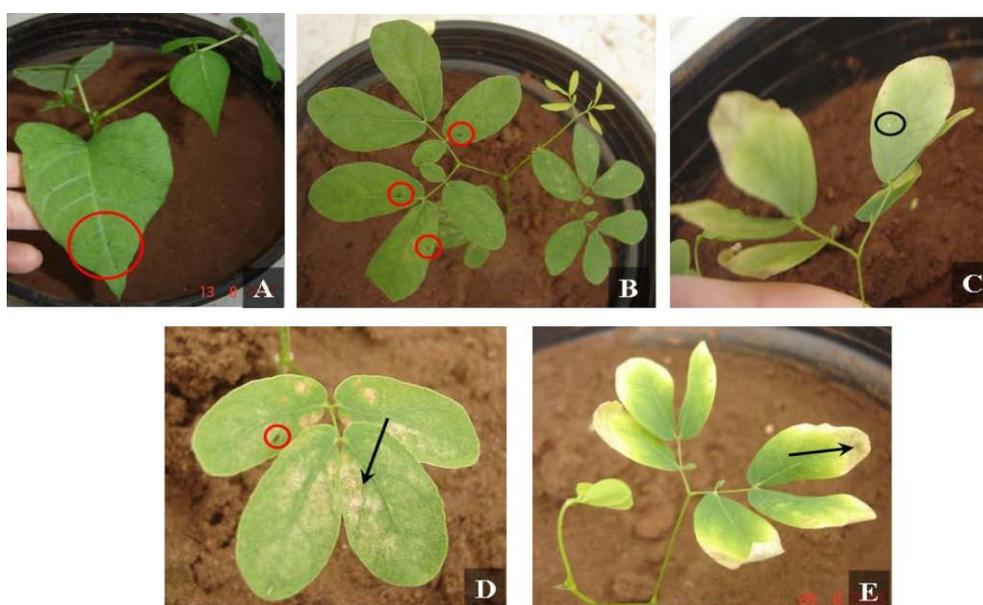


Figura 5 – Aparecimento de pragas (tripes e ácaros) e seus danos às folhas. *E. speciosa* (A) e *M. caesalpinifolia* (B, C, D e E) foram as espécies mais atingidas pelo tripes (círculo vermelho) e ácaros (círculo preto). Setas pretas indicam os danos sofridos pelas plantas

Para controlar e eliminar as pragas, foi aplicado o defensivo agrícola *Vertimec* para os ácaros e *Confidor* para o tripes em todos os indivíduos, assim as pragas foram controladas e eliminadas até o fim do experimento.

### 3.3 Clorose

Com aproximadamente dois meses e meio após a germinação algumas plantas de *E. speciosa* apresentaram sintomas de clorose em suas folhas, independente do tratamento.

O amarelecimento ou clorose das folhas são sintomas comumente verificados e podem ser causados por fatores como toxicidade nutricional, estresse ambiental (temperatura, água),

fatores genéticos, substâncias químicas (herbicidas, pesticidas), poluentes, animais herbívoros (insetos) e patógenos (fungos, bactérias, vírus) (SORREANO, 2006). Estes sintomas podem ser confundidos com sintomas de carência mineral (DELL et al., 1995).

Portanto, vários fatores podem ter favorecido o aparecimento desses sintomas, como a clorose verificada em alguns indivíduos de *E. speciosa*. As folhas mais amareladas (Figuras 6A e 6B) se encontravam presentes na maioria dos vasos, independente do tratamento, onde não foi aplicado o N (sulfato de amônio), podendo atribuir este amarelecimento a falta de N necessário à planta. Outra característica observada nesta mesma espécie, mas em vasos fertilizados com N é o aparecimento de clorose internerval (Figura 6C), parecidas com a deficiência de alguns micronutrientes como o Fe com aparência de um retículo fino, ou seja, as nervuras ficam verde escuras, enquanto o limbo verde-claro das folhas mais novas e/ou deficiência de Mn com aparência de um retículo grosso nas folhas mais novas, muito parecido com a deficiência de Fe (EPSTEIN; BLOOM, 2005; SORREANO, 2006).

Podemos também atribuir estes sintomas visualmente apresentados em consequência dos insetos (tripes) que atacam as plantas, ou até mesmo do defensivo agrícola aplicado para a eliminação e controle destes insetos (ver item 3.2).

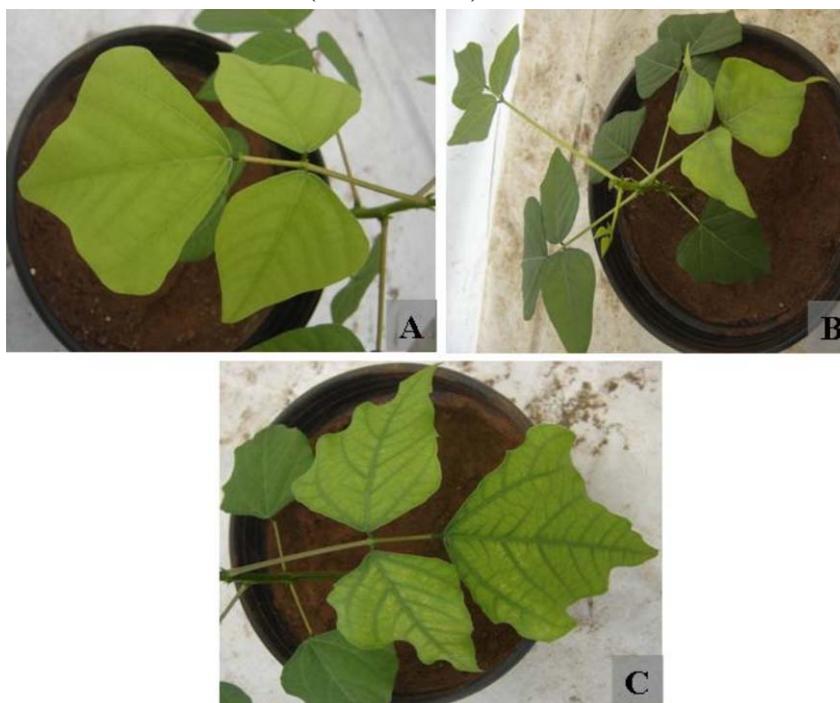


Figura 6 – Clorose verificada nas folhas de alguns indivíduos de *Erythrina speciosa*

Contudo, estes efeitos foram diminuindo e em muitos vasos o amarelecimento desapareceu ao longo do experimento.

### 3.4 Amostragem

Aos três meses (outubro de 2009) foram selecionados dois indivíduos por espécie dentre os diferentes tratamentos e doses de N para análise foliar isotópica (natural e enriquecida) e do conteúdo de nitrogênio. O mesmo procedimento repetiu-se aos cinco meses (dezembro de 2009), no entanto, neste caso foram analisados quatro indivíduos por espécie.

O fim do experimento com o desbaste de todos os indivíduos teve início em janeiro de 2010 (seis meses) e término em março de 2010, nesta última coleta foram separadas as diferentes partes das plantas (parte aérea e raízes) para a quantificação do peso da matéria seca, análise isotópica, concentrações de N, P e dos micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) no material foliar. Para a determinação dos micronutrientes foram realizadas leituras de apenas um indivíduo por espécie representado pelas diferentes doses de N e tratamentos testados (Anexo C). Os nódulos encontrados nas raízes das leguminosas potencialmente fixadoras de N foram separados para análise da atividade da redução do acetileno (ARA), além disso, em alguns vasos as raízes mais finas foram separadas para a avaliação da porcentagem de colonização micorrízica. A coleta de solos nos vasos ocorreu em outubro de 2009 e ao final do experimento (março de 2010).

Durante todo o experimento foi realizado mensalmente medidas de altura e diâmetro de todas as plantas (Anexos A e B).

### 3.5 Análises Químicas e Isotópicas

Para a determinação da composição isotópica do N ( $\delta^{15}\text{N}$  e % átomo de  $^{15}\text{N}$ ) e concentrações foliares de N, P e micronutrientes o material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a 60°C por 48 horas. Após secas as amostras com pouca quantidade de material foram trituradas a fino pó com o auxílio de um almofariz e pistilo e um moinho tipo Willey com malha 40 *mesh* em inox foi utilizado para as amostras em maiores quantidades. Cerca de 10 g de solo coletadas por vaso foram secas a temperatura ambiente e destorroadas em peneira com malha de 2 mm e passadas pelo quarteador de Jones, para a obtenção de sub-amostras homogêneas. Estas, após a retirada de raízes foram finalmente moídas até que todo o material passasse por uma peneira com malha de 0,250 mm e pesadas para análise.

### 3.5.1 Determinações Isotópicas

#### a) Abundância Natural do $^{15}\text{N}$

Para determinação da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) e do N total ( $\text{g kg}^{-1}$ ) coletados ao longo do experimento sem a aplicação do fertilizante enriquecido em  $^{15}\text{N}$  (dose zero de N), sub-amostras de 1 mg a 2 mg do material foliar, e de 35 mg a 40 mg dos solos foram acondicionadas em cápsulas de estanho e introduzidas em um analisador elementar (Carlo Erba modelo 1110; Milão, Itália), para determinação da concentração de N total através da combustão das amostras. O gás proveniente da combustão é carreado em um fluxo de hélio por uma coluna cromatográfica e introduzido diretamente em um espectrômetro de massas para razões isotópicas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan). O padrão “folhas de cana-de-açúcar” e o “solo superficial” foram utilizados como material referência para o material foliar e para as amostras de solo, respectivamente.

A abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  é expressa como desvio por mil (‰) em relação a um padrão internacionalmente reconhecido, por meio da equação (1):

$$\delta^{15}\text{N} = (\text{R}_{\text{amostra}}/\text{R}_{\text{padrão}} - 1) \times 1000 \quad (1)$$

onde R é a razão molar  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  na amostra e no padrão. O padrão para o nitrogênio é o ar atmosférico. O erro analítico aceitável é de  $\pm 0,1\%$  e  $0,5\%$  para N e  $^{15}\text{N}$  respectivamente. Estas análises isotópicas foram realizadas no Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/USP.

A porcentagem de N derivado da atmosfera nas leguminosas é calculado segundo a equação (2) (VOSE et al., 1982):

$$\text{NPPfix} = \left[ 1 - \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{leg fixadora}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{ar}}}{\delta^{15}\text{N}_{\text{leg não fixadora}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{ar}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

onde, NPPfix é o nitrogênio da planta proveniente da fixação (%) e o  $\delta^{15}\text{N}$  do ar é zero.

Analisando-se os resultados de  $\delta^{15}\text{N}$  foliar da coleta realizada aos três meses após a semeadura, notou-se que houve uma contaminação nos vasos que não receberam o fertilizante sulfato de amônio enriquecido em  $^{15}\text{N}$  (dose zero de N) através da volatilização do N dos vasos com as diferentes doses de N ( $30 \text{ mg kg solo}^{-1}$ ,  $60 \text{ mg kg solo}^{-1}$  e  $120 \text{ mg kg solo}^{-1}$ ). A fim de se evitar futuras contaminações, em dezembro de 2009, os vasos com dose zero de N

foram separados e levados a um ambiente mais distante em relação aos vasos contendo fertilizante marcado (Figuras 7 e 8).



Figura 7 – Visão geral do experimento em estufa aos seis meses após a semeadura no vaso (vasos com aplicação do fertilizante sulfato de amônio enriquecido em  $^{15}\text{N}$ )



Figura 8 – Visão geral do experimento em estufa aos seis meses após a semeadura no vaso (vasos sem aplicação do fertilizante sulfato de amônio enriquecido em  $^{15}\text{N}$ )

b) *Marcação do solo com  $^{15}\text{N}$  ou diluição do isótopo de  $^{15}\text{N}$*

Para determinação da abundância de  $^{15}\text{N}$  (% em átomos) e do N total ( $\text{g kg}^{-1}$ ) coletados ao longo do experimento com a aplicação do fertilizante enriquecido em  $^{15}\text{N}$  em diferentes doses, sub-amostras de 1 mg a 2 mg do material foliar e das raízes, e de 35 mg a 40 mg dos solos foram acondicionadas em cápsulas de estanho e introduzidas em um analisador elementar (NA 1500, Carlo Erba, Itália) para determinação da concentração de N total e em um espectrômetro de massas para razões isotópicas (Finnigam MAT). O padrão “IAEA - 311 (sulfato de amônio da Agência Internacional de Energia Atômica)” foi utilizado como material referência para o material orgânico. A precisão analítica é de 0,001 % em átomos de  $^{15}\text{N}$ . Estas análises foram realizadas no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP.

A contribuição da fixação biológica do N nas espécies estudadas foi calculada segundo Fried e Middleboe (1977) aplicando uma mesma dose de N e mesma marcação com  $^{15}\text{N}$  às plantas fixadoras (leguminosas) e controle (leguminosa não-fixadora). Em experimentos usando o método de Fried e Middleboe (1977) sugere-se que a forma amônio (sulfato de amônio -  $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) é preferida ao nitrato, porque a maioria do traçador é prontamente incorporada ao ciclo do N no solo.

As avaliações obedeceram à seguinte sequência de cálculos, baseadas nos estudos de Fried e Middleboe (1977), Trivelin (2000) e Brito et al. (2009):

- a) Quantidade de N total acumulada (QNT,  $\text{g planta}^{-1}$ ), equação (3):

$$QNT = \frac{RMS \times N}{1000} \quad (3)$$

em que RMS = rendimento da matéria seca ( $\text{g planta}^{-1}$ ); e N = teor de N na planta ( $\text{g kg}^{-1}$ )

- b) Porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante (NPPF, %), equação (4):

$$\%NPPF = \frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso na planta}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso no fertilizante}} \times 100 \quad (4)$$

em que a % átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso é definido como o percentual de átomos de  $^{15}\text{N}$  na amostra subtraindo-se a abundância de  $^{15}\text{N}$  (0,366% em átomos)

- c) Porcentagem de N na planta proveniente da fixação simbiótica nas leguminosas fixadoras de N, usando como o controle a leguminosa não fixadora de N (NPPfix, %), equação (5):

$$NPPfix = \left[ 1 - \frac{(\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso})_{leg \text{ fixadora}}}{(\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N em excesso})_{leg \text{ não fixadora}}} \right] \times 100 \quad (5)$$

Como houve uma grande variação nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e % em átomos de  $^{15}\text{N}$  no material foliar das leguminosas fixadoras e principalmente da espécie referência (leguminosa não-fixadora) (Anexos E e F), optou-se por retirar dos cálculos de %NPPfix os menores valores de  $\delta^{15}\text{N}$  % e de átomos de  $^{15}\text{N}$  da espécie referência (*A. polyphylla*).

Possíveis causas destes baixos valores podem ser devido à vários fatores. Dentre eles, ao fato de a planta referência ter valores menores de % de átomos de  $^{15}\text{N}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  que ao da planta potencialmente fixadora de  $\text{N}_2$ , como por exemplo, é necessário que a referência explore um volume de solo semelhante ao da planta nodulada e que apresente uma absorção de N do solo semelhante à planta fixadora, o que não deve ter ocorrido neste experimento, pois o volume das raízes da espécie referência era menor em relação às fixadoras. Outro detalhe observado foi à ocorrência de “musgos” na superfície do solo dos vasos em alguns indivíduos de todas as espécies, em decorrência do tempo mais úmido, que poderia ser um meio de fixação para a espécie referência (que comprovadamente não nodula), ou através da fixação assimbiótica por microrganismos de vida livre no solo. De qualquer forma, não temos uma explicação concreta a fazer sobre o fato de encontrarmos valores de referência menores que os valores para as plantas que estariam ou não fixando  $\text{N}_2$  da atmosfera. Talvez a escolha de mais uma espécie referência poderia ter ajudado a minimizar estes possíveis erros.

d) Porcentagem de N na planta proveniente do solo (NPPS, %), equação (6):

$$\% \text{ NPPS} = 100 - \% \text{ NPPF} - \% \text{ NPPfix} \quad (6)$$

### 3.5.2 Determinação de Fósforo e Micronutrientes

A determinação de P total no material foliar previamente preparado foi realizada após uma digestão com ácido nítrico e ácido perclórico (proporção 5:1) (JOHNSON; ULRICH, 1959), utilizando 0,5 g de amostra e 6 mL da mistura dos ácidos. Após a digestão, o digerido foi diluído em 50 mL de água deionizada. A concentração de P foi determinada por espectrofotometria utilizando o reativo metavanadato de amônio combinado com molibdato de amônio (JACKSON, 1964; LOTT et al., 1956). Os micronutrientes (Fe, Cu, Zn e Mn) no

material foliar foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Varian Modelo AA 140), usando o mesmo extrato (de digestão) segundo Miyazawa et al. (1999). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Fertilidade do Solo (CENA/USP).

### **3.6 Atividade de Redução do Acetileno**

Para confirmar a atividade do nódulo e determinar a ocorrência ou não da fixação de N mediou-se a atividade da nitrogenase através da atividade de redução de acetileno (ARA) (HARDY et al., 1968). Apesar de ser um método indireto, é usado para determinação da fixação de  $N_2$ , pois a enzima nitrogenase reduz outras substâncias além do  $N_2$ , como é o caso da redução do acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ), característica de todos os organismos fixadores de  $N_2$ .

A coleta de nódulos radiculares e atividade da enzima nitrogenase através da ARA se deram ao final do experimento durante os meses de janeiro, fevereiro e março de 2010. As raízes noduladas das espécies fixadoras de N foram incubadas por uma hora em frascos de 200 mL selados onde foi adicionado acetileno na porção de 10% do volume do frasco (Figura 9) (MCNABB; GEIST, 1979). Após a incubação foi retirado 20 mL da amostra de gás de cada frasco através de uma seringa e acondicionado em recipientes vedados. Posteriormente, 1 mL do conteúdo gasoso destes recipientes foi retirado com uma seringa (modelo Gastight, marca Hamilton) e injetado em um cromatógrafo a gás (Thermoffinigan, modelo Trace GC 2000) usando-se um detector de ionização de chama onde foi realizada a leitura do etileno formado pela redução do acetileno (HARDY et al., 1968). A presença do etileno indica que os nódulos estavam fixando nitrogênio e a taxa de redução de acetileno foi calculada em micromoles ( $\mu$ moles) de  $C_2H_4$  produzidos por grama de nódulo seco por hora de incubação. A realização da análise por cromatografia gasosa foi realizada no Laboratório de Pós-Colheita do Departamento de Produção Vegetal da ESALQ/USP.



Figura 9 – Atividade da redução do acetileno. Coleta dos nódulos nos vasos (a); separação dos nódulos (b); incubação (c) com gás acetileno (d) e (e)

### 3.7 Determinação de Micorrizas Arbusculares

As raízes finas coletadas dos vasos foram lavadas em água corrente e preservadas em álcool 70% até a análise. Cerca de 1 g destas raízes foram separadas e mergulhadas em solução de KOH 10% durante 24 horas e aquecidas em banho-maria (90°C) por uma hora. Em seguida foram imersas em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 volumes e finalmente coradas com tinta de caneta preta durante 2 minutos em banho-maria e preservadas em uma solução de glicerol (VIERHEILIG et al., 1998). Em cada lâmina foram montados 10 fragmentos de raízes com glicerol (Figura 10).

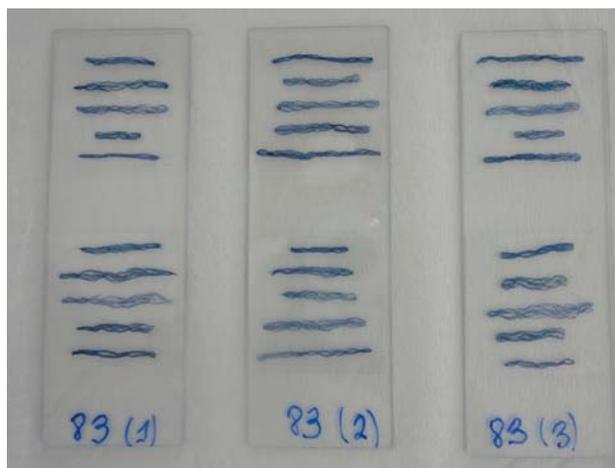


Figura 10 – Lâminas com as raízes para a contagem de colonização micorrízica em microscópio

Avaliação da taxa de colonização micorrízica se deu a partir do método de Giovanethi e Mosse (1980), usando um microscópio binocular com aumento de 100 vezes. Cada fragmento de raiz foi observado em todo seu comprimento e registrados onde havia presença ou ausência de qualquer estrutura da micorriza arbuscular (hifas, arbúsculos, vesículas, esporos, células auxiliares, esporocarpos) como positivo (Figura 11). Estas análises foram realizadas do Laboratório de Microbiologia do Solo no Departamento de Ciência do Solo (ESALQ/USP).

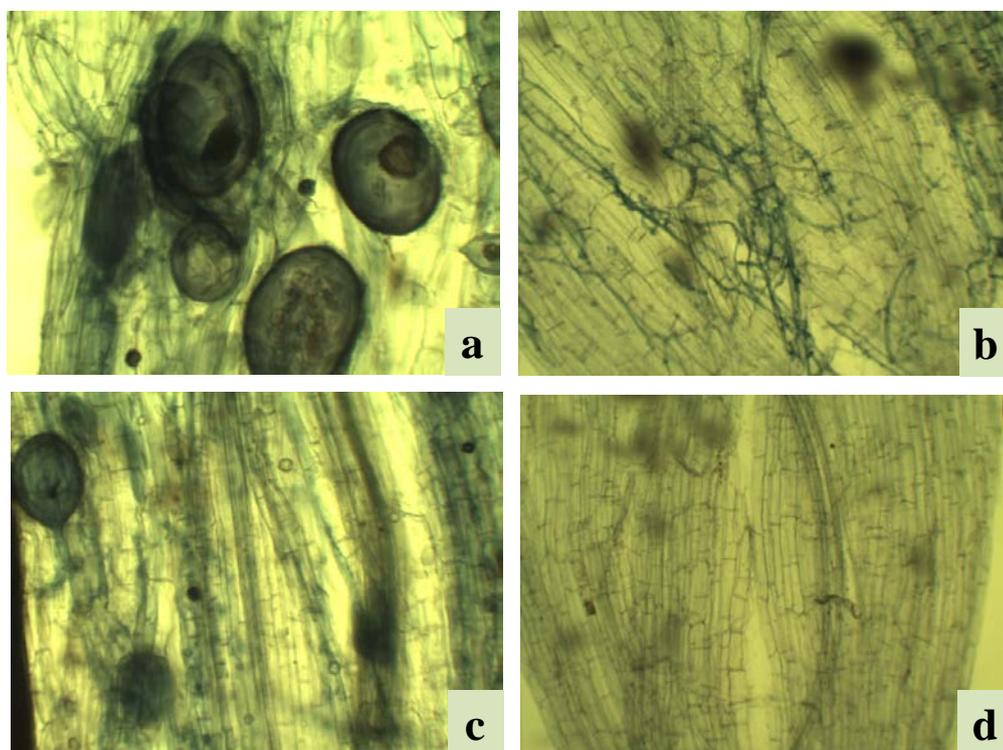


Figura 11- Estruturas da micorriza arbuscular presente nas raízes das leguminosas: a – esporos; b – hifas; c – vesículas e hifas; d – raiz sem colonização de fungos micorrízicos arbusculares (aumento 10x). Foto: Denise de L. C. Mescolotti

### 3.8 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) fatorial. As variáveis que não apresentaram erros normais e variâncias homogêneas entre os fatores foram adequadamente transformadas para que os pressupostos da ANOVA fossem atendidos. O teste Tukey foi posteriormente aplicado para explicar qualquer diferença significativa apresentada pela ANOVA entre e dentre os fatores analisados, i.e. entre as mesmas doses de N nos três diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento, para cada espécie. Este tipo de análise também permitiu avaliar possíveis diferenças entre a espécie referência e as leguminosas fixadoras de  $N_2$ . Entretanto, para a porcentagem de colonização micorrízica foi analisado apenas variações dentro do tratamento Rizóbio + FMAs, pois para os demais tratamentos não foram coletados repetições suficiente para análise comparativa.

As análises foram feitas usando o pacote estatístico STATISTICA versão 9.0 (STATSOFT, Inc. 2010). Diferenças a 5% de probabilidade foram tidas como significantes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Composição Isotópica e Concentração de N no Solo

A concentração de N no solo foi em média de 0,27 g kg<sup>-1</sup> e 0,34 g kg<sup>-1</sup> aos três e oito meses após o plantio das espécies em casa de vegetação, respectivamente, com variação de 0,2 g kg<sup>-1</sup> a 0,4 g kg<sup>-1</sup> aos três meses e 0,3 g kg<sup>-1</sup> a 0,4 g kg<sup>-1</sup> no último mês de experimento, independentemente das doses de N e tratamentos aplicados.

A análise estatística não foi realizada nos resultados de concentrações de N do solo citados acima e na % em átomos de <sup>15</sup>N e δ<sup>15</sup>N devido ao baixo número de repetições nos meses de coleta (Tabela 7).

Tabela 7 – Média da abundância de <sup>15</sup>N (% em átomos de <sup>15</sup>N) e a abundância natural de <sup>15</sup>N (δ<sup>15</sup>N) no solo, de acordo com as espécies e doses de N testadas aos três e oito meses após plantio em casa de vegetação

Espécies	Doses de N	Tratamentos	3 meses*		8 meses**	
			átomos de <sup>15</sup> N (%)	δ <sup>15</sup> N (‰)	átomos de <sup>15</sup> N (%)	δ <sup>15</sup> N (‰)
<i>A. polyphylla</i>	0	Controle		14,5		11,0
	30	(Sem inoculação)	0,5		0,9	
	60		0,9		0,6	
	120		1,7		0,6	
	0		Rizóbio		13,4	
	30	Rizóbio + FMAs	0,8		0,5	
	60		0,9		0,6	
	120		1,1		0,7	
	0				16,6	
	30		0,8			
	60		0,8		0,5	
	120		1,2		0,6	
<i>E. contortisiliquum</i>	0	Controle		15,2		16,2
	30	(Sem inoculação)	0,6			
	60		0,7		0,5	
	120		1,0		0,9	
	0		Rizóbio		13,8	
	30	Rizóbio	0,7		0,5	
	60		0,6			

continua

continuação

Espécies	Doses de N	Tratamentos	3 meses*		8 meses**	
			átomos de $^{15}\text{N}$ (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	átomos de $^{15}\text{N}$ (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<i>E. contortisiliquum</i>	120		1,2		0,6	
	0	Rizóbio + FMAs		12,8		10,4
	30		0,7		0,4	
	60		0,8		0,5	
	120		0,7		0,7	
<i>E. speciosa</i>	0	Controle		17,3		10,0
	30	(Sem inoculação)	0,6			
	60		0,7			
	120		0,8			
	0	Rizóbio		29,9		13,6
	30		0,6		3,0	
	60		0,6		0,6	
	120		0,9		0,7	
	0	Rizóbio + FMAs		29,5		9,4
	30		0,6			
	60		0,7			
	120		0,7			
<i>M. caesalpiniifolia</i>	0	Controle		13,6		10,1
	30	(Sem inoculação)	0,8		0,4	
	60		0,9		0,6	
	120		1,1		0,7	
	0	Rizóbio		12,8		13,6
	30		0,7		0,5	
	60		0,6		0,4	
	120		0,8		0,7	
	0	Rizóbio + FMAs		14,9		
	30		0,8		0,6	
	60		0,7		0,6	
	120		0,9		0,8	

\*n = 2; \*\*n = 1

## 4.2 Características Nutricionais das Espécies

Dos 192 indivíduos semeados inicialmente foram observadas algumas perdas ao longo do experimento. De um total de 48 indivíduos de *Acacia polyphylla* (espécie referência), 46 indivíduos sobreviveram até o final do experimento. Em relação às leguminosas fixadoras de nitrogênio ocorreu a perda de um indivíduo de *Mimosa caesalpinifolia* e em cinco indivíduos não houve a formação de nódulos, sendo elas: um indivíduo de *Erythrina speciosa* (dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup>; tratamento: Rizóbio + FMAs); dois indivíduos de *Erythrina speciosa* (dose 120 mg N kg solo<sup>-1</sup>; tratamento: Sem inoculação), um indivíduo de *Enterolobium contortisiliquum* (dose 30 mg N kg solo<sup>-1</sup>; tratamento: Rizóbio) e um indivíduo de *Enterolobium contortisiliquum* (sem aplicação de N; tratamento: Rizóbio).

As variáveis P total e razão N:P no material foliar, massa seca das raízes (MSR), quantidade de nitrogênio total nas plantas (QNT), foram transformadas por não apresentarem normalidade ou homogeneidade de variâncias.

### 4.2.1 *Acacia polyphylla* (espécie referência)

A concentração de N foliar variou de 24,1 g kg<sup>-1</sup> a 44,7 g kg<sup>-1</sup> e as mesmas doses de N comparadas entre os três diferentes tratamentos não variaram, assim como também não variaram entre as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

Já a concentração de P foliar variou de 0,8 g kg<sup>-1</sup> a 1,6 g kg<sup>-1</sup> e também não houve diferença significativa comparando as mesmas doses de N entre os três diferentes tratamentos, e as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

Em relação à razão foliar N:P seus valores médios indicaram uma limitação por N ( $N:P > 16$ ) em todas as doses de N nos três tratamentos testados (Tabela 8) e diferenças significativas não foram encontradas comparando as mesmas doses de N entre os três diferentes tratamentos e as doses crescentes de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

Tabela 8 – Média foliar (média  $\pm$  1 desvio padrão) das concentrações de nitrogênio (N total), fósforo (P total) e razão N:P aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *A. polyphylla* (n= 4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	N (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	ln P	N:P	ln N:P
Controle (Sem inoculação)	0	30,2 $\pm$ 9,4 <sup>aA</sup>	1,3 $\pm$ 0,1	0,3 <sup>aA</sup>	21,7 $\pm$ 6,0	3,0 <sup>aA</sup>
	30	24,7 $\pm$ 12,5 <sup>aA</sup>	0,8 $\pm$ 0,1	-0,2 <sup>aA</sup>	19,9 $\pm$ 0,6	3,0 <sup>aA</sup>
	60	40,1 $\pm$ 2,6 <sup>aA</sup>	1,6 $\pm$ 0,4	0,4 <sup>aA</sup>	27,2 $\pm$ 10,0	3,3 <sup>aA</sup>
	120	35,8 $\pm$ 7,3 <sup>aA</sup>	1,3 $\pm$ 0,1	0,2 <sup>aA</sup>	28,3 $\pm$ 5,9	3,3 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	26,7 $\pm$ 9,8 <sup>aA</sup>	1,0 $\pm$ 0,4	-0,03 <sup>aA</sup>	33,2 $\pm$ 24,7	3,3 <sup>aA</sup>
	30*	37,2 $\pm$ 1,8 <sup>aA</sup>	1,1 $\pm$ 0,2	0,1 <sup>aA</sup>	34,7 $\pm$ 4,4	3,5 <sup>aA</sup>
	60	40,0 $\pm$ 8,9 <sup>aA</sup>	1,4 $\pm$ 0,4	0,3 <sup>aA</sup>	27,3 $\pm$ 7,9	3,3 <sup>aA</sup>
	120	44,7 $\pm$ 8,2 <sup>aA</sup>	1,2 $\pm$ 0,1	0,2 <sup>aA</sup>	36,1 $\pm$ 5,8	3,6 <sup>aA</sup>
Rizóbio +FMAs	0*	24,1 $\pm$ 7,2 <sup>aA</sup>	1,4 $\pm$ 0,2	0,3 <sup>aA</sup>	18,2 $\pm$ 7,1	2,8 <sup>aA</sup>
	30	32,1 $\pm$ 17,5 <sup>aA</sup>	1,0 $\pm$ 0,3	-0,1 <sup>aA</sup>	31,2 $\pm$ 8,9	3,4 <sup>aA</sup>
	60	34,3 $\pm$ 16,7 <sup>aA</sup>	1,3 $\pm$ 0,5	0,2 <sup>aA</sup>	24,6 $\pm$ 3,8	3,2 <sup>aA</sup>
	120	35,9 $\pm$ 11,0 <sup>aA</sup>	1,2 $\pm$ 0,1	0,1 <sup>aA</sup>	30,7 $\pm$ 7,0	3,4 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

\*n = 3

A massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca das raízes (MSR) dos indivíduos de *A. polyphylla* não variou quando se compara doses iguais de N nos três diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 9).

Em todos os tratamentos, as plantas que receberam a maior dose de N (120 mg N kg solo<sup>-1</sup>) tiveram uma maior massa seca na parte aérea e nas raízes, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores médios da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) inoculadas com rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e o controle (sem inoculação) aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *A. polyphylla* (n=4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MSPA (g)	MSR (g)	ln MSR
Controle (Sem inoculação)	0	1,8 <sup>aA</sup>	1,4	0,1 <sup>aA</sup>
	30	6,6 <sup>aA</sup>	3,6	1,0 <sup>aA</sup>
	60	9,2 <sup>aA</sup>	1,6	0,4 <sup>aA</sup>
	120	27,0 <sup>aA</sup>	4,0	1,3 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	2,3 <sup>aA</sup>	2,1	0,4 <sup>aA</sup>
	30*	3,2 <sup>aA</sup>	1,6	0,4 <sup>aA</sup>
	60	8,1 <sup>aA</sup>	1,7	0,3 <sup>aA</sup>
	120	15,0 <sup>aA</sup>	2,5	0,7 <sup>aA</sup>
Rizóbio +FMAs	0*	2,8 <sup>aA</sup>	2,3	0,6 <sup>aA</sup>
	30	8,1 <sup>aA</sup>	3,3	0,8 <sup>aA</sup>
	60	12,2 <sup>aA</sup>	3,1	0,6 <sup>aA</sup>
	120	28,3 <sup>aA</sup>	4,6	1,5 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

\*n = 3

A quantidade de N total acumulada nos indivíduos de *A. polyphylla* aos seis meses após o plantio não variou quando comparada as mesmas doses de N aplicadas nos três diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ), porém houve diferença entre as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ) (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores médios da quantidade de nitrogênio total acumulada na planta (QNT, g planta<sup>-1</sup>) nos tratamentos controle (sem inoculação), rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares nas diferentes doses de N após seis meses do plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *A. polyphylla* (n=4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	QNT (g planta <sup>-1</sup> )	QNT transformado
Controle (Sem inoculação)	0	0,05	0,4 <sup>aA</sup>
	30	0,1	0,5 <sup>abA</sup>
	60	0,4	0,8 <sup>abA</sup>
	120	0,9	1,0 <sup>bA</sup>
Rizóbio	0	0,05	0,4 <sup>aA</sup>
	30*	0,1	0,6 <sup>abA</sup>
	60	0,3	0,7 <sup>abA</sup>
	120	0,6	0,8 <sup>bA</sup>
Rizóbio + FMAs	0*	0,1	0,5 <sup>aA</sup>
	30	0,2	0,6 <sup>aA</sup>
	60	0,3	0,7 <sup>abA</sup>
	120	0,9	1,0 <sup>bA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

\*n = 3

Nos tratamentos com rizóbio e controle houveram perdas e/ou amostras de raízes insuficientes desta espécie para a contagem de colonização, por isso não há como ter uma estimativa precisa da colonização radicular para se comparar com o tratamento duplamente inoculado, mas há indícios de que havia presença de fungos nativos do solo nos vasos que compunham os tratamentos sem inoculação com fungos (Tabela 11).

Em todos os indivíduos analisados a colonização micorrízica variou de 0% a 15%. Contudo, devido ao número reduzido de repetições para os tratamentos sem aplicação das espécies de fungos (controle e rizóbio), o teste estatístico foi realizado apenas no tratamento duplamente inoculado, não sendo encontrada variação entre as doses de N dentro deste mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 11).

Tabela 11 – Colonização micorrízica (%) (média  $\pm$  1 desvio padrão) nas raízes dos indivíduos de *A. polyphylla* sob diferentes tratamentos e doses de N aos seis meses após plantio em casa de vegetação (n = 4: tratamento Rizóbio + FMAs; n = 2: tratamento Controle e n = 1: tratamento Rizóbio)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	Colonização micorrízica (%)
Controle (Sem inoculação)	0	7
	30	5
	60	-**
	120	4
Rizóbio	0	-**
	30	0
	60	-**
	120	3
Rizóbio + FMAs	0*	5 <sup>a</sup>
	30	15 <sup>a</sup>
	60	5 <sup>a</sup>
	120	4 <sup>a</sup>

Médias seguidas de letras iguais na coluna no tratamento Rizóbio + FMAs, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\*n = 3; \*\*Amostras perdidas e/ou raízes insuficientes para contagem de colonização.

Os indivíduos de *A. polyphylla* acessaram aos três meses de idade duas fontes de nitrogênio para seu crescimento, aquele proveniente do fertilizante (NPPF) e aquele proveniente do solo (NPPS) (Tabela 12).

Aos cinco meses após o plantio em casa de vegetação, a %NPPF foi maior que a %NPPS (Tabela 12). Já no último mês do experimento a %NPPS foi maior que a %NPPF.

Tabela 12 – Valores médios do nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (%NPPF) e do solo (%NPPS) aos três, cinco e seis meses após plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *A. polyphylla*

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 meses	5 meses	6 meses	3 meses	5 meses	6 meses
		%NPPF			%NPPS		
Controle (Sem inoculação)	0	-	-	-	100	100	100
	30	31	45	43	69	55	57
	60	56	65	32	44	35	68
	120	46	76	45	54	24	55
Rizóbio	0	-	-	-	100	100	100
	30	26	43	30	74	57	70
	60	58	62	36	42	38	64
	120	50	67	28	50	33	72
Rizóbio +FMAs	0	-	-	-	100	100	100
	30	40	50	50	60	50	50
	60	61	66	62	39	34	38
	120	57	73	49	43	27	51

#### 4.2.2 *Enterolobium contortisiliquum*

A concentração de N foliar variou de 21,1 g kg<sup>-1</sup> a 43,0 g kg<sup>-1</sup> e as mesmas doses de N comparadas entre os três diferentes tratamentos não variaram, assim como também não variaram entre as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 13).

Já a concentração de P foliar variou de 1,5 g kg<sup>-1</sup> a 3,2 g kg<sup>-1</sup> e também não houve diferença significativa comparando as mesmas doses de N entre os três diferentes tratamentos, e as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 13).

Em relação à razão foliar N:P seus valores médios indicaram maior limitação de P (N:P<16) nas doses 30 mg N kg solo<sup>-1</sup> e 120 mg N kg solo<sup>-1</sup> do tratamento controle e Rizóbio + FMAs e nas doses 30 mg N kg solo<sup>-1</sup>, 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> e 120 mg N kg solo<sup>-1</sup> do tratamento com rizóbio. No tratamento duplamente inoculado (Rizóbio + FMAs) as crescentes doses de N mostraram diferença entre a dose 30 mg N kg solo<sup>-1</sup> em relação à dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> ( $p = 0,02$ ). Mas, não houve variação comparando doses iguais de N entre os diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 13).

Tabela 13 – Média foliar (média  $\pm$  1 desvio padrão) das concentrações de nitrogênio (N total), fósforo (P total) e razão N:P aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. contortisiliquum* (n= 4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	N total (g kg <sup>-1</sup> )	P total (g kg <sup>-1</sup> )	ln P	N:P	ln N:P
Controle (Sem inoculação)	0	29,7 $\pm$ 9,5 <sup>aA</sup>	2,1 $\pm$ 0,6	0,7 <sup>aA</sup>	15,6 $\pm$ 7,4	2,6 <sup>aA</sup>
	30	32,5 $\pm$ 10,3 <sup>aA</sup>	3,0 $\pm$ 0,2	1,1 <sup>aA</sup>	10,8 $\pm$ 2,7	2,3 <sup>aA</sup>
	60	32,8 $\pm$ 8,5 <sup>aA</sup>	2,4 $\pm$ 0,5	0,9 <sup>aA</sup>	14,1 $\pm$ 5,0	2,6 <sup>aA</sup>
	120	27,2 $\pm$ 7,9 <sup>aA</sup>	2,8 $\pm$ 1,4	0,9 <sup>aA</sup>	10,7 $\pm$ 2,6	2,3 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	31,3 $\pm$ 8,5 <sup>aA</sup>	1,9 $\pm$ 0,5	0,6 <sup>aA</sup>	17,9 $\pm$ 7,9	2,8 <sup>aA</sup>
	30	32,2 $\pm$ 13,3 <sup>aA</sup>	2,6 $\pm$ 0,6	0,9 <sup>aA</sup>	13,9 $\pm$ 9,4	2,5 <sup>aA</sup>
	60	21,1 $\pm$ 4,6 <sup>aA</sup>	2,0 $\pm$ 0,9	0,6 <sup>aA</sup>	12,1 $\pm$ 5,0	2,4 <sup>aA</sup>
	120	28,2 $\pm$ 3,6 <sup>aA</sup>	2,5 $\pm$ 0,7	0,9 <sup>aA</sup>	10,2 $\pm$ 1,3	2,3 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	36,7 $\pm$ 4,3 <sup>aA</sup>	1,9 $\pm$ 0,3	0,6 <sup>aA</sup>	19,7 $\pm$ 1,9	3,0 <sup>abA</sup>
	30	24,2 $\pm$ 13,0 <sup>aA</sup>	3,2 $\pm$ 1,1	1,1 <sup>aA</sup>	8,7 $\pm$ 6,9	2,0 <sup>aA</sup>
	60	43,0 $\pm$ 3,0 <sup>aA</sup>	1,5 $\pm$ 0,5	0,4 <sup>aA</sup>	32,1 $\pm$ 15,7	3,4 <sup>bA</sup>
	120	21,5 $\pm$ 2,3 <sup>aA</sup>	2,7 $\pm$ 1,0	0,9 <sup>aA</sup>	10,0 $\pm$ 6,6	2,2 <sup>abA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

A massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca das raízes (MSR) dos indivíduos de *E. contortisiliquum* não variou quando se compara doses iguais de N nos três diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

Em todos os tratamentos, as plantas que receberam a maior dose de N (120 mg N kg solo<sup>-1</sup>) tiveram uma maior massa seca na parte aérea e nas raízes, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 14)

Tabela 14 – Valores médios da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) inoculadas com rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e o controle (sem inoculação) aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. contortisiliquum* (n=4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MSPA (g)	MSR (g)	ln MSR
Controle (Sem inoculação)	0	10,3 <sup>aA</sup>	5,3	1,5 <sup>aA</sup>
	30	8,2 <sup>aA</sup>	5,3	1,6 <sup>aA</sup>
	60	15,1 <sup>aA</sup>	12,1	2,5 <sup>aA</sup>
	120	26,2 <sup>aA</sup>	16,1	2,8 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	14,2 <sup>aA</sup>	7,3	1,6 <sup>aA</sup>
	30	13,6 <sup>aA</sup>	5,4	1,4 <sup>aA</sup>
	60	18,7 <sup>aA</sup>	7,5	1,7 <sup>aA</sup>
	120	21,7 <sup>aA</sup>	13,1	2,6 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	26,9 <sup>aA</sup>	10,3	2,2 <sup>aA</sup>
	30	8,5 <sup>aA</sup>	4,2	1,4 <sup>aA</sup>
	60	30,3 <sup>aA</sup>	13,5	2,6 <sup>aA</sup>
	120	31,9 <sup>aA</sup>	20,1	3,0 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

A quantidade de N total acumulada nos indivíduos de *E. contortisiliquum* aos seis meses após o plantio não variou quando comparadas as mesmas doses de N aplicadas nos três diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ). Porém quando comparadas as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento, a dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> do tratamento Rizóbio + FMAs foi maior em relação a dose 30 mg N kg solo<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ) (Tabela 15).

Tabela 15 – Valores médios da quantidade de nitrogênio total acumulada na planta (QNT, g planta<sup>-1</sup>) nos tratamentos controle (sem inoculação), rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares nas diferentes doses de N após seis meses do plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. contortisiliquum* (n=4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	QNT (g planta <sup>-1</sup> )	QNT transformado
Controle (Sem inoculação)	0	0,3	0,7 <sup>aA</sup>
	30	0,2	0,7 <sup>aA</sup>
	60	0,5	0,8 <sup>aA</sup>
	120	0,6	0,9 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	0,6	0,9 <sup>aA</sup>
	30	0,5	0,8 <sup>aA</sup>
	60	0,4	0,8 <sup>aA</sup>
	120	0,6	0,9 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	0,8	0,8 <sup>abA</sup>
	30	0,2	0,6 <sup>aA</sup>
	60	1,3	1,1 <sup>bA</sup>
	120	0,7	0,9 <sup>abA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

No tratamento controle e no inoculado apenas com rizóbio foram observadas a presença de colonização micorrízica, sugerindo à presença de fungos nativos do solo nos vasos que compunham os tratamentos os quais não foram aplicadas as espécies de fungos (Tabela 16). Em todos os indivíduos analisados a colonização micorrízica variou de 0% a 23%, mas devido ao número reduzido de repetições para os tratamentos sem aplicação das espécies de fungos (controle e rizóbio), o teste estatístico foi realizado apenas no tratamento duplamente inoculado, não sendo encontrada variação entre as doses de N dentro deste mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 16).

A nodulação por bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico nos indivíduos de *E. contortisiliquum* foi encontrada em todos os tratamentos (Tabela 16). Possivelmente devido à não esterilização do solo, bactérias nativas colonizaram as raízes destes indivíduos. Provavelmente, este fato deve ter contribuído para que não houvessem diferenças significativas quando comparadas doses iguais de N entre os diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

Tabela 16 – Colonização micorrízica (%) e massa da matéria seca de nódulos (MMSNod) (média  $\pm$  1 desvio padrão) nas raízes dos indivíduos de *E. contortisiliquum* sob diferentes tratamentos e doses de N aos seis meses após plantio em casa de vegetação (n = 4: tratamento Rizóbio + FMAs e n = 2: tratamentos Rizóbio e Controle)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MMSNod (g planta <sup>-1</sup> )	Colonização micorrízica (%)
Controle (Sem inoculação)	0	0,5 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	1 *
	30	0,2 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	23
	60	0,9 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	7
	120	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	8 *
Rizóbio	0	1,2 $\pm$ 1,0 <sup>aA</sup>	0,5 *
	30	0,9 $\pm$ 1,1 <sup>aA</sup>	6
	60	0,3 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	8
	120	0,4 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	7
Rizóbio + FMAs	0	1,3 $\pm$ 0,8 <sup>aA</sup>	9 <sup>a</sup>
	30	0,1 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	17 <sup>a</sup>
	60	1,3 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	0,3 <sup>a</sup>
	120	0,7 $\pm$ 1,0 <sup>aA</sup>	7 <sup>a</sup>

MMSNod: Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

Colonização Micorrízica: Médias seguidas de letras iguais na coluna no tratamento Rizóbio + FMAs, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; \*n = 1

A %NPPfix nos indivíduos de *E. contortisiliquum* foi extremamente variável ao longo do experimento. A %NPPF e a %NPPS foram constantemente maiores que a %NPPfix aos três e cinco meses após o plantio (Tabela 17).

No último mês do experimento (aos seis meses), os indivíduos de *E. contortisiliquum* obteve mais de 70% de NPPfix nos vasos que não receberam o fertilizante nitrogenado (dose zero) dos tratamentos testados. Destaca-se também a dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> no tratamento duplamente inoculado, com valores médios de NPPfix acima de 80%, enquanto que aqueles que receberam a maior dose (120 mg N kg solo<sup>-1</sup>), tiveram a %NPPF e a %NPPS maiores em relação a %NPPfix (Tabela 17).

Tabela 17 – Valores médios do nitrogênio na planta proveniente da fixação biológica (%NPPfix), do fertilizante (%NPPF) e do solo (%NPPS) aos três, cinco e seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. contortisiliquum*

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 5 6 3 5 6 3 5 6								
		(Meses)								
		%NPPfix			%NPPF			%NPPS		
Controle (Sem inoculação)	0	0*	48	71	-**	-	0	100	52	29
	30	6	0	44	32	52	24	62	48	32
	60	26	0	45	41	70	24	33	29	31
	120	3	2	10	48	80	50	50	19	41
Rizóbio	0	0	22	80	-	-	0	100	81	20
	30	0	4	30	39	48	25	61	48	44
	60	12	0	1	51	69	54	37	31	45
	120	2	0	0	54	84	45	44	16	55
Rizóbio + FMAs	0	0	14	84	-	-	0	100	86	15
	30	11	1	26	35	54	37	54	45	37
	60	24	0	86	47	70	9	29	30	5
	120	8	0	0	53	83	59	39	17	41

\*Não houve fixação biológica de nitrogênio

\*\*Apenas duas fontes de N para a Dose 0: N proveniente do solo e do ar.

#### 4.2.3 *Erythrina speciosa*

A concentração de N foliar variou de 18,9 g kg<sup>-1</sup> a 32,9 g kg<sup>-1</sup> e as mesmas doses de N comparadas entre os três diferentes tratamentos não variaram, assim como também não variaram entre as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 18).

Já a concentração de P foliar variou de 2,5 g kg<sup>-1</sup> a 6,4 g kg<sup>-1</sup> e também não houve diferença significativa comparando as mesmas doses de N entre os três diferentes tratamentos, e as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 18).

Em relação à razão foliar N:P seus valores médios indicaram uma limitação por P (N:P<16) em todas as doses de N nos três tratamentos testados, com exceção da dose zero de N no tratamento de Rizóbio + FMAs (Tabela 18) e diferenças significativas não foram encontradas comparando as mesmas doses de N entre os três diferentes tratamentos e as doses crescentes de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8).

Tabela 18 – Média foliar (média  $\pm$  1 desvio padrão) das concentrações de nitrogênio (N total), fósforo (P total) e razão N:P aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. speciosa* (n= 4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	N (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	ln P	N:P	ln N:P
Controle (Sem inoculação)	0	27,0 $\pm$ 1,9 <sup>aA</sup>	3,2 $\pm$ 1,2	1,1 <sup>aA</sup>	9,3 $\pm$ 2,9	2,2 <sup>aA</sup>
	30	18,9 $\pm$ 2,5 <sup>aA</sup>	5,1 $\pm$ 2,3	1,5 <sup>aA</sup>	4,7 $\pm$ 3,3	1,4 <sup>aA</sup>
	60	24,2 $\pm$ 3,4 <sup>aA</sup>	5,0 $\pm$ 3,2	1,4 <sup>aA</sup>	7,0 $\pm$ 4,8	1,7 <sup>aA</sup>
	120	22,9 $\pm$ 5,3 <sup>aA</sup>	6,4 $\pm$ 3,2	1,8 <sup>aA</sup>	4,1 $\pm$ 1,8	1,3 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	30,6 $\pm$ 4,2 <sup>aA</sup>	2,7 $\pm$ 1,2	0,9 <sup>aA</sup>	12,5 $\pm$ 4,3	2,5 <sup>aA</sup>
	30	19,1 $\pm$ 4,2 <sup>aA</sup>	5,1 $\pm$ 3,3	1,4 <sup>aA</sup>	6,1 $\pm$ 5,7	1,5 <sup>aA</sup>
	60	26,7 $\pm$ 9,0 <sup>aA</sup>	4,5 $\pm$ 2,3	1,4 <sup>aA</sup>	7,9 $\pm$ 6,5	1,8 <sup>aA</sup>
	120	19,5 $\pm$ 3,1 <sup>aA</sup>	2,5 $\pm$ 0,5	0,9 <sup>aA</sup>	8,0 $\pm$ 0,6	2,1 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	32,9 $\pm$ 9,0 <sup>aA</sup>	3,4 $\pm$ 2,6	1,0 <sup>aA</sup>	14,8 $\pm$ 11,0	2,4 <sup>aA</sup>
	30	23,5 $\pm$ 4,0 <sup>aA</sup>	4,7 $\pm$ 2,6	1,4 <sup>aA</sup>	6,6 $\pm$ 4,4	1,7 <sup>aA</sup>
	60	26,2 $\pm$ 5,9 <sup>aA</sup>	3,3 $\pm$ 1,4	1,1 <sup>aA</sup>	10,3 $\pm$ 7,9	2,1 <sup>aA</sup>
	120	22,5 $\pm$ 2,7 <sup>aA</sup>	3,9 $\pm$ 1,9	1,2 <sup>aA</sup>	6,9 $\pm$ 2,9	1,9 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

A massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca das raízes (MSR) dos indivíduos de *E. speciosa* não variou quando se compara doses iguais de N nos três diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 19).

Em todos os tratamentos, as plantas que receberam a maior dose de N (120 mg kg solo<sup>-1</sup>) tiveram uma maior massa seca na parte aérea e nas raízes, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 19).

Tabela 19 – Valores médios da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) inoculadas com rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e o controle (sem inoculação) aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. speciosa* (n= 4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MSPA (g)	MSR (g)	ln MSR
Controle (Sem inoculação)	0	13,2 <sup>aA</sup>	7,1	1,9 <sup>aA</sup>
	30	16,2 <sup>aA</sup>	9,7	2,2 <sup>aA</sup>
	60	19,9 <sup>aA</sup>	14,0	2,6 <sup>aA</sup>
	120	30,1 <sup>aA</sup>	17,0	2,8 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	17,5 <sup>aA</sup>	8,7	2,0 <sup>aA</sup>
	30	17,8 <sup>aA</sup>	10,7	2,3 <sup>aA</sup>
	60	25,6 <sup>aA</sup>	14,4	2,7 <sup>aA</sup>
	120	34,6 <sup>aA</sup>	20,5	3,0 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	23,3 <sup>aA</sup>	11,9	2,2 <sup>aA</sup>
	30	17,5 <sup>aA</sup>	9,1	2,1 <sup>aA</sup>
	60	25,4 <sup>aA</sup>	14,7	2,6 <sup>aA</sup>
	120	37,3 <sup>aA</sup>	15,0	2,6 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

A quantidade de N total acumulada nos indivíduos de *E. speciosa* aos seis meses após o plantio não variou quando comparada as mesmas doses de N aplicadas nos três diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ), assim como as crescentes doses de N comparadas dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 20).

Tabela 20 – Valores médios da quantidade de nitrogênio total acumulada na planta (QNT, g planta<sup>-1</sup>) nos tratamentos controle (sem inoculação), rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares nas diferentes doses de N após seis meses do plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. speciosa* (n=4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	QNT (g planta <sup>-1</sup> )	QNT transformado
Controle (Sem inoculação)	0	0,4	0,7 <sup>aA</sup>
	30	0,3	0,7 <sup>aA</sup>
	60	0,5	0,8 <sup>aA</sup>
	120	0,7	0,9 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	0,5	0,8 <sup>aA</sup>
	30	0,4	0,7 <sup>aA</sup>
	60	0,7	0,9 <sup>aA</sup>
	120	0,7	0,9 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	0,9	0,7 <sup>aA</sup>
	30	0,4	0,8 <sup>aA</sup>
	60	0,7	0,9 <sup>aA</sup>
	120	0,8	0,9 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

Mesmo sem a aplicação dos fungos micorrízicos arbusculares, o tratamento não inoculado e com inoculação somente com rizóbio apresentaram em média 27% e 25% de colonização em suas raízes respectivamente, indicando a presença de fungos nativos do solo nesses vasos (Tabela 21). Em todos os indivíduos analisados a colonização micorrízica variou de 14% a 45%, mas devido ao número reduzido de repetições para os tratamentos sem aplicação das espécies de fungos (controle e rizóbio), o teste estatístico foi realizado apenas no tratamento duplamente inoculado, não sendo encontrada variação entre as doses de N dentro deste mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 21).

A nodulação por bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico nos indivíduos de *E. speciosa* foi encontrada em todos os tratamentos (Tabela 21). Possivelmente devido à não esterilização do solo, bactérias nativas colonizaram as raízes destes indivíduos. Provavelmente, este fato deve ter contribuído para que não houvessem diferenças significativas quando comparadas doses iguais de N entre os diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

Tabela 21 – Colonização micorrízica (%) e massa da matéria seca de nódulos (MMSNod) (média  $\pm$  1 desvio padrão) nas raízes dos indivíduos de *E. speciosa* sob diferentes tratamentos e doses de N aos seis meses após plantio em casa de vegetação (n = 4: tratamento Rizóbio + FMAs e n = 2: tratamentos Rizóbio e Controle)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MMSNod (g planta <sup>-1</sup> )	Colonização micorrízica (%)
Controle (Sem inoculação)	0	0,6 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	45
	30	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	14 *
	60	0,3 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	31 *
	120	0,4 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	19
Rizóbio	0	1,1 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	29
	30	0,2 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	16 *
	60	0,4 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	30
	120	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>aA</sup>	23
Rizóbio + FMAs	0	1,1 $\pm$ 1,2 <sup>aA</sup>	26 <sup>a</sup>
	30	0,3 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	41 <sup>a</sup>
	60	0,7 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	27 <sup>a</sup>
	120	0,2 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	44 <sup>a</sup>

MMSNod: Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

Colonização Micorrízica: Médias seguidas de letras iguais na coluna no tratamento Rizóbio + FMAs, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; \*n = 1

A %NPPfix nos indivíduos de *E. speciosa* foi extremamente variável ao longo do experimento. Aos três meses após o plantio em casa de vegetação a %NPPF e a %NPPS foram maiores que a %NPPfix (Tabela 22).

A partir da segunda coleta (aos cinco meses) houve um aumento na %NPPfix, mas ainda os valores de %NPPF e %NPPS foram maiores (Tabela 22).

Após seis meses do plantio, a %NPPfix foi maior que a %NPPF e %NPPS nos indivíduos de *E. speciosa* na dose zero de N nos tratamentos controle e rizóbio. Já para a maior dose de N (120 mg kg solo<sup>-1</sup>) a %NPPF foi maior que a encontrada para a %NPPS e da %NPPfix (Tabela 22).

Tabela 22 – Valores médios do nitrogênio na planta proveniente da fixação biológica (%NPPfix), do fertilizante (%NPPF) e do solo (%NPPS) aos três, cinco e seis meses após plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *E. speciosa*

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 5 6 3 5 6 3 5 6								
		(Meses)								
		%NPPfix			%NPPF			%NPPS		
Controle (Sem inoculação)	0	22	51	72	-**	-	0	78	49	28
	30	0*	0	25	58	55	32	42	45	43
	60	0	19	21	63	52	36	37	29	43
	120	0	0	1	60	85	60	40	15	39
Rizóbio	0	0	35	68	-	-	0	100	65	32
	30	0	0	17	55	57	36	45	43	46
	60	0	0	26	66	69	38	34	31	37
	120	4	38	0	62	41	63	34	21	37
Rizóbio + FMAs	0	0	33	49	-	-	0	100	67	51
	30	0	0	52	56	58	24	44	42	24
	60	0	1	52	72	70	30	28	29	18
	120	3	28	2	63	58	59	34	14	39

\*Não houve fixação biológica de nitrogênio

\*\*Apenas duas fontes de N para a Dose 0: N proveniente do solo e do ar.

#### 4.2.4 *Mimosa caesalpinifolia*

A concentração de N foliar variou de 11,3 g kg<sup>-1</sup> a 21,4 g kg<sup>-1</sup> e as mesmas doses de N comparadas entre os três diferentes tratamentos não variaram, assim como também não variaram entre as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 23).

Já a concentração de P foliar variou de 0,9 g kg<sup>-1</sup> a 3,0 g kg<sup>-1</sup> e também não houve diferença significativa comparando as mesmas doses de N entre os três diferentes tratamentos, e as diferentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 23).

Em relação à razão foliar N:P seus valores médios indicaram 50% de limitação por P (N:P<16) nas doses zero, 30 mg N kg solo<sup>-1</sup> e 120 mg N kg solo<sup>-1</sup> dos tratamentos rizóbio e Rizóbio + FMAs, 25% de limitação por N (N:P>16) nas doses 30 mg N kg solo<sup>-1</sup> e 120 mg N kg solo<sup>-1</sup> do tratamento controle e na dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> do tratamento Rizóbio + FMAs, e 25% de co-limitação entre N e P (14<N:P<16) nas doses zero do tratamento controle e na dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> do tratamento controle e rizóbio (Tabela 23). Diferenças significativas não foram encontradas quando se compara as mesmas doses de N entre os três diferentes

tratamentos e as doses crescentes de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 23).

Tabela 23 – Média foliar (média  $\pm$  1 desvio padrão) das concentrações de nitrogênio (N total), fósforo (P total) e razão N:P aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *M. caesalpinifolia* (n= 4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	N (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	ln P	N:P	ln N:P
Controle (Sem inoculação)	0	18,4 $\pm$ 5,8 <sup>aA</sup>	1,3 $\pm$ 0,3	0,2 <sup>aA</sup>	15,1 $\pm$ 6,6	2,6 <sup>aA</sup>
	30	21,4 $\pm$ 11,6 <sup>aA</sup>	1,2 $\pm$ 0,4	0,1 <sup>aA</sup>	17,6 $\pm$ 4,8	2,8 <sup>aA</sup>
	60	16,4 $\pm$ 5,6 <sup>aA</sup>	1,2 $\pm$ 0,2	0,1 <sup>aA</sup>	14,2 $\pm$ 4,3	2,6 <sup>aA</sup>
	120	18,5 $\pm$ 5,7 <sup>aA</sup>	1,1 $\pm$ 0,4	0,1 <sup>aA</sup>	16,9 $\pm$ 3,8	2,8 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	17,1 $\pm$ 3,1 <sup>aA</sup>	1,5 $\pm$ 0,2	0,4 <sup>aA</sup>	11,4 $\pm$ 2,6	2,4 <sup>aA</sup>
	30	13,5 $\pm$ 4,3 <sup>aA</sup>	1,0 $\pm$ 0,2	0,0 <sup>aA</sup>	13,0 $\pm$ 3,6	2,5 <sup>aA</sup>
	60*	14,3 $\pm$ 1,7 <sup>aA</sup>	1,0 $\pm$ 0,1	-0,1 <sup>aA</sup>	14,9 $\pm$ 0,3	2,7 <sup>aA</sup>
	120	17,3 $\pm$ 7,4 <sup>aA</sup>	1,3 $\pm$ 0,4	0,3 <sup>aA</sup>	13,4 $\pm$ 3,3	2,6 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	16,5 $\pm$ 4,1 <sup>aA</sup>	3,0 $\pm$ 2,6	0,9 <sup>aA</sup>	8,6 $\pm$ 5,4	1,9 <sup>aA</sup>
	30	12,0 $\pm$ 3,8 <sup>aA</sup>	1,5 $\pm$ 0,5	0,4 <sup>aA</sup>	8,2 $\pm$ 3,1	2,1 <sup>aA</sup>
	60	18,3 $\pm$ 3,7 <sup>aA</sup>	1,2 $\pm$ 0,5	0,1 <sup>aA</sup>	16,9 $\pm$ 3,6	2,8 <sup>aA</sup>
	120	11,3 $\pm$ 1,7 <sup>aA</sup>	0,9 $\pm$ 0,0	-0,1 <sup>aA</sup>	12,5 $\pm$ 2,1	2,5 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

\*n = 3

A massa seca da parte aérea (MSPA) dos indivíduos de *M. caesalpinifolia* não variou quando se compara doses iguais de N nos três diferentes tratamentos, porém houve um incremento da MSPA com aumento das doses de N, no entanto, este incremento foi variável entre as doses crescentes de N no tratamento duplamente inoculado (Rizóbio + FMAs) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 24), havendo diferença da dose 120 mg N kg solo<sup>-1</sup> com a dose zero e 30 mg N kg solo<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ), enquanto a dose 60 mg N kg solo<sup>-1</sup> foi significativamente maior em relação a dose zero desse mesmo tratamento ( $p = 0,001$ ) (Tabela 24).

O mesmo não foi observado para a massa seca das raízes (MSR), não havendo diferença significativa quando se compara doses iguais de N nos três diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento (Tabela 24).

Em todos os tratamentos, as plantas que receberam a maior dose de N (120 mg kg solo<sup>-1</sup>) tiveram uma maior massa seca na parte aérea e nas raízes, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 24).

Tabela 24 – Valores médios da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) inoculadas com rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e o controle (sem inoculação) aos seis meses após o plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *M. caesalpinifolia* (n= 4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MSPA (g)	MSR (g)	ln MSR
Controle (Sem inoculação)	0	8,1 <sup>aA</sup>	4,3	1,3 <sup>aA</sup>
	30	23,9 <sup>aA</sup>	9,2	1,7 <sup>aA</sup>
	60	29,3 <sup>aA</sup>	9,1	2,0 <sup>aA</sup>
	120	43,8 <sup>aA</sup>	13,6	2,6 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	6,9 <sup>aA</sup>	3,2	1,1 <sup>aA</sup>
	30	16,8 <sup>aA</sup>	5,1	1,6 <sup>aA</sup>
	60	22,3 <sup>aA</sup>	7,7	1,9 <sup>aA</sup>
	120	39,4 <sup>aA</sup>	10,6	2,2 <sup>aA</sup>
Rizóbio +FMAs	0	6,6 <sup>acA</sup>	3,8	1,1 <sup>aA</sup>
	30	18,1 <sup>abA</sup>	5,7	1,7 <sup>aA</sup>
	60	39,5 <sup>bcA</sup>	7,9	1,9 <sup>aA</sup>
	120	57,7 <sup>ca</sup>	16,0	2,7 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

A quantidade de N total acumulada nos indivíduos de *M. caesalpinifolia* aos seis meses após o plantio não variou quando comparada as mesmas doses de N aplicadas nos três diferentes tratamentos ( $p > 0,05$ ), assim como as crescentes doses de N comparadas dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 25).

Tabela 25 – Valores médios da quantidade de nitrogênio total acumulada na planta (QNT, g planta<sup>-1</sup>) nos tratamentos controle (sem inoculação), rizóbio, rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares nas diferentes doses de N após seis meses do plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *M. caesalpiniiifolia* (n=4)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	QNT (g planta <sup>-1</sup> )	QNT transformado
Controle (Sem inoculação)	0	0,2	0,6 <sup>aA</sup>
	30	0,4	0,7 <sup>aA</sup>
	60	0,4	0,8 <sup>aA</sup>
	120	0,8	0,9 <sup>aA</sup>
Rizóbio	0	0,1	0,5 <sup>aA</sup>
	30	0,2	0,7 <sup>aA</sup>
	60*	0,3	0,7 <sup>aA</sup>
	120	0,7	0,9 <sup>aA</sup>
Rizóbio + FMAs	0	0,1	0,5 <sup>aA</sup>
	30	0,2	0,7 <sup>aA</sup>
	60	0,7	0,9 <sup>aA</sup>
	120	0,6	0,9 <sup>aA</sup>

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

\*n = 3

No tratamento controle e no inoculado apenas com rizóbio foram observadas a presença de colonização micorrízica, sugerindo à presença de fungos nativos do solo nos vasos que compunham os tratamentos os quais não foram aplicadas as espécies de fungos (Tabela 26). Em todos os indivíduos analisados a colonização micorrízica variou de 1% a 26%, mas devido ao número reduzido de repetições para os tratamentos sem aplicação das espécies de fungos (controle e rizóbio), o teste estatístico foi realizado apenas no tratamento duplamente inoculado, não sendo encontrada variação entre as doses de N dentro deste mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ) (Tabela 26).

A nodulação por bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico nos indivíduos de *M. caesalpiniiifolia* foi encontrada em todos os tratamentos (Tabela 26). Possivelmente devido à não esterilização do solo, bactérias nativas colonizaram as raízes destes indivíduos. Provavelmente, este fato deve ter contribuído para que não houvessem diferenças significativas quando comparadas doses iguais de N entre os diferentes tratamentos e as crescentes doses de N dentro de um mesmo tratamento ( $p > 0,05$ ).

Tabela 26 – Colonização micorrízica (%) e massa da matéria seca de nódulos (MMSNod) (média  $\pm$  1 desvio padrão) nas raízes dos indivíduos de *M. caesalpinifolia* sob diferentes tratamentos e doses de N aos seis meses após plantio em casa de vegetação (n = 4: tratamento Rizóbio + FMAs e n = 2: tratamentos Rizóbio e Controle)

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	MMSNod (g planta <sup>-1</sup> )	Colonização micorrízica (%)
Controle (Sem inoculação)	0	1,0 $\pm$ 0,7 <sup>aA</sup>	1
	30	1,5 $\pm$ 1,4 <sup>aA</sup>	8 **
	60	1,3 $\pm$ 1,1 <sup>aA</sup>	6
	120	1,2 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	26
Rizóbio	0	0,8 $\pm$ 0,6 <sup>aA</sup>	2
	30	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>aA</sup>	5 **
	60*	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>aA</sup>	2
	120	0,7 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	8
Rizóbio + FMAs	0	0,6 $\pm$ 0,3 <sup>aA</sup>	7 <sup>a</sup>
	30	0,5 $\pm$ 0,5 <sup>aA</sup>	3 <sup>a</sup>
	60	2,0 $\pm$ 1,2 <sup>aA</sup>	5 <sup>a</sup>
	120	1,3 $\pm$ 0,7 <sup>aA</sup>	4 <sup>a</sup>

MMSNod: Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% dentro do mesmo tratamento e aquelas seguidas por maiúsculas iguais não diferem entre si numa mesma dose.

Colonização Micorrízica: Médias seguidas de letras iguais na coluna no tratamento Rizóbio + FMAs, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

\*n = 3; \*\*n = 1

A %NPPfix nos indivíduos de *M. caesalpinifolia* foi extremamente variável ao longo do experimento. Aos três e cinco meses após o plantio em casa de vegetação a %NPPF e a %NPPS foram maiores que os valores obtidos para a %NPPfix (Tabela 27).

No sexto mês, a %NPPS foi em média maior que a % NPPfix nos indivíduos de *M. caesalpinifolia* que não receberam o fertilizante nitrogenado nos tratamentos com rizóbio e Rizóbio + FMAs (Tabela 27). A %NPPfix foi maior em relação a %NPPF e %NPPS apenas para o tratamento controle nas doses zero e 30 mg N kg solo<sup>-1</sup>. Já a %NPPF foi maior em relação ao encontrado para a %NPPS e %NPPfix nos indivíduos da maior dose de N (120 mg kg solo<sup>-1</sup>) (Tabela 27).

Tabela 27 – Valores médios do nitrogênio na planta proveniente da fixação biológica (%NPPfix), do fertilizante (%NPPF) e do solo (%NPPS) aos três, cinco e seis meses após plantio em casa de vegetação nos indivíduos de *M. caesalpinifolia*

Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 5 6 3 5 6 3 5 6								
		(Meses)								
		%NPPfix			%NPPF			%NPPS		
Controle (Sem inoculação)	0	0*	37	54	-**	-	0	100	63	46
	30	0	0	52	43	54	20	57	46	28
	60	16	3	11	47	66	44	37	31	45
	120	0	2	14	61	79	51	39	19	35
Rizóbio	0	0	9	34	-	-	0	100	91	66
	30	0	1	15	41	49	32	59	50	53
	60	5	0	2	56	69	47	39	31	51
	120	3	7	0	54	69	62	44	24	38
Rizóbio + FMAs	0	0	12	42	-	-	0	100	88	58
	30	10	6	33	36	49	33	54	45	33
	60	10	1	55	57	69	28	33	30	17
	120	3	0	0	58	83	70	40	17	30

\*Não houve fixação biológica de nitrogênio

\*\*Apenas duas fontes de N para a Dose 0: N proveniente do solo e do ar.

### 4.3 Atividade da Redução de Acetileno

Os resultados apresentados a seguir são os valores médios da atividade da redução de acetileno (ARA) realizada no último mês de coleta. Estes resultados são apresentados de forma a indicar ou não a ocorrência de fixação biológica de nitrogênio através da atividade da nitrogenase nos nódulos coletados nas espécies fixadoras de nitrogênio. Como são espécies florestais, e a ARA é uma medida pontual da enzima nitrogenase que reflete somente a ocorrência de fixação no momento da coleta, foram encontrados valores muito variados dentro de uma mesma repetição (Figura 15), sendo *M. caesalpinifolia* a espécie com valores mais baixos de ARA (0,08 a 5,9  $\mu\text{moles de etileno h}^{-1} \text{ g n\acute{o}dulo seco}^{-1}$ ) (Figura 12).

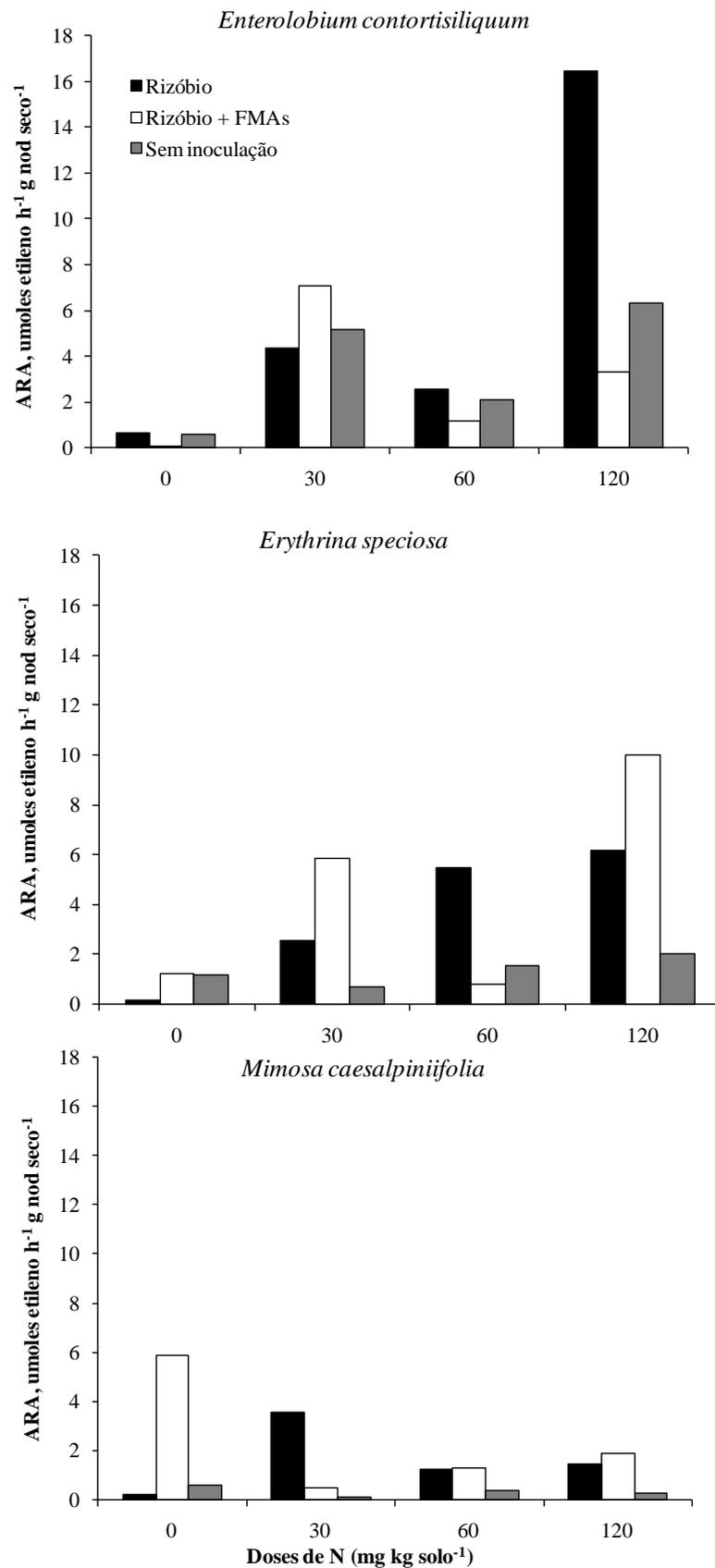


Figura 12 – Valores médios da atividade da redução do acetileno (ARA –  $\mu\text{moles etileno h}^{-1} \text{ g nódulo seco}^{-1}$ ) nas três espécies fixadoras de nitrogênio sob diferentes doses de N ( $\text{mg kg solo}^{-1}$ ), ao seis meses após plantio em casa de vegetação. Barras em preto – Rizóbio; branco – Rizóbio + FMAs; cinza – Sem inoculação

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Fixação Biológica do Nitrogênio

Nossa primeira hipótese postulava que: *elevadas doses de N limitam a fixação de N<sub>2</sub>*. Esta primeira hipótese foi confirmada uma vez que a adição de N em doses elevadas (120 mg N kg solo<sup>-1</sup>) induziu a um decréscimo na quantidade de N fixado nas três espécies estudadas e nos três tratamentos testados (Tabelas 17, 22 e 27). Outros estudos encontraram resultados semelhantes, por exemplo, doses de 40 a 80 kg de N por hectare reduziram em cerca de 50% a FBN em *Leucaena leucocephala* (SANGINGA et al., 1989), reforçando a hipótese de que o aumento da disponibilidade de N no solo tende a inibir a FBN (COMPTON et al., 2004; MARCARELLI; WURTSBAUGH, 2007).

Por outro lado, é postulado que pequenas doses de N podem beneficiar a FBN, funcionando como dose de arranque (FRANCO; DOBEREINER, 1968; TSAI et al., 1993; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006,).

Baseando-se na premissa acima, nossa segunda hipótese foi que: *a carência de nitrogênio induz a fixação de N<sub>2</sub> pela FBN através da associação de algumas espécies de leguminosas com bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)* (CARLING et al., 1978; BETHLENFALVAY; YODER, 1981; SILVEIRA; CARDOSO, 1987 a,b; COSTA et al., 1990). Provavelmente este fato seja devido ao maior fornecimento de carboidratos e P ao rizóbio, que conseqüentemente, favorece a ocorrência de nódulos (SILVEIRA et al., 1995; GROSS et al., 2004).

Esta segunda hipótese foi parcialmente confirmada em nosso estudo. Por um lado, devido à elevada variabilidade observada nos valores de %NPPfix, não foi possível distinguir para nenhuma das espécies qual dos tratamentos foi mais eficiente no sentido de aumentar a FBN. Em segundo lugar, a menor dose de N aplicada (30 mg N kg solo<sup>-1</sup>) não favoreceu a fixação como esperado, obtendo-se uma baixa porcentagem de nitrogênio na planta proveniente da fixação (%NPPfix). Por outro lado, quando as plantas cresceram em meio onde a disponibilidade de N era baixa (em média 0,3 g kg<sup>-1</sup>), sem a aplicação deste nutriente nos vasos, a FBN foi favorecida principalmente nos indivíduos de *E. contortisiliquum* e *E. speciosa* aos seis meses após o plantio, obtendo-se alta %NPPfix (Tabelas 17, 22 e 27).

Interessantemente, todas as espécies, com exceção da espécie referência, sob diferentes doses de N e tratamentos apresentaram nódulos em suas raízes. Portanto, a ausência

ou baixa quantidade de N fixada não se deu pela falta de nodulação. No entanto, se sabe que a nodulação é uma condição necessária, mas não suficiente para que haja fixação de  $N_2$  (CLEVELAND et al., 1999), pois diversos fatores biológicos, químicos e físicos podem influenciar a FBN através de seus simbiontes (FREIRE, 1984; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, a ausência de nodulação ou nodulação ineficiente em determinadas espécies sob determinadas condições edáficas e ambientais, é decorrente de fatores limitantes ao estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento da simbiose (FREIRE, 1984).

Nas regiões tropicais é comum encontrar simbioses não eficazes, pois há uma grande variação na especificidade e na capacidade das leguminosas em se associar com os rizóbios (SPRENT, 2003). No nódulo a bactéria pode atuar como essencialmente parasita à altamente efetiva no fornecimento da amônia para a planta (BURDON et al., 1999). Vários fatores determinam a eficiência da simbiose, como por exemplo, a morfologia e a estrutura dos nódulos os quais, por sua vez, são determinados pelo hospedeiro, e pelas características genótípicas e fenotípicas das bactérias simbióticas (SPRENT, 2007). Como se sabe trocas genéticas ocorrem entre as bactérias do solo, levando algumas espécies a perderem os genes que determinam a simbiose e a FBN, e outras passam a adquirir esses genes e, conseqüentemente, a capacidade de fixar N atmosférico (SPRENT, 2003). Outra característica importante elucidada por Lodwig et al. (2003) foi que uma troca muito específica de metabólitos é necessária para a simbiose ser totalmente eficaz.

Torna-se difícil, portanto, estabelecer neste estudo as causas da grande variabilidade observada na fixação dentre as espécies, uma vez que vários fatores de natureza ambiental, estrutural e genética podem interagir concomitantemente no processo de simbiose e fixação.

Ao mesmo tempo, através da técnica de redução de acetileno realizada no final do experimento, foi demonstrado que a enzima nitrogenase nos nódulos presentes nas raízes das três leguminosas fixadoras de N encontrava-se ativa, sugerindo a ocorrência da fixação (Figura 12). No entanto, sem que tenha sido possível sua quantificação através desta técnica (McNABB; GEIST, 1979; PEOPLES et al., 1989; DALTON; KRAMER, 2006).

Quanto aos inoculantes aplicados (bactérias e fungos), que deveriam induzir um aumento na fixação de nitrogênio, o fato do solo não ter sido esterilizado antes do plantio parece ter contribuído para que tenha havido uma competição destes com a microbiota nativa do solo. Pois, mesmo nos vasos onde não aplicamos o rizóbio e o fungo micorrízico arbuscular, as espécies apresentaram nódulos e encontramos taxas de colonização micorrízica em suas raízes (Tabelas 11, 16, 21 e 26). Este fato pode ter diminuído a capacidade destes inoculantes em auxiliar no aumento da fixação, uma vez que os mesmos tiveram que competir

com fungos indígenas, geralmente bem adaptados às condições de determinado solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Alguns autores reportam a importância e o benefício da inoculação com rizóbio no estímulo à colonização micorrízica para leguminosas florestais (SCHIAVO; MARTINS, 2003; BURITY et al., 2000; JESUS et al., 2005). No entanto, a porcentagem de colonização radicular nem sempre é uma característica segura para definir o efeito do FMA sobre sua planta hospedeira, uma vez que, dependendo das condições ambientais e das espécies de fungos e vegetais, valores baixos de colonização radicular podem ser suficientes para resultar em promoção do desenvolvimento da planta enquanto que, em outras combinações de FMA e hospedeiro, uma maior colonização das raízes pode não promover o crescimento da planta (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2002).

Outro fator importante observado foram as baixas taxas de colonização micorrízica nas raízes, o qual podem ter sido influenciadas pela quantidade de P aplicado no solo para este experimento, pois a colonização micorrízica é influenciada também por diversos fatores externos dentre eles a disponibilidade de P (HABTE; MANJUNATH, 1991). Habte e Manjunath (1991) sugeriram que a concentração de  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$  de P na solução do solo é próxima ao ótimo para a colonização e atividade das micorrizas, fato confirmado para espécies arbóreas tropicais por Siqueira e Saggin-Junior (2001). Portanto, a concentração de P aplicado ao solo deste experimento ( $200 \text{ mg P kg solo}^{-1}$ ), pode ter inibido a colonização micorrízica nas espécies (SMITH; SMITH, 1996; KOIDE, 1991). A inoculação com fungos micorrízicos pode ser um instrumento útil para reforçar o crescimento e desenvolvimento das plantas no reflorestamento tropical (SIQUEIRA et al., 1998), pois na maioria dos casos, estimulam o crescimento vegetal, e conseqüentemente a simbiose aumenta a absorção de N, a dependência simbiótica assim como a biomassa vegetal (CHALK et al., 2006; SMITH; READ, 2008). Portanto, o estímulo da captação de nutrientes e posterior translocação destes à parte aérea causa, relativamente, menor transferência de fotossintatos à raiz e maior retenção deles na parte aérea, sendo utilizado na produção de matéria verde (SILVEIRA et al., 1992).

Como consequência, sob condições tropicais, muitas árvores fixadoras de  $\text{N}_2$  além de exibirem crescimento rápido, ocorre um maior acúmulo de biomassa, enriquecendo o solo em nitrogênio disponível para as plantas (BINKLEY; GIARDINA, 1997). Neste experimento, a dupla inoculação (Rizóbio + FMAs) aumentou o acúmulo de matéria seca na parte aérea da *M. caesalpinifolia* ( $p < 0,05$ ), assim como observado por Burity et al. (2000) e Mendes Filho et al. (2010) estudando esta mesma espécie. Este ganho também foi verificado por Schiavo e Martins (2003) em mudas de *Acacia mangium*, onde houve maior acúmulo de matéria seca na

parte aérea quando produzidas com inóculo de FMAs e rizóbio. A mesma tendência também foi observada por Jesus et al. (2005), onde a produção de matéria seca da parte aérea e das raízes de *Piptadenia gonoacantha* inoculadas simultaneamente com rizóbios e FMAs foi maior que nos tratamentos inoculados apenas com rizóbio.

## 5.2 Disponibilidade de Nitrogênio (N) e Fósforo (P)

Os resultados obtidos neste estudo mostraram concentrações mais elevadas de P nos tecidos foliares nas espécies fixadoras de N<sub>2</sub> (*E. contortisiliquum* e *E. speciosa*) em relação à espécie referência não fixadora de N<sub>2</sub> (*A. polyphylla*) ( $p < 0,05$ ) (Tabelas 8, 13, 18 e 23). Fato este consistente com o fato de que plantas dependentes unicamente da FBN possuem maiores concentrações de P em suas folhas (SPRENT, 1999). Como as espécies fixadoras de N<sub>2</sub> tendem a usar mais fósforo, ocorre um decréscimo da razão N:P em comparação com as espécies não fixadoras (CREWS, 1999), o mesmo foi observado nas espécies fixadoras estudadas com baixa razão N:P foliar em comparação com a espécie referência ( $p < 0,05$ ). Esta alta concentração de P nos tecidos das plantas fixadoras pode ser parcialmente explicado pelo alto custo energético da FBN, que requer uma elevada quantidade de P, podendo a deficiência neste elemento afetar de modo generalizado as taxas de fixação (ISRAEL, 1987; GEHRING et al., 1999; KENNEDY; COCKING, 1997; CHAPIN et al., 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Como a maioria da fixação ocorre em áreas tropicais, que caracteristicamente tem baixas concentrações de P disponível, a limitação da fixação por este nutriente passa a ser de vital importância. (VITOUSEK; FARRINGTON, 1997).

Ao contrário do observado para o P, a *E. speciosa* e a *M. caesalpinifolia* (espécies fixadoras) tiveram de modo geral, baixas concentrações de N em seus tecidos foliares em relação a espécie não fixadora ( $p < 0,05$ ). Esta menor concentração foliar de N difere do padrão encontrado por Soares (2007) e Coletta et al. (2009) em uma área sob restauração florestal no Estado de São Paulo, onde, aos sete meses e quatro anos após a semeadura direta no campo, as mesmas espécies, tiveram uma concentração maior de N foliar em relação à espécie referência (*A. polyphylla*).

Vale ressaltar neste estudo a importância de leguminosas florestais nativas na recuperação de áreas degradadas, pois independentemente da fixação de N, as concentrações elevadas de N em seus tecidos (ROGGY et al., 1999; VITOUSEK et al., 2002; BUSTAMANTE et al., 2004; OMETTO et al., 2006; NARDOTO et al., 2008) leva à uma baixa razão C:N foliar (NARDOTO et al., 2008; SIDDIQUE et al., 2008), fato observado para

as quatro espécies deste estudo nos tratamentos sem aplicação de N (dose zero) (Anexo D). Portanto, o material vegetal produzido por estas espécies será facilmente decomposto contribuindo para a restauração dos fluxos de nutrientes, principalmente do N, através da deposição da serapilheira (COSTA et al., 2000).

## 6 CONCLUSÕES

As espécies estudadas possuem grande potencial para a recuperação de áreas degradadas já que efetivamente fixam N da atmosfera aumentando o aporte deste nutriente no sistema, além disso, as baixas concentrações de N do solo estimularam a fixação biológica do nitrogênio através de seus simbioses principalmente aos seis meses após o plantio em casa de vegetação.

Portanto, utilizar leguminosas associadas a fixadores de N em projetos de restauração ecológica, pode-se obter uma revegetação eficiente e com baixo aporte de fertilizantes, além disso, as leguminosas são geralmente encontradas como pioneiras na sucessão de espécies em áreas onde há luz em abundância, ao contrario do N (ABER, 1992).

Resta destacar que fixando ou não  $N_2$  atmosférico, as leguminosas possuem um papel chave no sistema. O estilo de vida com alto requerimento de N das leguminosas, como já foi reportado por vários autores em sistemas tropicais, leva a uma alta qualidade do material vegetal produzido, dessa forma, possuem um papel importante na redistribuição de N, que será mineralizado e disponível novamente para a comunidade vegetal.

## REFERÊNCIAS

- ABER, J.D. Restored forests and the identification of critical factors in species-site interactions. In: JORDAN III, W.R.; GILPINS, M.E.; ABER, J.D. (Ed.). *Restoration ecology, a synthetic approach to ecological research*. New York: Cambridge University Press, 1992. p. 241-250.
- AERTS, R.; CHAPIN, F.S. The mineral nutrition of wild plants revisited: A re-evaluation of processes and patterns. In: FITTER, A.; RAFAELLI, D. (Ed.). **Advances in ecological research**. San Diego: Academic Press, 2000. v. 30, p. 1-67.
- ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. **The leguminosae** – a source book of characteristic, uses, and nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press, 1981. 811 p.
- BECK, D.P.; MUNNS, D.N. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 47, n. 2, p. 278-282, 1984.
- BETHLENFALVAY, G.J.; YODER, J.F. The *Glycine* – *Glomus* – *Rhizobium* symbioses. 1-Phosphorus effect on nitrogen fixation and mycorrhizal infection. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 52, p. 141-145, 1981.
- BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1992. 124 p.
- BINKLEY, D.; GIARDINA, C. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. In: NAMBIAR, E.K.; BROWN, A.G. (Ed.). **Management of soil, nutrients and water in tropical plantations forest**. Canberra: ACIAR, 1997. cap. 9, p. 297-337. (ACIAR Monograph, 43).
- BOARETTO, R.M.; MATTOS JUNIOR, D.; TRIVELIN, P.C.O.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A.E. Acúmulo de nutrientes e destino do nitrogênio (<sup>15</sup>N) aplicado em pomar jovem de laranja. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 600-605, 2007.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 6, p. 209-266, 1987.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the B-values and <sup>15</sup>N isotope dilutions techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N<sub>2</sub>-fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 151-155, 1992.
- BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B.; DART, P.J. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 57, p. 235-270, 2000.
- BRITO, M.M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C. Marcha de absorção de nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) WALP) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de <sup>15</sup>N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 895-905, 2009.

BURDON, J.J.; GIBSON, A.H.; SEARLE, S.D.; WOODS, M.J.; BROCKWELL, J. Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian *Acacia* - within species interactions. **Journal of Applied Ecology**, v. 36, 398-408, 1999.

BURITY, H.A.; LYRA, M.C.C.P.; SOUZA, E.S.; MERGULHÃO, A.C.E.S.; SILVA, M.L.R.B. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 801-807, 2000.

BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Biological nitrogen-fixation. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 317-335, 1993.

BUSCHBACHER, R.; UHL, C.; SERRÃO, E.A.S. Abandoned pastures in Eastern Amazonia: 2. Nutrient stocks in the soil and vegetation. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 76, p. 682-699, 1988.

BUSTAMANTE, M.M.C.; MARTINELLI, L.A.; SILVA, D.A.; CAMARGO, P.B.; KLINK, C.A.; DOMINGUES, T.F.; SANTOS, R.V. N-15 natural abundance in woody plants and soils of central Brazilian savannas (Cerrado). **Ecological Applications**, Washington, v. 14, n. 4, p. 200-213, 2004.

CARLING, D.E.; RIEHLE, W.G.; BROWN, M.F.; JOHNSON, D.R. Effects of a vesicular – arbuscular mycorrhizal fungus on nitrate reductase and nitrogenase activities in nodulating and non-nodulating soybeans. **Phytopathology**, St Paul, v. 68, p. 1590-1596, 1978.

CHALK, P.M. Estimation of N<sub>2</sub> fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving <sup>15</sup>N enrichment and their application. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 389–410, 1985.

CHALK, P.M.; SMITH, C.J. <sup>15</sup>N isotope dilution methodology for evaluating the dynamics of biologically fixed N in legume-non-legume associations. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p. 80–84, 1994.

CHALK, P.M.; SOUZA, R.F.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. The role of arbuscular mycorrhiza in legume symbiotic performance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2944–2951, 2006.

CHAPIN, D.M.; BLISS, L.C.; BLEDSOE, L.J. Environmental-Regulation of nitrogen fixation in a high arctic lowland ecosystem. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 12, p. 2744-2755, 1991.

CHAPIN, F.S.; MATSON, P.A.; MOONEY, A.H. **Principles of terrestrial ecosystem ecology**, New York: Springer-Verlag, 2002. 455p.

CHAZDON, R.L. Beyond Deforestation: Restoring forests and ecosystem services on degraded lands. **Science**, Washington, v. 320, n. 5882, p. 1458-1460, 2008.

CLARK, R.B.; ZETO, S.K. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 23, p. 867-902, 2000.

CLEWELL, A.F. Restoring for natural authenticity. **Ecological Restoration**, Madison, v. 18, p. 216–217, 2000.

CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R.; SCHIMEL, D.S.; FISHER, H.; HOWARTH, R.W.; HEDIN, L.O.; PERAKIS, S.S.; LATTY, E.F.; VON FISCHER, J.C.; ELSER, A.; WASSON, M.F. Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N<sub>2</sub>) fixation in natural ecosystems. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 13, n. 2, p. 623–645, 1999.

COLETTA, L.D.; SOARES, P.G.; NARDOTO, G.B.; BALIEIRO, F.C.; RODRIGUES, R.R.; MARTINELLI, L.A. Fixação biológica de nitrogênio em áreas de restauração: abundância natural de <sup>15</sup>N de leguminosas arbóreas nativas plantadas por semeadura direta. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32, 2009, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: SBCS, 2009. 1 CD-ROM.

COSTA, G.S.; FRANCO, A.A.; DAMASCENO, R.N.; FARIA, S.M. Reabilitação do fluxo de nutrientes pela deposição da serapilheira de leguminosas arbóreas em uma área com subsolo exposto em recuperação em analogia a uma capoeira. In: DIAS, L.E.; MELLO, J.W.V. (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: SOBRADE, UFV, 2000. p. 112–113.

CREWS, T.E. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, n. 1/3, p. 233–246, 1999.

CREWS, T.E.; KURINA, L.M.; VITOUSEK, P.M. Organic matter and nitrogen accumulation and nitrogen fixation during early ecosystem development in Hawaii. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 52, p. 259–279, 2001.

COLE, C.V.; HEIL, R.D. Phosphorus effects on terrestrial nitrogen cycling. **Ecological Bulletins**, Stockholm v. 33, p. 363–374, 1981.

COMPTON, J.E.; WATRUD, L.S.; PORTEOUS, L.A.; DEGROOD, S. Response of soil microbial biomass and community composition to chronic nitrogen additions at Harvard Forest. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 196, p. 143–158, 2004.

COSTA, N.L.; PAULINO, V.T.; RODRIGUES, A.N.A. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal and phosphate fertilization on growth, nodulation and nitrogen and phosphorus uptake of pigeonpea. **Nitrogen Fixing Tree Research Reports**, Morrilton, v. 8, p. 123–125, 1990.

DALTON, D.A.; KRAMER, S. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 105–130.

DAVIDSON, E.A.; CARVALHO, C.J.R.D.; VIEIRA, I.C.G.; FIGUEIREDO, R.D.O.; MOUTINHO, P.; ISHIDA, F.Y.; SANTOS, M.T.P.D.; GUERRERO, J.B.; KALIF, K.; SABÁ, R.T. Nitrogen and phosphorus limitation of biomass growth in a tropical secondary forest. **Ecological Applications**, Washington, v. 14, p. 150–163, 2004.

DAVIDSON, E.A.; CARVALHO, C.J.R.D.; FIGUEIRA, A.M.; ISHIDA, F.Y.; OMETTO, J.P.H.B.; NARDOTO, G.B.; SABÁ, R.T.; HAYASHI, S.N.; LEAL, E.C.; VIEIRA, I.C.G.;

MARTINELLI, L.A. Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. **Nature**, London, v. 447, p. 995-998, 2007.

DELL, B.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. **Nutrient disorders in plantation eucalyptus**. Canberra City: ACIAR, 1995. 110 p.

DENICH, M. **Estudo da importância de uma vegetação secundária nova para o incremento da produtividade do sistema de produção na Amazônia Oriental Brasileira**. Belém: EMBRAPA, CPATU, 1991.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 285-294, 1966.

DOBSON, A.P.; BRADSHAW, A.D.; BAKER, A.J.M. Hopes for the future: restoration ecology and conservation biology. **Science**, Washington, v. 277, p. 515-522, 1997.

ELLFOLK, N. Leghaemoglobin, a plant haemoglobin. **Endeavour**, Oxford, v. 31, p. 39-142, 1972.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Solos, 1999. 370 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 400 p.

FARIA, S.M.; LIMA, H.C.; FRANCO, A.A.; MUCCI, E.S.F.; SPRENT, J.I. Nodulation of legume trees from South East Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 99, p. 347-356, 1987.

FARIA, S.M. Rhizobial root infection in *Erythrina speciosa* Andrews. In: WESTLEY, S.B.; POWELL, M.H. (Ed.) **Erythrina in the new and Old Worlds**. Paha: NFTA, NFTRR Special Issue, 1993. p. 292-296.

FARIA, S.M.; LIMA, H.C. Additional studies on the nodulation status of legume species in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 200, p. 185-192, 1998.

FELFILI, J.M.; SILVA JUNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; MACHADO, J.W.B.; WALTER, B.M.T.; SILVA, P.E.N.; HAY, J.D. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado sensu stricto na Chapada Pratinha, D.F. Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 6, p. 27-46, 1993.

FENILLI, T.A.B.; REICHARDT, K.; BACCHI, O.O.S.; TRIVELIN, P.C.O.; DOURADONETO, D. The <sup>15</sup>N isotope to evaluate fertilizer nitrogen absorption efficiency by the coffee plant. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 767-776, 2007.

FILOSO, S.; MARTINELLI, L.A.; HOWARTH, R.W.; BOYER, E.W.; DENTENER, F. Human Activities Changing the N Cycle in Brazil. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 79, p. 61-89, 2006.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do N por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 3, p. 223-227, 1968.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 20, p. 68-74, 1994.

FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 897-903, 1997.

FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. The role of biological nitrogen fixation in land reclamation agroecology and sustainability of tropical agriculture. In: ROCHA-MIRANDA, C.E. (Ed.). **Transition to global sustainability: the contribution of Brazilian science**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2000. p. 209-234.

FREIRE, J.R. Important limiting factors in soil. In: ALEXANDER, M. (Ed.). **Biological nitrogen fixation: ecology, technology and physiology**. New York: Plenum Press, 1984. p. 51-74.

FRIED, M.; MIDDLEBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by legume crop. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 47, p. 713-715, 1977.

GALLOWAY, J.N.; ABER, J.D.; ERISMAN, J.W.; SEITZINGER, S.P.; HOWARTH, R.W.; COWLING, E.B.; COSBY, B.J. The nitrogen cascade. **BioScience**, Washington, v. 53, n. 4, p. 341-356, 2003.

GALLOWAY, J.N.; DENTENER, F.J.; CAPONE, D.G.; BOYER, E.W.; HOWARTH, R.W.; SEITZINGER, S.P.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C.C.; GREEN, P.A.; HOLLAND, E.A.; KARL, D.M.; MICHAELS, A.F.; PORTER, J.H.; TOWNSEND, A.R.; VOROSMARTY, C.J. Nitrogen cycles: past, present, and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153-226, 2004.

GAVA, G.J.C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W. Recuperação do nitrogênio (<sup>15</sup>N) da uréia e da palhada por soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, p. 621-230, 2003.

GEHRING, C.; DENICH, M.; KANASHIRO, M.E.; VLEK, P.L.G. Response of secondary vegetation in Eastern Amazonia to relaxed nutrient availability constraints. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 45, p. 223-241, 1999.

GILLER, K.E.; WILSON, K.J. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. Wallingford: CAB International, 1991.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, London, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GROSS, E.; CORDEIRO, L.; CAETANO, F.H. Nodulação e micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 95-101, 2004.

GÜSEWELL, S. N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. **New Phytologist**, London, v. 164, p. 243-266, 2004.

HABTE, M.; MANJUNATH, A. Categories of vesicular arbuscular dependency of host species. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 1, p. 3-12, 1991.

HASTINGS, M.G.; JARVIS, J.C.; STEIG, E.J. Anthropogenic Impacts on Nitrogen Isotopes of Ice Core Nitrate. **Science**, Washington, v. 324, p. 1288, 2009.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, n. 8, p. 1185-1207, 1968.

HE, X.H.; CRITCHLEY, C.; BLEDSOE, C. Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 6, p. 531-567, 2003.

HERBERT, D.A.; WILLIAMS, M.; RASTETTER, E.B. A model analysis of N and P limitation on carbon accumulation in Amazonian secondary forest after alternate land-use abandonment. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 65, p. 121-150, 2003.

HOBBIE, E.A.; JUMPPONEN, A.; TRAPPE, J. Foliar and fungal  $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N}$  ratios reflect development of micorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. **Oecologia**, New York, v. 146, p. 258-268, 2005.

HÖGBERG, P. Tansley review No 95 - N-15 natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, London, v. 137, n. 2, p. 179-203. 1997.

ISRAEL, D.W. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 835-840, 1987.

JANOS, D.P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. **Ecology**, Brooklyn, v. 61, p. 151-162, 1980a.

JANOS, D.P. Mycorrhizae influence tropical succession. **Biotropica**, Washington, v. 12, p. 56-64, 1980b.

JANOS, D.P. Mycorrhizas, succession and the rehabilitation of deforested lands in the humid tropics. In: FRANKLAND, J.C.; MAGAN, N.; GADD, G.M. (Ed.). **Fungi and environmental change**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1996. cap. 10, p. 129-162.

JAKOBSEN, I. Research approaches to study the functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas in the field. In: ROBSON, A.D.; ABBOT, L.K.; MALACZUK, N. (Ed.) **Management of Mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Dordrecht: Kluwer Publications, 1994. p. 141-147.

JENNY, H. Causes of the high nitrogen and organic matter content of certain tropical forest soils. **Soil Science**, New Brunswick, v. 69, n. 1, p. 63–69, 1950.

JACKSON, M.L. **Análisis químico de suelos**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1964.

JESUS, E.C.; SCHIAVO, J.A.; FARIA, S.M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 545-552, 2005.

JOHNSON, C.M.; ULRICH, A. **Analytical methods**. Riverside: California Agricultural Experiment Station, 1959. 766 p. (Bulletin).

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JUNK, G.; SVEC, H.V. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, New York, v. 14, p. 234–243, 1958.

KENNEDY, I.R.; COCKING, E.C. Biological nitrogen fixation: The global challenge and future needs. In: ROCKEFELLER FOUNDATION CONFERENCE, 1997, Bellagio, Italy. **Proceedings...** Sydney: University of Sydney, SUN Fix Press, 1997. p. 83.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KOIDE, R.T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, London, v. 117, p. 365-386, 1991.

KOIDE, R.T.; LI, M. Physiology of the mycorrhizal plant. In: INGRAM, D.S.; WILLIAMS, P.H. (Ed.). **Advances in plant pathology**. London: Academic Press, 1990. p. 33-54.

LAMB, D.; ERSKINE, P.D.; PARROTTA, J.A. Restoration of degraded tropical forest landscapes. **Science**, Washington, v. 310, p. 1628–1632, 2005.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, New Brunswick, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.

LEDGARD, S.F.; MORTON, R.; FRENEY, J.R.; BERGERSEN, F.J. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plants in the <sup>15</sup>N dilution measurement of N<sub>2</sub> fixation: derivation of the method. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 317–321, 1985.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.). **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577 p.

LODWIG, E.M.; HOSIE, A.H.F.; BOURDÉS, A.; FINDLAY, K.; ALLAWAY, D.; KARUNAKARAN, R.; DOWNIE, J.A.; POOLE, P.S. Amino acid cycling drives nitrogen fixation in the legume–Rhizobium symbiosis. **Nature**, London, v. 422, p. 722–726, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras** – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998. v. 1.

LOTT, W.L.; NERY, J.P.; GALLO, J.R.; MEDCALF, J.C. Leaf analysis technique in coffee research. **IBEC Research Institute Bulletin**, Barcelona, v. 2, n. 9, p. 21-24, 1956.

MARCARELLI, A.M.; WURTSBAUGH, W.A. Effects of upstream lakes and nutrient limitation on periphytic biomass and nitrogen fixation in oligotrophic, subalpine streams. **Freshwater Biology**, Oxford, v. 52, p. 2211-25, 2007.

MASCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic Press, 1986. 674 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1995. 902 p.

MARTINELLI, L.A.; PICCOLO, M.C.; TOWNSEND, A.R.; VITOUSEK, P.M.; CUEVAS, E.; MCDOWELL, W.H.; ROBERTSON, G.P.; SANTOS, O.C.; TRESEDER, K. Nitrogen stable isotopic composition of leaves and soil: Tropical versus temperate forests. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, n. 1-3, p. 45-65, 1999.

MARIOTTI, A. Atmospheric nitrogen is a reliable standard for natural  $^{15}\text{N}$  abundance measurements. **Nature**, London, v. 303, p. 685-687, 1983.

MCNABB, D.H.; GEIST, J.M. Acetylene reduction assay of symbiotic  $\text{N}_2$  fixation under field condition. **Ecology**, Brooklyn, v. 60, n. 5, p. 1070-1072, 1979.

MCAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE-ARANGO, H.; WOODHOUSE JUNIOR, W.W. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by  $^{15}\text{N}$ . **Agronomy Journal**, Madison, v. 50, p. 334-337, 1958.

MCKEY, D. Legume and nitrogen: The evolutionary ecology of a nitrogendemanding lifestyle. In: SPRENT, J. I.; MCKEY, D. (Ed.). **Advances in legume systematic**. 5. The nitrogen factor. Kew: Royal Botanic Gardens, 1994. p. 211-228.

MELILLO, J.M. Carbon and Nitrogen interactions in the terrestrial biosphere: anthropogenic effects. In: WALKER, B.; STEFFEN, W. (Ed). **Global change and terrestrial ecosystems**. Cambridge: University Press, 1996. p. 431-450. (IGBP Book Series, 2).

MENDES FILHO, P.F.; VASCONCELLOS, R.L.F.; PAULA, A.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Evaluating the potential of forest species under microbial management for the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 208, n. 1-4, p. 79-89, 2010.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; MURAOKA, T.; CARMO, C.A.F.S.; MELLO, W.J. Análises químicas de tecido vegetal. In: SILVA, F.C. (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 1999. cap. 4, p. 171-223.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E.J.B.N. Dependência micorrízica de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. sob doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 905-912, 2002.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, M.F. da; FARIA, S.M. de. Occurrence of nodulation in Legume species in the Amazon Region of Brazil. **New Phytologist**, London, v. 121, n. 4, p. 563-570, 1992.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Growth, nodulation and arbuscular mycorrhizal colonization of four woody legumes in a low fertility soil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, RJ. **Abstracts...** Angra dos Reis, RJ, 1995. p. 164-165.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NARDOTO, G.B.; OMETTO, J.P.H.B.; EHLERINGER, J.R.; BASTAMANTE, M.M.C.; MARTINELLI, L.A. Understanding the influences of spatial patterns on N availability within the Brazilian Amazon Forest. **Ecosystems**, New York, v. 11, n. 8, p. 1234–1246, 2008.

NEWSHAM, K. K.; FITTER, A. H.; WATKINSON, A. R. Multifunctionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizae. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 10, n. 10, p. 407-411, 1995.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth and phosphorus uptake in mycorrhizal rangpur lime seedlings under different levels of phosphorus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 93-99, 2006.

NORBY, R.J.; JACKSON R. Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective. Review. **New Phytologist**, London, v. 147, p. 3-12, 2000.

OLIVEIRA, J.B. **Solos do estado de São Paulo**: descrição das classes registradas no mapa pedológico. Campinas: IAC, 1999. 112 p. (Boletim Científico, 45).

OMETTO, J.P.; EHLERINGER, J.R.; DOMINGUES, T.F.; BERRY, J.A.; ISHIDA, F.Y.; MAZZI, E.; HIGUCHI, N.; FLANAGAN, L.B.; NARDOTO, G.B.; MARTINELLI, L.A. The stable carbon isotope and nitrogen isotopic composition of vegetation in tropical forests of the Amazon region, Brazil. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 251-274, 2006.

PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; RERKASEM B.; HERRIDGE, D.F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989. 76 p. (ACIAR Monograph, 11).

POOLE, P.S.; ALLAWAY, D. Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobium. **Advances in Microbial Physiology**, v. 43, p. 117–163, 2000.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J.O.; SANTOS, J.G.D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 413-424, 2006.

QUESADA, D.M. **Parâmetros quantitativos e qualitativos das biomassa de genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com potencial para uso energético, na**

**forma de carvão vegetal.** 2005. 65 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

REED, S.C.; CLEVELAND, C.C.; TOWNSEND, A.R. Tree species control rates of free-living nitrogen fixation in a tropical rain forest. **Ecology**, Brooklyn, v. 89, n. 10, p. 2924-2934, 2008.

REICH, P.B.; ELLSWORTH, D.S.; WALTERS, M.B.; VOSE, J.M.; GRESHAM, C.; VOLIN, J.C.; BOWMAN, W.D. Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. **Ecology**, Brooklyn, v. 80, n. 6, p.1955–1969. 1999.

RESH, S.C.; BINKLEY, D.; PARROTA, J.A. Greater soil carbon sequestration under nitrogen-fixing trees compared with *Eucalyptus* species. **Ecosystems**, New York, v.5, p.217-231, 2002.

RIBEIRO JUNIOR, W.Q.; RAMOS, M.L.G. Fixação biológica de nitrogênio em espécies para adubação verde. In: CARVALHO, A.M.; AMABILE, R.F. **Cerrado: adubação verde.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. 369 p.

RIBET, J.; DREVON, J.J. The phosphorus requirement of N<sub>2</sub>-fixing and urea-fed *Acacia mangium*. **New Phytologist**, London, v. 132, p. 383-390, 1996.

ROBERTSON, G.P.; ROSSWALL, T. Nitrogen in west Africa: the regional cycle. **Ecological Monographs**, Durham, v. 56, p. 43-72, 1986.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R.R.; LEITÃO-FILHO, H. (Ed.). **Matas ciliares: conservação e recuperação.** 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; FAPESP, 2004. cap. 15, p. 235-247.

ROGGY, J.C.; PRÉVOST, M.F.; GOUBIERE, F.; CASABIANCA, H.; GARBAYE, J.; DOMENACJ, A.M. Leaf natural <sup>15</sup>N abundance and total N concentration as potential indicators of plant N nutrition in legumes and pioneer species in a rain forest of French Guiana. **Oecologia**, Berlin, v. 120, p. 171-182, 1999.

SANGINGA, N.; MULONGOY, K.; AYANABA, A. Effectivity of indigenous rhizobia for nodulation and early nitrogen fixation with *Leucaena leucocephala* grown in Nigerian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 231-235, 1989.

SANGINGA, N.; DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F.; BOWEN, G.D. Phosphorus requirements and nitrogen accumulation by N<sub>2</sub>-fixing and non-N<sub>2</sub> fixing leguminous trees growing in low P soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 20, p. 205-211, 1995.

SAWYER, N.A.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, J.W.G. Utilisation of inorganic and organic phosphorus sources by isolates of *Amanita muscaria* and *Amanita* species native to temperate eastern Australia. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 51, p. 151-158, 2003.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N<sub>2</sub> fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 13, p. 699-756, 1986.

SCHIAVO, J.A.; MARTINS, M.A. Produção de mudas de acácia colonizadas com micorrizas e rizóbio em diferentes recipientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 2, p. 173-178, 2003.

SCHMIDT, S.; STEWART, G.R.; ASHWATH, N. Monitoring plant physiological characteristics to evaluate mine site revegetation: A case study from the wet-dry tropics of northern Australia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 215, p. 73-84, 1999.

SCHOLLHORN, R.; BURRIS, R.H. Study of the intermediates in nitrogen fixation. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 25, p. 710, 1966.

SER. SOCIETY FOR ECOLOGICAL RESTORATION INTERNATIONAL SCIENCE & POLICY WORKING GROUP. **The SER International Primer on Ecological Restoration**. 2. ed. Tucson: Society for Ecological Restoration International, 2004. 13 p. Disponível em: <www.ser.org>. Acesso em: 6 jul. 2010.

SIDDIQUE, I.; ENGEL, V.L.; PARROTTA, J.A.; LAMB, D.; NARDOTO, G.B.; OMETTO, J.P.H.B.; MARTINELLI, L.A.; SCHMIDT, S. Dominance of legume trees alters nutrient relations in mixed species forest restoration plantings within seven years. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 88, n. 1, p. 89-101, 2008.

SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Influência do tipo de solo do fungo micorrízico vesículo-arbuscular no desenvolvimento de três cultivares de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 11, p. 37-44, 1987a.

SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Efeito do fósforo e da micorrizavesículo-arbuscular na simbiose Rhisobium-feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 11, p. 31-36, 1987b.

SILVEIRA, A.P.D. Micorriza. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: SBCS, 1992. p. 257-282.

SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S.; SILVA, L.R.C.; LOMBARDI, M.L.C.O.; CARDOSO, E.J.B.N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento de plantas em feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, p. 205-211, 1995.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JUNIOR, O.J. The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R.; PANDEY, S.; SILVA, A.F. (Ed). **International symposium on environmental stress: Maize in perspective**. México: CIMMVT; UNDP, 1995. 449 p.

SIQUEIRA, J.O.; SAGGIN-JUNIOR, O.J. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of Brazilian native wood species. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 11, p. 245-255, 2001.

SIQUEIRA, J.O.; CARNEIRO, M.A.C.; CURI, N.; ROSADO, S.C.S.; DAVIDE, A.C. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 107, p. 241-252, 1998.

SMITH, F.A.; SMITH, S.E. Mutualism and parasitism: Diversity in function and structure in the “arbuscular” (VA) mycorrhizal symbiosis. **Advances in Botanical Research**, London, v. 22, p. 1-43, 1996.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3. ed. London: Academic Press, 2008. 787 p.

SOARES, P.G. **Efeito da inoculação com rizóbio no estabelecimento, crescimento inicial e abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas plantadas por semeadura direta**. 2007. 69 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SOARES, P.G.; RODRIGUES, R.R. Semeadura direta de leguminosas florestais: efeito da inoculação com rizóbio na emergência de plântulas e crescimento inicial no campo. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 36, n. 78, p. 115-121, 2008.

SOLBRIG, O.T. The diversity of the savanna ecosystem. In: SOLBRIG, O.T.; MDEINA, E.; SILVA, J.A. (Ed.). **Biodiversity and savanna ecosystem processes**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1996. p. 1-27.

SORREANO, M.C.M. **Avaliação da exigência nutricional na fase inicial do crescimento de espécies florestais nativas**. 2006. 296p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

SOUZA MOREIRA, F.M.; DA SILVA, M.F.; DE FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, London, v. 121, p. 563–570, 1992.

SOUZA, F.A.; SILVA, E.M.R. Micorrizas arbusculares na revegetação de áreas degradadas. In: SIQUEIRA, J.O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: UFLa, 1996. p. 255-290.

SPRENT, J.I. Legume trees and shrubs in the tropics:  $\text{N}_2$  fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4-5, p. 401-407, 1995.

SPRENT, J.I. Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Zurich, v. 2, p. 149–162, 1999.

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. Kew: The Cromwell Press, 2001. 146 p.

SPRENT, J.I. Mutual sanction. *Nature*, London, v. 422, p.672-674, 2003

SPRENT J.I. Nodulated legume trees. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry and the environment**. Heidelberg: Springer, 2005. p. 113-141.

SPRENT, J.I.; JAMES, E.K. Legume Evolution: Where Do Nodules and Mycorrhizas Fit In? **Plant Physiology**, v. 144, p. 575–581, 2007

STACEY, G.; LIBAULT, M.; BRECHENMACHER, L.; WAN, J.; MAY, G.D. Genetics and functional genomics of legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 110-121, 2006.

STATSOFT, INC. STATISTICA. **Statistica 9.0**. 2010. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>.

STOCK, J.B.; STOCK, A.M.; MOTTONEN, J.M. Signal Transduction in Bacteria. **Nature**, London, v. 344, n. 6265, p. 395-400, 1990.

STURMER, S.L.; SIQUEIRA, J.O. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazilian ecosystems. In: MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI-Publishing, 2006. p. 206-236.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; OLIVEIRA, L.A.; PODESTÁ FILHO, J.A.; St.JOHN, T.V. Nodulation of legumes, nitrogenase activity of roots and occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. in representative soils of Central Amazonia. **Agro-Ecosystems**, Amsterdam, v. 6, p. 249-266, 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummings Publishing, 1991. 565 p.

TELES, C.S.; SILVA, M.F.; SOUZA, F.A.; FRANCO, A.A. **Influência da inoculação com fungos micorrízicos e níveis crescentes de P no crescimento inicial do Taxi dos Campos (*Sclerolobium paniculatum* Vogel)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 4 p. (Comunicado Técnico, 34).

TRIVELIN, P.C.O.; LARA CABEZAS, W.A.R.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K. Evaluation of a N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Sciencia Agricola**, Piracicaba, v. 51, p. 226-234, 1994.

TRIVELIN, P.C.O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: Três casos estudados com o uso do traçador <sup>15</sup>N**. 2000. 143 p. Tese (Livre-Docência) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, p. 131-138, 1993.

VERMA, D.P.S.; BAL, A.K. Intracellular site of synthesis and localization of leghemoglobin in root nodule. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 73, p. 3843-3847, 1976.

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.P.; WYSS, U.; PICHE, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, n. 12, p. 5004-5007, 1998.

VITOUSEK, P.M.; HOWARTH, R.W. Nitrogen limitation on land and in the sea - how can it occur? **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 3, p. 87-115, 1991.

VITOUSEK, P.M. Potential nitrogen fixation during primary succession in Hawaii Volcanoes National Park. **Biotropica**, Washington, v. 26, p. 234–240, 1994.

VITOUSEK, P.M.; FARRINGTON, H. Nutrient limitation and soil development: Experimental test of a biogeochemical theory. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 37, n. 1, p. 63–75, 1997.

VITOUSEK, P.M.; HOBBIIE, S. Heterotrophic nitrogen fixation in decomposing litter: patterns and regulation. **Ecology**, Brooklyn, v. 81, n. 9, p. 2366–2376, 2000.

VITOUSEK, P.M.; FIELD, C.B. Input/output balances and nitrogen limitation in terrestrial ecosystem. In: SCHULZE, E.-D.; HEIMANN, M.; HARRISON, S.; HOLLAND, E.; LLOYD, J.; PRENTICE, I.C.; SCHIMEL, D. (Ed.). **Global biogeochemical cycles in the climate system**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 217–225.

VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E.B.; SPRENT, J.I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 57, p. 1–45, 2002.

VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SAITO, S.M.T.; MATSUI, E. <sup>15</sup>N as a tool in biological nitrogen research. In: GRAHAM, P.H.; HARRIS S C (Eds.). **BNF Technology for Tropical Agriculture**. Cali: CIAT, 1982. p. 575–592.

ZANGARO, W.; BONONI, V.L.R.; TRUFEN, S.B. Mycorrhizal dependency, inoculum potential and habitat preference of native woody species in South Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 16, p. 603–621, 2000.

ZANGARO, W.; NISIZAKI, S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B.; NAKANO, E.M. Micorriza arbuscular em espécies arbóreas nativas da bacia do rio Tibagi, Paraná. **Cerne**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 77–87, 2002.

ZANGARO, W.; NISIZAKI, S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B.; NAKANO, E.M. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 19, p. 315–324, 2003.

WALI, M.K. Ecological succession and the rehabilitation of disturbed terrestrial ecosystems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 213, p. 195–220, 1999.

WHITMORE, T.C. Forty years of rain forest ecology: 1948–1988 in Perspective. **Geojournal**, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 347–360, 1989.

WHITMORE, T.C. A review of some aspects of tropical rain forest seedling ecology with suggestions for further enquiry. In: SWAINE, M.D. (Ed.). **The ecology of tropical forest tree seedlings**. Paris: UNESCO; The Parthenon Publishing Group, 1996. p. 3–39. (Man and Biosphere Series, 18).

YONG, T.P. Restoration ecology and conservation biology. **Biological Conservation**, Barking, v. 92, p. 73–83, 2000.

**ANEXOS**

Anexo A – Altura média (médias  $\pm$  1 desvio padrão) das leguminosas sob três diferentes tratamentos medidas mensalmente durante os seis meses de experimento em casa de vegetação (n=4)

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses (cm)	5 meses	6 meses	
<i>A. polyphylla</i>	Controle (Sem inoculação)	0	4,3 $\pm$ 1,5	7,5 $\pm$ 2,6	12,8 $\pm$ 5,0	13,0 $\pm$ 5,3	21,8 $\pm$ 12,6	36,2 $\pm$ 28,4	
		30	5,2 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,6	18,1 $\pm$ 5,6	21,7 $\pm$ 6,8	44,4 $\pm$ 23,5	67,2 $\pm$ 36,7	
		60	5,6 $\pm$ 0,8	8,2 $\pm$ 2,5	10,6 $\pm$ 3,7	17,2 $\pm$ 5,9	48,0 $\pm$ 12,0	77,4 $\pm$ 17,2	
		120	5,5 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 2,4	15,4 $\pm$ 3,8	22,5 $\pm$ 11,8	49,7 $\pm$ 18,2	106,4 $\pm$ 40,7	
	Rizóbio	0	5,5 $\pm$ 2,3	6,6 $\pm$ 2,1	7,6 $\pm$ 1,9	7,8 $\pm$ 3,0	22,8 $\pm$ 21,5	41,7 $\pm$ 27,7	
		30*	5,3 $\pm$ 0,7	6,7 $\pm$ 1,1	8,2 $\pm$ 2,4	9,7 $\pm$ 4,3	24,0 $\pm$ 12,6	40,3 $\pm$ 9,9	
		60	6,9 $\pm$ 2,5	8,3 $\pm$ 1,8	10,4 $\pm$ 2,8	14,7 $\pm$ 3,5	43,5 $\pm$ 21,7	74,7 $\pm$ 30,2	
		120	5,2 $\pm$ 1,9	7,9 $\pm$ 1,0	13,0 $\pm$ 9,4	20,0 $\pm$ 13,5	53,9 $\pm$ 28,7	97,7 $\pm$ 42,2	
	Rizóbio + FMAs	0*	4,5 $\pm$ 0,5	7,2 $\pm$ 2,5	8,5 $\pm$ 3,8	9,0 $\pm$ 4,6	21,8 $\pm$ 21,8	39,5 $\pm$ 31,4	
		30	4,6 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,8	8,4 $\pm$ 1,8	15,4 $\pm$ 8,6	54,4 $\pm$ 37,0	75,2 $\pm$ 29,7	
		60	5,4 $\pm$ 1,5	6,7 $\pm$ 2,4	11,7 $\pm$ 4,9	20,2 $\pm$ 13,9	54,1 $\pm$ 50,8	74,9 $\pm$ 69,3	
		120	4,3 $\pm$ 2,0	7,2 $\pm$ 2,3	9,0 $\pm$ 1,7	16,8 $\pm$ 7,1	57,4 $\pm$ 17,1	125,5 $\pm$ 40,5	
	<i>E. contortisiliquum</i>	Controle (Sem inoculação)	0	16,4 $\pm$ 0,4	18,7 $\pm$ 2,3	19,6 $\pm$ 2,7	22,7 $\pm$ 4,8	37,0 $\pm$ 13,5	59,6 $\pm$ 21,0
			30	12,1 $\pm$ 2,3	14,7 $\pm$ 2,1	18,8 $\pm$ 4,3	26,7 $\pm$ 9,9	52,7 $\pm$ 20,5	72,9 $\pm$ 13,9
			60	18,1 $\pm$ 1,4	19,9 $\pm$ 1,6	23,1 $\pm$ 1,5	35,9 $\pm$ 11,3	78,6 $\pm$ 12,1	98,6 $\pm$ 8,5
			120	14,2 $\pm$ 3,8	17,5 $\pm$ 1,9	27,6 $\pm$ 5,3	51,2 $\pm$ 14,5	105,6 $\pm$ 23,0	142,6 $\pm$ 23,3
Rizóbio		0	18,1 $\pm$ 1,6	20,0 $\pm$ 1,1	21,0 $\pm$ 1,4	23,7 $\pm$ 4,5	31,1 $\pm$ 7,0	60,4 $\pm$ 31,2	
		30	15,6 $\pm$ 2,6	18,1 $\pm$ 2,8	23,6 $\pm$ 5,7	37,7 $\pm$ 14,1	54,7 $\pm$ 11,3	73,9 $\pm$ 30,5	
		60	16,2 $\pm$ 2,8	18,7 $\pm$ 3,6	25,9 $\pm$ 5,0	45,0 $\pm$ 13,3	83,4 $\pm$ 18,3	92,1 $\pm$ 19,4	
		120	15,7 $\pm$ 1,9	18,6 $\pm$ 3,0	27,7 $\pm$ 7,8	51,4 $\pm$ 15,5	88,5 $\pm$ 20,9	118,5 $\pm$ 9,6	
Rizóbio + FMAs		0	15,1 $\pm$ 1,5	16,5 $\pm$ 1,5	19,7 $\pm$ 4,4	26,7 $\pm$ 4,5	52,3 $\pm$ 19,6	84,9 $\pm$ 39,0	
		30	17,0 $\pm$ 4,4	18,2 $\pm$ 4,7	18,7 $\pm$ 4,4	28,7 $\pm$ 13,5	61,6 $\pm$ 18,5	68,1 $\pm$ 22,5	
		60	17,6 $\pm$ 2,8	21,1 $\pm$ 1,8	32,2 $\pm$ 3,1	75,7 $\pm$ 9,4	110,2 $\pm$ 21,9	111,5 $\pm$ 11,6	
		120	14,4 $\pm$ 1,4	18,1 $\pm$ 1,0	36,8 $\pm$ 4,2	79,4 $\pm$ 11,3	120,0 $\pm$ 3,4	125,2 $\pm$ 9,2	
<i>E. speciosa</i>	Controle	0	9,0 $\pm$ 2,5	10,0 $\pm$ 2,7	13,2 $\pm$ 5,0	16,2 $\pm$ 5,0	20,1 $\pm$ 7,4	28,4 $\pm$ 12,5	
	(Sem inoculação)	30	10,6 $\pm$ 3,7	11,9 $\pm$ 3,7	14,6 $\pm$ 4,4	18,8 $\pm$ 4,9	25,2 $\pm$ 4,3	28,9 $\pm$ 7,75	

continua

continuação

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	1 mês	2 meses	3 meses	4 meses (cm)	5 meses	6 meses	
<i>E. speciosa</i>	Controle (Sem inoculação)	60	11,3±1,7	12,8±0,7	19,4±2,4	27,9±2,7	36,7±7,5	41,0±8,8	
		120	11,6±3,6	14,1±4,5	20,4±8,1	33,5±15,0	43,0±18,9	48,6±21,8	
	Rizóbio	0	11,8±3,2	13,3±4,0	16,2±4,5	19,3±6,7	29,5±12,7	38,7±15,3	
		30	10,6±1,3	11,4±1,6	15,4±2,2	19,7±3,8	23,4±3,7	28,4±7,3	
		60	8,7±1,5	11,0±2,0	16,2±2,8	23,1±2,3	29,4±4,9	35,0±5,7	
		120	12,3±2,7	14,4±3,0	20,5±3,3	28,7±4,2	40,6±6,4	47,2±9,7	
	Rizóbio + FMAs	0	9,9±2,9	12,0±2,7	15,6±3,9	19,0±5,7	24,5±8,0	33,6±18,7	
		30	8,4±2,0	10,4±2,5	17,4±3,4	22,9±4,1	27,0±2,9	33,0±6,2	
		60	10,3±2,4	11,6±2,7	17,0±3,0	23,2±2,8	27,0±5,2	32,6±6,2	
		120	14,2±2,2	16,6±1,9	23,1±1,6	30,5±1,6	40,4±4,8	47,2±6,5	
	<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Controle (Sem inoculação)	0	11,7±2,5	12,6±1,3	13,2±1,5	19,4±7,0	42,6±14,5	57,7±11,4
			30	10,7±2,4	11,2±2,4	19,6±9,2	34,4±20,0	68,4±30,5	87,7±37,8
60			10,2±2,9	11,4±2,9	17,2±8,0	32,2±18,1	57,9±28,3	93,5±40,3	
120			10,9±2,4	12,2±3,1	17,6±6,2	40,7±18,9	96,7±33,4	142,0±26,8	
Rizóbio		0	10,3±2,0	11,5±1,8	11,9±2,3	19,6±11,5	43,1±18,8	56,7±23,1	
		30	9,4±3,3	11,2±2,0	18,6±3,0	35,4±6,9	69,7±21,9	89,7±29,5	
		60*	10,4±3,2	11,3±2,5	20,7±7,3	40,8±27,8	81,8±34,6	115,0±30,3	
		120	10,0±1,1	10,7±1,8	18,2±5,5	47,5±15,2	102,4±11,1	139,7±14,4	
Rizóbio + FMAs		0	10,2±1,7	11,3±2,7	13,4±6,8	25,6±14,2	41,1±14,4	57,7±13,6	
		30	12,0±3,8	12,2±3,3	25,2±4,8	41,9±8,1	62,1±15,7	85,5±17,0	
		60	10,8±1,7	11,1±1,6	27,2±2,3	58,0±13,4	99,5±8,4	130,0±10,9	
		120	12,8±0,8	13,0±0,8	23,1±2,5	53,4±8,4	104,2±3,6	132,4±9,5	

\*n = 3

Anexo B – Diâmetro médio (médias  $\pm$  1 desvio padrão) das leguminosas sob três diferentes tratamentos medidos mensalmente a partir do segundo mês de experimento até o sexto mês (n=4)

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	2 meses	3 meses	4 meses	5 meses	6 meses	
			(mm)					
<i>A. polyphylla</i> **	Controle (Sem inoculação)	0		1,8 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,7	2,6 $\pm$ 0,8	2,9 $\pm$ 0,8	
		30		2,1 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,4	3,1 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 1,1	
		60		1,7 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,4	
		120		1,7 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,5	3,3 $\pm$ 0,9	5,0 $\pm$ 1,2	
	Rizóbio	0		1,7 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,3	2,6 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,9	
		30*		1,8 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,5	3,1 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 0,4	
		60		1,5 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,6	4,0 $\pm$ 0,8	
		120		1,6 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 1,0	4,9 $\pm$ 2,4	
	Rizóbio + FMAs	0*		1,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 1,3	3,2 $\pm$ 0,6	
		30		1,5 $\pm$ 0,3	3,0 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 1,6	5,0 $\pm$ 1,8	
		60		1,6 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 1,9	6,0 $\pm$ 3,2	
		120		1,6 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,3	5,6 $\pm$ 0,7	
	<i>E. contortisiliquum</i>	Controle (Sem inoculação)	0	2,9 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,1	5,2 $\pm$ 0,7	6,8 $\pm$ 1,4
			30	2,1 $\pm$ 0,5	3,4 $\pm$ 0,6	4,0 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 1,5	7,7 $\pm$ 1,2
			60	2,9 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 0,4	9,8 $\pm$ 0,4
			120	2,9 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,3	9,8 $\pm$ 0,8	11,4 $\pm$ 1,4
Rizóbio		0	3,2 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2	4,4 $\pm$ 0,6	5,7 $\pm$ 0,6	7,0 $\pm$ 1,2	
		30	2,6 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 1,0	6,8 $\pm$ 1,7	7,7 $\pm$ 2,2	
		60	3,0 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,5	8,7 $\pm$ 0,7	9,9 $\pm$ 0,6	
		120	3,1 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 1,3	9,3 $\pm$ 0,8	11,4 $\pm$ 0,6	
Rizóbio+FMAs		0	2,7 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 0,5	7,0 $\pm$ 1,3	9,0 $\pm$ 2,1	
		30	2,9 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,7	6,4 $\pm$ 0,7	7,9 $\pm$ 0,2	
		60	3,0 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,8	10,0 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 1,0	

continua

continuação

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	2 meses	3 meses	4 meses (mm)	5 meses	6 meses	
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio+FMAs	120	3,3±0,3	5,5±0,5	8,0±0,6	11,6±0,7	13,0±0,7	
<i>E. speciosa</i> **	Controle (Sem inoculação)	0		6,5±1,3	8,2±1,2	10,6±1,9	11,9±2,1	
		30		8,3±2,1	10,3±3,2	13,3±3,4	14,0±3,5	
		60		8,2±1,0	11,0±1,7	13,0±2,1	14,7±1,8	
		120		8,4±1,7	12,3±2,1	16,5±2,7	19,4±2,9	
	Rizóbio	0			8,5±1,5	9,6±1,5	12,0±3,0	14,4±4,2
		30			8,8±0,8	11,0±1,5	13,5±2,4	15,0±3,1
		60			10,1±1,3	13,4±1,4	18,4±1,2	20,5±2,1
		120			10,2±2,2	13,2±2,4	17,4±1,8	19,4±2,2
	Rizóbio+FMAs	0			8,4±1,6	10,5±2,5	12,9±4,3	15,0±6,5
		30			7,7±0,9	11,4±2,3	14,0±2,4	15,6±2,1
		60			9,2±1,9	13,0±2,6	17,3±4,3	19,1±5,7
		120			8,7±1,6	9,2±3,9	16,1±1,4	17,7±1,3
<i>M. caesalpinifolia</i>	Controle (Sem inoculação)	0	1,9±0,2	2,9±0,7	3,2±0,1	4,2±0,6	4,6±0,7	
		30	1,8±0,2	2,9±0,5	3,3±1,0	4,3±1,3	5,5±1,5	
		60	1,7±0,1	2,2±0,4	2,9±0,4	4,6±1,0	6,4±1,3	
		120	1,5±0,3	2,3±0,3	3,5±0,6	5,3±1,5	6,9±0,9	
	Rizóbio	0	1,8±0,3	2,1±0,4	3,3±0,5	4,2±0,9	4,6±0,8	
		30	1,6±0,2	2,4±0,3	3,1±0,5	4,6±0,3	5,8±0,4	
		60*	1,8±0,2	2,7±0,2	3,7±0,6	5,5±0,4	6,6±0,5	
		120	1,7±0,1	2,5±0,3	3,7±0,2	6,1±1,2	7,8±1,6	
	Rizóbio+FMAs	0	2,2±0,7	3,1±0,5	3,1±0,6	3,8±0,6	4,6±0,6	
		30	1,7±0,1	2,9±0,1	3,5±0,4	5,2±0,5	6,4±0,6	
		60	1,8±0,1	2,9±0,1	4,4±0,2	5,9±0,5	7,1±0,8	
		120	1,8±0,2	2,9±0,5	4,3±0,6	7,3±0,3	8,3±0,5	

\*n = 3; \*\* As espécies *A. polyphylla* e *E. speciosa* não foram medidas aos 2 meses de experimento.

Anexo C - Avaliação dos micronutrientes presentes nas quatro leguminosas ao seis meses após o plantio em casa de vegetação de acordo com seus tratamentos e doses de N: Cu (Cobre), Fe (Ferro), Mn (Manganês) e Zn (Zinco) (n=1)

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	Cu	Fe	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn	
<i>A. polyphylla</i>	Controle (Sem inoculação)	0	2,2	79,6	47,3	4,8	
		60	11,1	134,6	102,4	12,2	
		120	5,4	110,3	60,2	14,6	
	Rizóbio	0	4,3	170,0	39,1	15,6	
		30	2,1	102,6	88,8	12,0	
		60	7,2	119,3	97,5	11,1	
	Rizóbio + FMAs	120	4,8	38,7	108,7	14,5	
		30	4,8	102,3	51,7	17,4	
		60	2,1	66,0	39,9	6,6	
	<i>E. contortisiliquum</i>	Controle (Sem inoculação)	120	6,8	104,4	97,5	12,8
			0	6,6	117,8	120,3	17,2
			30	10,0	158,5	201,4	41,1
Rizóbio		60	7,9	105,4	51,5	21,3	
		120	6,8	109,6	162,8	18,7	
		0	6,6	192,9	87,5	22,0	
Rizóbio + FMAs		30	2,6	252,6	178,5	19,5	
		60	3,6	99,3	112,7	15,1	
		120	10,6	133,5	121,0	38,2	
<i>E. speciosa</i>		Controle (Sem inoculação)	0	4,2	153,0	58,0	16,2
			30	2,4	145,9	144,2	20,9
			60	7,4	87,3	151,3	44,6
	Rizóbio	120	2,4	156,2	196,8	29,3	
		0	28,4	112,4	98,6	32,2	
		30	52,1	232,7	180,9	33,1	
	Rizóbio + FMAs	60	62,6	189,0	210,8	32,2	
		120	39,7	466,8	90,9	87,0	
		0	18,8	165,2	79,9	27,7	
	<i>M. caesalpinifolia</i>	Controle (Sem inoculação)	30	24,0	164,5	143,2	38,9
			60	11,5	104,0	67,8	34,7
			120	8,9	155,5	60,4	23,4
Rizóbio		0	10,6	201,5	28,8	21,3	
		30	10,8	115,7	46,0	16,1	
		60	38,5	189,8	131,3	46,2	
Rizóbio + FMAs		120	11,9	166,1	71,5	19,0	
		0	6,4	99,9	38,6	17,7	
		30	5,1	83,0	41,5	7,1	
Rizóbio		60	5,0	66,4	49,8	12,2	
		120	4,3	65,7	23,4	14,2	
		0	8,2	109,9	82,1	19,8	
Rizóbio + FMAs	30	2,3	48,3	55,1	10,9		
	60	2,3	30,0	43,8	17,3		
	120	3,9	68,5	49,4	13,5		
Rizóbio + FMAs	0	9,8	105,7	83,2	19,4		
	30	3,1	39,6	62,6	15,0		
	60	8,2	65,0	57,2	29,2		
		120	3,6	58,9	61,9	9,0	

Anexo D – Razão C:N das leguminosas na dose zero de N sob diferentes tratamentos aos seis meses após o plantio em casa de vegetação (n=4)

<b>Espécies</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>C:N</b>
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	17,7
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	22,6
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	14,3
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	10,1
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	27,3
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	12,6
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	12,5
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	25,8
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs*	21,4
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	24,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	13,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	15,5
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	13,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	11,1
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	25,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	10,7
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	13,9
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	14,3
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	20,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	12,5
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	11,9
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	12,8
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	10,7
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	14,7
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	15,7
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	14,0
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	16,9
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	14,0
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	15,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	13,4
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	12,9
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	14,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	11,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	14,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	9,6
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	28,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	25,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	32,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	19,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	28,9
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	20,6

continua

continuação

<b>Espécies</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>C:N</b>
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	29,2
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	27,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	21,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	29,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	26,6
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	30,6

\*n=3

Anexo E – Valores isotópicos ( $\delta^{15}\text{N}$ ) da dose zero de N das leguminosas fixadoras de N (*E. contortisiliquum*, *E. speciosa* e *M. caesalpiniiifolia*) e da espécie referência (*A. polyphylla*) aos três, cinco e seis meses após plantio em casa de vegetação, sob três diferentes tratamentos

<b>Espécie</b>	<b>Tratamentos</b>	<b>3 meses</b>	<b>5 meses</b>	<b>6 meses</b>
		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)		
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	17,8*	19,4*	19,9
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	32,7	36,7	18,9
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação			39,8
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação			25,9
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	25,2	23,9	23,2
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	25,5	22,4	17,6
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio		29,1	18,2
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio			27,9
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	19,4	23,6	21,0
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	23,1	19,4	28,5
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs			13,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	41,1	27,1	2,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	62,0	14,3	16,7
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação		15,4	4,8
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação		19,0	3,7
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	72,9	32,6	6,5
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	62,3	16,5	1,0
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio		12,9	1,9
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio		24,4	7,3
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	57,0	25,9	2,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	47,4	42,5	0,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs		25,8	1,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs		9,0	7,4
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	18,7	10,3	15,7
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	38,6	17,8	6,1
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação		16,5	2,0
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação		26,8	3,3
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	64,0	19,1	1,3
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	46,1	23,7	3,6
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio		6,7	6,6
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio		15,0	15,3
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	68,2	52,5	27,5
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	57,0	8,7	1,3
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs		5,6	27,5
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs		48,5	0,2
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	44,7	25,5	6,3

continua

Espécie	Tratamentos	3 meses	continuação	
			5 meses	6 meses
			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	43,6	21,6	19,0
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação		21,8	12,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação			5,6
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	43,0	30,4	19,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	112,6	26,0	17,2
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio		19,5	8,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio		22,0	10,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	36,1	18,7	13,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs		16,6	28,3
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs		18,0	5,5
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs		28,5	6,2

\*dados não inseridos nos cálculos de %NPPfix (nitrogênio na planta proveniente da fixação)

Anexo F – Valores isotópicos (% em átomos de  $^{15}\text{N}$ ) das leguminosas fixadoras de N (*E. contortisiliquum*, *E. speciosa* e *M. caesalpinifolia*) e da espécie referência (*A. polyphylla*) aos três, cinco e seis meses após plantio em casa de vegetação, sob três diferentes tratamentos e doses de N

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 meses 5 meses 6 meses átomos de $^{15}\text{N}$ (%)		
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	30	1,5	2,5	2,4
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	30	2,1	2,3	2,4
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	30		2,6	1,6*
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	30			2,3
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	60	3,1	3,4	1,8
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	60	2,8	3,1	2,0
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	60		3,5	1,8
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	60		3,6	1,8
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	120	2,6	4,2	2,6
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	120	2,4	3,9	2,4
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	120		3,6	1,7*
<i>A. polyphylla</i>	Sem inoculação	120		3,9	2,0*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	30	1,6	2,3	1,9
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	30	1,6	2,5	1,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	30		2,3	1,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	60	3,0	3,4	1,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	60	3,1	3,3	1,8
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	60		3,0	2,6
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	60			1,5*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	120	3,0	3,2	2,1
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	120	2,4	3,8	1,4
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	120			1,5
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio	120			1,4
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,1	2,3	2,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,3	2,8	1,4*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	30		3,0	2,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	30			1,7*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	60	3,0	3,2	1,5*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	60	3,4	3,6	3,3
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	60		2,4*	3,3
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,4	1,5*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	120	2,8	4,1	1,4*
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	120	3,2	3,9	2,6
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	120		3,3	2,7
<i>A. polyphylla</i>	Rizóbio + FMAs	120		2,2*	1,8*
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	30	1,7	2,7	2,1

continua

continuação

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 meses	5 meses	6 meses
			átomos de <sup>15</sup> N (%)		
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	30	2,0	2,7	1,3
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	30		2,9	1,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	30		2,8	1,1
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	60	2,3	3,8	1,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	60	2,3	3,8	0,8
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	60		3,5	0,9
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	60		3,5	3,1
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	120	2,4	3,8	3,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	120	2,8	4,2	2,1
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	120		4,0	3,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Sem inoculação	120		4,3	2,1
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	30	2,4	2,9	2,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	30	2,1	2,1	0,5
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	30		2,5	2,0
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	30		3,0	
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	60	2,7	3,5	3,4
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	60	2,8	3,7	2,9
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	60		3,7	2,3
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	60		3,5	3,0
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	120	3,0	4,2	2,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	120	2,7	4,4	2,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	120		4,4	2,7
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio	120		4,3	
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,0	2,9	2,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,1	2,9	0,8
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	30		2,8	2,5
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	30		2,9	2,5
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	60	2,8	3,7	1,2
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	60	2,3	3,7	0,8
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,6	0,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,6	0,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	120	2,7	4,1	2,6
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	120	3,0	4,3	3,7
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	120		4,3	3,0
<i>E. contortisiliquum</i>	Rizóbio + FMAs	120		4,3	3,1
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	30	3,4	3,0	1,1
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	30	2,8	2,9	2,2
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	30		2,7	2,3
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	30		3,0	
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	60	3,1	3,2	2,8

continua

continuação

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 meses	5 meses	6 meses
			átomos de <sup>15</sup> N (%)		
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	60	3,5	2,9	1,3
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	60		2,7	3,0
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	60		2,4	1,2
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	120	2,6	4,3	2,4
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	120	3,7	4,3	3,7
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	120		4,3	3,0
<i>E. speciosa</i>	Sem inoculação	120		4,3	3,6
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	30	2,9	3,1	2,7
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	30	3,0	2,9	0,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	30		2,9	2,7
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	30		3,2	2,1
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	60	3,3	3,4	1,5
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	60	3,6	3,7	0,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	60		3,7	3,1
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	60		3,5	3,1
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	120	4,0	2,6	3,7
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	120	2,6	2,3	3,4
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	120		2,2	2,7
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio	120		2,1	3,3
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,9	3,1	2,3
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	30	3,1	3,3	1,5
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	30		2,9	1,6
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	30		3,0	0,6
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	60	3,8	3,8	1,5
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	60	3,7	3,8	3,2
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,7	0,6
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,3	1,7
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	120	2,9	2,0	3,1
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	120	3,7	1,8	3,8
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	120		4,2	3,2
<i>E. speciosa</i>	Rizóbio + FMAs	120		4,3	2,5
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	30	2,4	2,9	2,0
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	30	2,3	3,1	1,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	30		2,9	0,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	30		2,6	0,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	60	2,6	3,7	2,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	60		3,5	3,0
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	60		3,1	1,2
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	60		3,5	3,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	120		4,2	3,6

continua

continuação

Espécies	Tratamentos	Doses de N (mg kg solo <sup>-1</sup> )	3 meses 5 meses 6 meses		
			átomos de <sup>15</sup> N (%)		
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	120		4,1	3,5
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	120		4,2	2,3
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Sem inoculação	120	3,2	3,7	1,5
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	30	2,7	2,8	2,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	30	1,9	2,9	2,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	30		2,7	1,0
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	30		2,3	2,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	60	2,8	3,6	2,3
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	60	3,1	3,4	2,8
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	60		3,7	
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	120	2,9	3,2	3,5
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	120		2,9	3,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	120		4,1	2,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio	120		4,1	3,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,0	2,5	2,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	30	2,0	2,9	1,3
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	30		2,8	2,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	30		2,4	2,2
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	60	3,4	3,5	1,2
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	60	2,7	3,6	1,7
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,6	2,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	60		3,6	1,6
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	120	3,2	4,1	3,5
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	120	2,9	4,2	3,4
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	120		4,3	4,1
<i>M. caesalpiniiifolia</i>	Rizóbio + FMAs	120		4,3	3,7

\*dados não inseridos nos cálculos de %NPPfix (nitrogênio na planta proveniente da fixação)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)