

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

**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**

**Pablo Guenther Soares**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais, com opção em Conservação de Ecossistemas Florestais**

**Piracicaba  
2007**

Pablo Guenther Soares  
Engenheiro Florestal

**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**

Orientador:  
Prof. Dr. **RICARDO RIBEIRO RODRIGUES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Recursos Florestais, com opção em  
Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba  
2007**

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

Soares, Pablo Guenther

Efeito da inoculação com rizóbio no estabelecimento, crescimento inicial e abundância natural de <sup>15</sup>N em leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas plantadas por semeadura direta / Pablo Guenther Soares. - - Piracicaba, 2007.  
69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio 2. Fixação de nitrogênio 3. Florestas – Restauração  
4. Leguminosas 5. Matas ciliares 6. Nitrogênio 7. Semeadura I. Título

CDD 634.94

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

Este trabalho é dedicado a  
Bluma Guenther Soares,  
Mauro Lima Soares,  
Leonardo Bier de Cicco (*in memoriam*)  
e Johanna Döbereiner (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos a Otiniel Aleixo, Francisco Antonioli, Denis Araki, Maicon Araki, Geraldo de Arruda Jr., Claudinei Arsênio, Fabiano Balieiro, Fabiana Basso, Dyeme Bento, Milene Bianchi, Michele Bordini, Alice Braga, Pedro Brancalion, Luís Vicente Bufo, Plínio Camargo, Eduardo Campello, Thomaz Carvalho, Cintia Cavalcanti, Helena Chamma, Daiana Correa, Fernando Cunha, Ana Claudia Destefani, Carlos Tadeu Dias, Caio Esteves, Karine Faleiros, Diego Fernandes, Marina Fleury, Fabiana Fracassi, Avílio Franco, Flavia Gava, Catarina Germuts, André Godoy, Pedro Gonçalves, Ingo Isernhagen, João Jabur, Ana Catarina Jacovac, Milton Jarreta Jr., Vânia Korman, Renato Lima, Robson Lopes, Roriz Machado, Luís Martinelli, Aluisio Martins, Susian Martins, Sérgio Miana, Marcelo Moreira, Gabriela Nardoto, Pedro Nóbrega, Ana Novembre, Ana Oliveira, Mariana Pardi, Edu Pedrasse, Rose Pereira, Maria Antonia Perez, Sônia Piedade, Fátima Piña-Rodrigues, Alexander Resende, Lúcia Richa, Alessandro Riffel, Ricardo Rodrigues, Marcelo Savoy, Eliane da Silva, Telmo da Silva, Bluma Soares, Gabriel Soares, Mariana Soares, Mauro Soares, Kathia Sonoda, Salim de Souza Jr., Simão de Souza, Gabriela Tavares, Ricardo Viani, Vivian Vilela, Carolina Wendel, Cristina Yuri, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Agrobiologia (Seropédica - RJ); Usina Vale do Rosário (São Joaquim da Barra - SP), incluindo Edson (viveiro), Cido, Lúcio, Daniel e todos os trabalhadores do setor de reflorestamento desta empresa; estagiários, funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP; alunos, professores e funcionários do Laboratório de Tecnologia de Sementes do Depto. de Produção Vegetal ESALQ/USP; Hotel Casa Grande (Orlândia - SP), Hotel Garcia (Morro Agudo - SP), Bioflora Comercial Ltda., Camará Mudas Florestais, Seção de Normalização da Documentação da Biblioteca Central ESALQ/USP, Associação Brasileira de Estudantes de Engenharia Florestal – ABEEF, Centro Acadêmico de Engenharia Florestal – CAEF ESALQ/USP, Centro Acadêmico “Luiz de Queiroz” – CALQ, Fender Instrumentos Musicais, repúblicas Antena, Brejão e Mata-Burro, todos os alunos de graduação em Engenharia Florestal, todos os Pós-graduandos em Recursos Florestais e Ecologia de Agroecossistemas e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Que Deus os acompanhe.

“Nosso povo viveu durante alguns milhares de anos aqui. Não tínhamos nenhuma escola de engenharia florestal aqui não. Não tínhamos manejo de floresta.”

**Aílton Krenak**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	07
1 INTRODUÇÃO.....	09
1.1 Revisão Bibliográfica.....	11
Referências.....	19
2 ESTABELECIMENTO E CRESCIMENTO INICIAL DE LEGUMINOSAS (FABACEAE) ARBÓREAS NATIVAS PLANTADAS POR SEMEADURA DIRETA: EFEITO DA INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	24
2.1 Introdução.....	25
2.2 Material e Métodos.....	27
2.3 Resultados.....	30
2.4 Discussão.....	33
Referências.....	36
3 EFEITO DA INOCULAÇÃO COM RIZÓBIO NA ABUNDÂNCIA NATURAL DE <sup>15</sup> N DE LEGUMINOSAS (FABACEAE) ARBÓREAS NATIVAS PLANTADAS POR SEMEADURA DIRETA.....	39
Resumo.....	39
Abstract.....	40
3.1 Introdução.....	41
3.2 Material e Métodos.....	43
3.2.1 Área de Estudo.....	43
3.2.2 Implantação do Experimento.....	44
3.2.3 Determinação Isotópica de N e Concentração de N e C total em Planta e Solo.....	45
3.3 Resultados.....	47
3.4 Discussão.....	51
Referências.....	58
APÊNDICE.....	62
ANEXO.....	65

## RESUMO

### **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**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação com rizóbio no estabelecimento, crescimento inicial e em alguns aspectos da dinâmica de N em folhas de leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas plantadas por semeadura direta no campo, em área de mata ciliar no Estado de São Paulo. Foi avaliada a emergência de plântulas (% em relação ao número de sementes plantadas) até os 3 meses após a semeadura (MAS) e o crescimento em altura aos 13 MAS. O fracionamento isotópico do N foliar também foi avaliado, pelo método da abundância natural do  $^{15}\text{N}$ , além da concentração de N e a razão C/N foliar. *Acacia polyphylla* foi usada como planta-referência não-fixadora de  $\text{N}_2$ . Em relação ao desenvolvimento inicial, houve grande variação entre as espécies estudadas. *Acacia polyphylla* e *Enterolobium contortisiliquum* apresentaram taxa de germinação mediana e rápido crescimento. *Mimosa bimucronata* e *Parapiptadenia rigida* tiveram crescimento relativamente rápido, porém baixo potencial germinativo. *Erythrina speciosa* e *Poecilanthe parviflora*, com crescimento lento, apresentaram germinação elevada no campo. As espécies fixadoras de  $\text{N}_2$  mostraram  $\delta^{15}\text{N}$  médio de 2,7‰, enquanto que a referência *Acacia polyphylla* se mostrou cerca de 4,0‰ mais enriquecida em  $^{15}\text{N}$ . *Erythrina speciosa* e *Ormosia arborea* apresentaram os menores valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , enquanto que *Parapiptadenia rigida*, enriquecida em  $^{15}\text{N}$ , mostrou estar obtendo N exclusivamente do solo. *Poecilanthe parviflora*, *Mimosa bimucronata* e *Enterolobium contortisiliquum* apresentaram valores intermediários de  $\delta^{15}\text{N}$ , com grande variação entre os indivíduos amostrados. A concentração de N nos tecidos foliares variou entre 1,5% e 3,6%. De forma geral, esta variável não mostrou relação direta com o  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas. A menor razão C/N foi observada em *Enterolobium contortisiliquum* e *Erythrina speciosa*, seguida por *M. bimucronata*. Nas condições experimentais locais, as plantas não responderam à inoculação com rizóbio em nenhum dos parâmetros avaliados (estabelecimento, crescimento inicial,  $\delta^{15}\text{N}$ , concentração de N e razão C/N). As espécies de crescimento mais lento e com alta incidência de herbivoria observados no campo (*E. speciosa* e *O. arborea*) foram também as que apresentaram  $\delta^{15}\text{N}$  na faixa considerada como de ocorrência da fixação biológica de nitrogênio. Os resultados indicam, para as outras espécies, maior aquisição de N proveniente do solo.

Palavras-chave: Restauração Florestal; Semeadura Direta; Leguminosas Arbóreas; Fixação Biológica de Nitrogênio; Abundância Natural de  $^{15}\text{N}$



## ABSTRACT

### Effect of rhizobia inoculation on establishment, initial growth and $^{15}\text{N}$ natural abundance in direct-seeded native legume (Fabaceae) trees

The aim of this work was to assess the effect of rhizobia inoculation on the establishment, early growth and some aspects of N dynamics in direct-seeded native legume (Fabaceae) trees in a riparian zone of São Paulo State, Southeastern Brazil. Seedling emergency (% of total planted seeds) was evaluated until three months after sowing (MAS), and the height of the trees were measured at 13 MAS. Isotopic N fractionation was also assessed by the  $^{15}\text{N}$  natural abundance method, as well as foliar N content and C/N ratio. *Acacia polyphylla* was used as a non- $\text{N}_2$ -fixing reference plant. *Acacia polyphylla* and *Enterolobium contortisiliquum* grew most rapidly, with moderate germination rate. *Mimosa bimucronata* and *Parapiptadenia rigida* were fast-growing but with low establishment rate. *Erythrina speciosa* and *Poecilanthe parviflora* showed low growing rate, but high germination potential. The  $\text{N}_2$ -fixers showed an average foliar  $\delta^{15}\text{N}$  of 2,7‰, while the reference-plant was 4,0‰ more  $^{15}\text{N}$  enriched. *Erythrina speciosa* and *Ormosia arborea* showed the lowest  $\delta^{15}\text{N}$  values. The high  $\delta^{15}\text{N}$  of *Parapiptadenia rigida* probably indicated that it is obtaining N exclusively from the soil. *Poecilanthe parviflora*, *Mimosa bimucronata* and *Enterolobium contortisiliquum* showed intermediate  $\delta^{15}\text{N}$  values, with strong variations among the sampled individuals. Foliar N concentrations varied from 1,5% to 3,6%. In general, N concentrations were not correlated with foliar  $\delta^{15}\text{N}$ . The lowest C/N ratio was observed on *E. contortisiliquum* and *E. speciosa*, followed by *M. bimucronata*. In this field trial conditions, rhizobia inoculation did not show differences in all surveyed parameters (establishment, early growth, foliar  $\delta^{15}\text{N}$ , total N content and C/N ratio of trees). The slow-growing species, *E. speciosa* and *O. arborea*, that also had a high herbivore attack observed in the field, showed foliar  $\delta^{15}\text{N}$  in the biological  $\text{N}_2$  fixation range. The results suggested, for the other species, a larger soil N acquisition.

Keywords: Forest Restoration; Direct Seeding; Legume Trees; Biological Nitrogen Fixation;  $^{15}\text{N}$  Natural Abundance

## 1 INTRODUÇÃO

Com a chegada dos europeus e o advento da civilização moderna, gradativamente foi-se adotando um novo modelo de desenvolvimento humano na América tropical. Notado pela aglomeração populacional em grandes centros urbanos, nas áreas rurais este modelo se concretizou pela devastação incondicional das florestas naturais seguida, muitas vezes, pela exploração agropecuária em larga escala com base na monocultura, concentração fundiária e de renda — premissas básicas do colonialismo. Neste processo foram empregadas práticas agrícolas típicas de regiões de clima temperado, muitas vezes inadequadas às situações de solo e clima tropicais, resultando em impactos negativos ao ecossistema. Com o passar do tempo, alastrou-se a degradação ambiental, marcada pela perda de biodiversidade, erosão e perda de solos, alterações no regime hídrico, emissão crescente de poluentes e resíduos tóxicos, causando inclusive prejuízos econômicos e comprometendo a qualidade de vida.

Historicamente, enquanto o conhecimento tradicional e a cultura de seus habitantes originais dizimados são praticamente desconhecidos e já não mais acessíveis sequer para o saber científico, a Mata Atlântica brasileira vem sucumbindo, principalmente na região sudeste, em virtude da explosão demográfica acompanhada da industrialização e agricultura predatórias. Hoje representa cerca de 5% de sua dimensão original, estando na maioria dos casos reduzida a fragmentos isolados, mostrando tendências à degradação tanto pelo impedimento de trocas genéticas adequadas, levando ao risco de extinção das espécies a médio e longo prazo, quanto pela pressão antrópica ainda existente sobre essas áreas.

O estado de São Paulo, notável pelo seu desenvolvimento econômico, é tido como principal potência entre as demais unidades da federação, desde os tempos mais remotos da república brasileira. Apresenta como grande bandeira desenvolvimentista o agronegócio. Este, responsável pela prosperidade no interior, tem na cultura da cana-de-açúcar sua principal fonte de geração de renda, representando em peso a pauta de exportações e sobretudo o fornecimento de biocombustível, alavancando a economia nacional. Tendo em vista a crescente demanda por fontes renováveis de energia, a perspectiva futura é de uma difusão ainda maior da lavoura canavieira por parte dos produtores rurais, levando à ampliação da área plantada e à criação de novas usinas para o refino de açúcar e álcool. Com esse atrativo econômico promissor, os

remanescentes de floresta nessas regiões vêm sendo suprimidos para dar lugar à cana-de-açúcar e hoje em dia se encontram bastante ameaçados.

Tradicionalmente, as áreas mais próximas às nascentes, córregos, rios e lagos são as mais procuradas para atividades agropecuárias, devido às condições de umidade mais favoráveis ao desenvolvimento vegetal e por ser fonte de água para o gado. As florestas ali existentes, chamadas de matas ciliares, constituem importantíssimo corredor ecológico, fundamentais para garantir a conectividade entre os fragmentos florestais, além da óbvia proteção aos mananciais e à qualidade da água. Em função disso, a legislação brasileira prevê a responsabilidade do proprietário rural na preservação florestal dessas áreas, descritas como de preservação permanente (APP) no Código Florestal Brasileiro (lei nº 4771/1965), vedando o uso destas para a agricultura ou quaisquer atividades que prevejam o seu corte raso.

Nos últimos tempos a fiscalização tem se mostrado mais eficaz na proteção da natureza e na garantia do cumprimento da lei. Os órgãos certificadores, especialmente os de âmbito internacional, também aperfeiçoaram suas cobranças frente aos grandes empreendimentos agroindustriais. As empresas, buscando maior competitividade para seus produtos frente às exigências do mercado externo, se viram então forçadas a arcar com a responsabilidade ambiental de suas atividades, o que implica, entre outras tarefas, no reflorestamento com espécies nativas nas APPs de suas propriedades e nas das fazendas fornecedoras de matéria-prima. Em função do nível de degradação das matas ciliares, da extensão da área a ser recuperada e, conseqüentemente, do alto custo financeiro envolvido na restauração dessas florestas, torna-se imperiosa a participação da ciência na elaboração e execução dos projetos, gerando conhecimento e difusão de técnicas capazes de promover a retomada do ambiente florestal da forma mais rápida e menos onerosa possível.

A semeadura direta de espécies florestais recentemente tem se apresentado como alternativa ao plantio de mudas de árvores, tendo como principais atrativos a redução dos custos de implantação relacionada com a eliminação da fase de viveiro e a possibilidade de operação em áreas de difícil acesso. Em contrapartida, cuidados extras são necessários para a obtenção de sucesso com este método, no que se refere ao condicionamento do substrato onde germinarão as sementes e crescerão as plântulas, ao controle adequado de plantas invasoras e, principalmente, à escolha de espécies capazes de germinar e se desenvolver nessas condições. A família das leguminosas (Fabaceae), amplamente diversa e bem distribuída nos trópicos, tem muitas espécies

capazes de formar simbiose com microorganismos do solo eficiente em fixar o nitrogênio atmosférico. Isto as torna mais aptas não só a tolerar condições adversas, mas em contribuir com a retomada definitiva do processo natural de sucessão ecológica. Por isso, é presença obrigatória em diversas situações de plantio de árvores em áreas degradadas. Devido à rusticidade que muitas espécies apresentam, é provável que elas tenham também mais chances de sucesso na restauração florestal com técnicas de plantio que exijam mais da planta em sua fase inicial, como a semeadura direta no campo.

### **1.1 Revisão Bibliográfica**

Ao longo da história recente da América tropical, a busca pelo desenvolvimento das nações levou à devastação de extensas áreas de florestas naturais, principalmente para a agricultura comercial em larga escala destinada a abastecer o mercado externo. Dentre as inúmeras atividades antrópicas de ocupação e uso do solo, a exploração agropecuária intensiva é a responsável pela maior extensão de áreas degradadas (DIAS; GRIFFITH, 1998), muitas vezes como resultado de práticas inadequadas às condições de solo e clima tropicais (PRIMAVESI, 1999). O impacto das obras de engenharia e das atividades de mineração a céu aberto certamente sensibiliza a população de modo geral; no entanto, ao avaliar a extensão da degradação causada, verifica-se que ela é mínima, comparativamente ao desmatamento ou ao superpastejo (DIAS; GRIFFITH, 1998). Apesar disso, Balensiefer (1998) ressaltou que, das atividades degradantes, a que mais contribui com tecnologia é a mineração, estando muito à frente nas pesquisas de recuperação de ecossistemas com relação às demais atividades.

No Brasil, o primeiro exemplo de agricultura em larga escala foi com a cultura do café (*Coffea arabica* L.). Como produto de exportação em meados do séc. XIX e início do séc. XX, este foi crucial para a consolidação da nação brasileira no período imperial e da economia nas primeiras décadas da república, sendo responsável também por grandes transformações sociais no meio rural e modernização dos centros urbanos, principalmente na região sudeste (MEDICCI, 2006). A Mata Atlântica em grande parte desta região logo deu lugar a vastos cafezais, levando a uma drástica mudança na paisagem e deixando um rastro de empobrecimento do solo e degradação ambiental acentuada, principalmente nas áreas montanhosas (DEAN, 1997).

O desmatamento continua seguindo a níveis alarmantes, geralmente para a conversão de áreas florestadas em agricultura e pastagens. A fragmentação de florestas, decorrentes dessas atividades, constitui séria ameaça à manutenção da biodiversidade (RAMBALDI; OLIVEIRA, 2003). A ampliação de novas fronteiras agrícolas ainda é comum entre os países em desenvolvimento. Segundo estudos recentes da FAO (2005), cerca de 13 milhões de hectares de floresta são perdidos por ano no mundo, sendo que os dez países com maiores perdas líquidas no período 2000–2005 somam um desmatamento anual de 8.2 milhões de hectares; o Brasil lidera com pouco mais de 3 milhões de hectares de floresta (0,4 % do total) devastados por ano. A América do Sul, região do planeta com maior porcentagem de área florestada, entre 2000 e 2005 sofreu as maiores perdas de florestas entre as demais regiões — cerca de 4.300.000 ha ano<sup>-1</sup> — seguida pela África, que perdeu anualmente 4.000.000 ha. Esta posição muito se deve à abertura de áreas na floresta Amazônica para projetos de colonização e infra-estrutura, muitas vezes incentivados pelos governos (AB' SABER, 2004; LAURANCE et al., 2004). Ainda segundo a FAO (2005), embora as taxas de desmatamento sejam altas na floresta tropical densa, são ainda maiores nas formações florestais abertas e decíduas, como no nordeste e centro-oeste brasileiros. Particularmente, o bioma do Cerrado vem sendo sumariamente devastado para dar lugar à pecuária extensiva e produção de grãos, constituindo séria ameaça à biodiversidade ainda existente (MACHADO et al., 2004).

A extração de madeira e exploração de espécies de alto valor econômico contribui com a degradação, mas não pode ser culpada pelo processo inteiro, uma vez que fazendeiros geralmente vêm em seguida estabelecendo na área novas frentes de colonização agropecuária (FAO, 2005). Ao mesmo tempo, a população mundial nunca cresceu tão rapidamente. No entanto, a relação direta da explosão demográfica com o desmatamento para suprir a demanda por terras agricultáveis tornou-se menos evidente (MEYER; TURNER II, 1992). Nas últimas décadas, a expansão da agricultura esteve mais predominantemente associada com a conversão direta de florestas em agricultura permanente (ou outros usos) em pequena e larga escala do que com a agricultura migratória de cultivo e pousio (FAO, 2001), o que implica que fatores econômicos e políticos alheios aos cultivos de subsistência estão sendo mais decisivos no processo de desmatamento.

Notável pela supremacia econômica frente às demais Unidades da Federação, São Paulo tem na produção agrícola sua maior fonte de geração de divisas. Destaque nacional neste setor

(VICENTE, 2006), tem na cana-de-açúcar sua principal cultura comercial. É líder de produção no país, com uma área de cana plantada de 3,2 milhões de hectares e uma safra de 266 milhões de toneladas no ano de 2005 (BRASIL, 2006), levando a nação ao posto de maior produtor e exportador mundial de açúcar e álcool. Essa condição, somada à maior disponibilidade em potencial de novas áreas agricultáveis, deixa o Brasil com grandes vantagens em relação à produção e consumo de biocombustíveis (WRIGHT, 2006; BOCKRIS, 2007).

Tendo em vista a previsão de esgotamento dos combustíveis fósseis, o risco ambiental decorrente de seu uso (CHOW et al., 2003) e a crescente demanda por fontes renováveis de energia (LAL, 2005), a perspectiva futura é de uma difusão ainda maior da lavoura canavieira por parte dos produtores rurais, levando à ampliação da área plantada e à criação de novas usinas para o refino de açúcar e álcool. Com esse atrativo econômico promissor, a pressão sobre os remanescentes de floresta em áreas de interesse para a expansão canavieira pode ainda aumentar, como é a previsão para o Estado do Mato Grosso do Sul (CORRÊA, 2006). Em São Paulo, a devastação reduziu a área coberta por vegetação natural para 13% (3.398.605 ha) da original, que antes ocupava 81,8% do seu território (KRONKA et al., 2003), principalmente para a substituição de florestas por agricultura. Os remanescentes florestais do Estado se encontram em sua maioria em terrenos de forte declividade no litoral, como a Serra do Mar, e bastante escassos em regiões como a do planalto paulista (SÃO PAULO, 2005a).

Pela legislação brasileira, as áreas situadas ao longo das margens de cursos d'água e nascentes são consideradas de preservação permanente (APPs), sendo obrigatória a manutenção de sua cobertura florestal nativa, protegida do corte (BRASIL, 1965, 2002). Em áreas agrícolas, o exemplo de APP mais ameaçado pela ação humana é a mata ciliar. No estado de São Paulo esta é prioridade e constitui o principal alvo das ações de restauração de áreas degradadas pela agricultura (SÃO PAULO, 2005b). A vegetação ciliar é um elemento chave da paisagem, servindo como corredores ecológicos naturais, que possibilitam o fluxo de animais e propágulos (pólen e sementes) ao longo de sua extensão e interligam importantes fragmentos florestais (KAGEYAMA et al., 2001). Além disso, essas formações florestais têm importância vital para a proteção dos mananciais, pois evitam a erosão e perdas de solo (LAL, 1996) e mantêm a qualidade da água e a regularidade do fluxo hídrico (SUN et al., 2005).

Os fragmentos de vegetação ou florestas fronteiriças às áreas afetadas pela ação humana têm grande importância como fornecedores de propágulos vegetativos promotores da

recolonização vegetal (RODRIGUES et al., 2004). Quando as fontes de propágulos estão muito distantes da área a ser recuperada, ou seja, quando a matriz regional não é mais a florestal, constituindo-se em extensas áreas fortemente alteradas ou degradadas, a simples condução da regeneração natural não é suficiente para garantir o retorno do ecossistema às suas funções ecológicas originais (RODRIGUES; GANDOLFI, 2004). Faz-se necessária, portanto, a intervenção antrópica no sentido de se reintroduzir espécies vegetais capazes de promover a retomada do processo de restauração das florestas.

Em diversas atividades de revegetação, a escolha de espécies arbóreas tem sido feita de maneira indiscriminada quanto ao seu local de origem. Geralmente ela é capitaneada por outros atributos, como a disponibilidade de sementes, o conhecimento das características silviculturais e o rápido crescimento (CAMPELLO, 1998). O objetivo, na maioria dos casos, é o retorno do ecossistema a algumas de suas funções ecológicas originais, como a estabilização do solo e a regulação climática, ou que promovam o desenvolvimento econômico local (ENGEL; PARROTTA, 2003). Pouca importância é dada à flora local e à estrutura das formações vegetais que ali existiam. O uso de espécies nativas em APPs é recomendável, uma vez que as espécies que evoluíram na região têm mais probabilidade de encontrar os seus polinizadores, dispersores de sementes e predadores naturais, fatores fundamentais para que as populações implantadas tenham a reprodução e a regeneração asseguradas (KAGEYAMA; GANDARA, 2004). Além disso, as árvores nativas introduzidas podem ter uma maior adaptabilidade às condições edafoclimáticas da região (ENGEL; PARROTTA, 2003).

A forma mais comum de revegetação com árvores tem sido o plantio de mudas (KAGEYAMA et al., 2001). Uma técnica alternativa de restauração de florestas é a semeadura direta de espécies arbóreas no campo (ENGEL; PARROTTA, 2001; CABIN et al., 2002; DOUST et al., 2006). A semeadura direta apresenta como principal vantagem reduções dos custos de implantação, com a eliminação da fase de viveiro, e da mão-de-obra, importante em áreas carentes de recursos ou de difícil acesso (BARNETT; BAKER 1991). Dispondo-se de grande quantidade de sementes, pode-se revegetar uma área com uma densidade maior de indivíduos, resultando em uma ocupação mais rápida pelas árvores. Além disso, com as sementes germinando diretamente no solo as raízes se desenvolvem normalmente, sem as limitações de crescimento que teriam em tubetes ou em sacos plásticos (FLORES-AYLAS, 1999), desde que as condições físicas do substrato sejam favoráveis.

A semeadura direta, utilizada há décadas em reflorestamento com coníferas em diversos países de clima temperado (DERR; MANN, 1971; HUNT; MCMINN, 1988), recentemente vem sendo apreciada para a restauração de ecossistemas florestais nos trópicos (SUN et al., 1995; BARRON; DALTON, 1996; KNIGHT et al., 1998; BROFAS; KARETSOS, 2002). No Brasil, onde essa técnica ainda é pouco empregada, os trabalhos de pesquisa com fins ambientais têm se intensificado nos últimos anos, para a recuperação de áreas mineradas (PARROTTA; KNOWLES, 1999), da Amazônia (CAMARGO et al., 2002) e para a restauração de matas ciliares (BARBOSA et al., 1992; ALMEIDA, 2004). Engel e Parrotta (2001), Ferreira (2002) e Araki (2005) confirmaram a viabilidade da implantação de florestas nativas por semeadura direta. Contudo, devido à vasta diversidade da flora brasileira e a grande extensão de zonas ripárias degradadas, estudos envolvendo um maior número de espécies são de extrema importância.

O nitrogênio é o componente mais abundante na atmosfera, encontrando-se numa forma combinada ( $N_2$ ) que as plantas não são capazes de aproveitar. Nos sistemas terrestres, é o elemento químico mais limitante para o crescimento vegetal (PEDROSA et al., 2000), e é o que proporciona maiores respostas na cronosequência da sucessão ecológica (HRSAK, 2004). O aumento do uso de fertilizantes nitrogenados representa grande ônus energético, devido ao gasto de combustíveis fósseis para sintetizá-lo, aos desperdícios decorrentes da aplicação e do baixo aproveitamento dos adubos no sistema solo-planta. Além disso, pelo aquecimento global oriundo da queima de derivados de petróleo, pela contaminação do lençol freático, pelos riscos de vazamento de amônia e aumento de óxido nítrico atmosférico, o nitrogênio produzido artificialmente causa sérios danos ambientais, sobretudo à saúde humana (HARDY, 1993).

Em áreas degradadas ou fortemente alteradas pela ação antrópica, onde o teor de matéria orgânica do solo já é muito baixo, o crescimento satisfatório das plantas só é possível com a adição de grandes quantidades de composto orgânico, adição frequente de adubos nitrogenados ou utilizando o nitrogênio atmosférico, num processo natural conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN): através da quebra da ligação tripla do  $N_2$  por microorganismos diazotróficos, o nitrogênio é convertido em amônia e disponibilizado para as plantas (PEDROSA et al., 2000). A FBN 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 (FRANCO; DÖBEREINER, 1994).



Entre as espécies pioneiras, ou seja, tolerantes à luz direta e que iniciam o processo de sucessão vegetal (BUDOWSKI, 1965), as leguminosas (família Fabaceae) despertam grande interesse, já que em sua maioria, são lenhosas e perenes, se adaptam aos mais diversos biomas brasileiros e formam simbiose eficiente com bactérias do gênero *Rhizobium* (comumente denominadas rizóbio), que fixam nitrogênio atmosférico. Isto as torna mais aptas não só a tolerar condições adversas, mas em contribuir com a retomada do processo natural de sucessão ecológica. Essa associação, caracterizada pela presença de nódulos nas raízes, pode incorporar até 500 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N ao sistema solo-planta (FRANCO; FARIA, 1997) sendo particularmente importante nas condições dos países tropicais, onde o uso de fertilizantes nitrogenados não é amplamente difundido e a economia com estes insumos representa um ganho de produtividade para produtores menos capitalizados. Em áreas agricultáveis sob o regime tradicional da derrubada e queima seguida por pousio, a FBN pela simbiose rizóbio-leguminosa é tida como a principal forma da vegetação secundária de recuperar as perdas de N sofridas pela volatilização e lixiviação de nitrato (GEHRING et al., 2005). As leguminosas nodulantes contribuem com a recuperação do solo pela deposição de material vegetal com baixa relação C/N, aumentando a atividade biológica e atuando como agente formador de matéria orgânica (FRANCO et al., 1992; LAVELLE, 2000). Esses atributos assumem grande importância principalmente em solos pobres ou que já se encontram desprovidos da sua camada orgânica superficial. A deposição das folhas e o crescimento radicular estabilizam o solo, proporcionando também melhorias físicas que atenuam o impacto das chuvas e os processos erosivos, criando condições propícias para o estabelecimento de outras espécies mais exigentes (REQUENA et al., 2001).

A disponibilidade de nitrogênio pode atuar como um mecanismo importante no controle da taxa, direção e substituição de espécies que regulam a sucessão; em áreas degradadas, onde há baixa disponibilidade de N, as leguminosas arbóreas mostram-se como uma fonte primária de nitrogênio capaz de permitir a retomada do ambiente florestal (LAMB, 1980 apud CAMPELLO, 1998). Experiências bem-sucedidas com leguminosas arbóreas têm sido documentadas na recuperação de solos degradados, muitas vezes com pouca ou nenhuma matéria orgânica em suas camadas superficiais (FRANCO et al., 1995; SCOTTI; CORREA, 2004; CARPENTER et al., 2004).

As leguminosas englobam aproximadamente 18000 espécies conhecidas (BARROSO et al., 1986; SPRENT, 1995) e são amplamente distribuídas nos trópicos, merecendo especial

destaque devido à sua possibilidade de uso múltiplo (NFTA, 2005). Allen e Allen (1981) publicaram um livro clássico reunindo não somente tudo o que era sabido sobre a nodulação em leguminosas naquela época, mas também a história e os usos dos diversos gêneros. Posteriormente, a maior busca por novos gêneros e espécies capazes de nodular, principalmente florestais, foi feita no Brasil (FARIA et al., 1984; SPRENT, 1995). A capacidade de nodular varia consideravelmente entre as sub-famílias: apenas 23% das espécies de Caesalpinioideae estudadas nodulam, enquanto que para as sub-famílias Mimosoideae e Papilionoideae a capacidade de nodulação é de 90 e 97% das espécies estudadas, respectivamente (SPRENT, 1995). Segundo este autor, as leguminosas evoluíram nos trópicos e suas formas mais primitivas eram árvores. Mais tarde em sua evolução, estenderam-se para áreas sazonalmente secas e cada vez mais áridas, sendo muitas delas obrigadas a enfrentar uma série de problemas nutricionais complexos, (muitas vezes) não somente a limitação de N. Ele afirma ainda que essa vegetação singular necessita urgente de estudos fisiológicos, não somente pelo seu interesse intrínseco, mas também porque uma melhor compreensão de como essas plantas sobrevivem é essencial para um manejo adequado em ambientes críticos.

Além dos fatores ambientais, a formação de nódulos radiculares e a fixação de níveis elevados de N dependem da afinidade genética entre o hospedeiro e o simbiote (MUTCH; YOUNG, 2004). A coleta de nódulos de leguminosas arbóreas crescendo na natureza (FARIA et al., 1999), seleção de estirpes de rizóbio eficientes em fixar N (MELLO; FARIA, 1998) para a multiplicação em laboratório e fabricação de inoculantes (DÖBEREINER et al, 1999) constituem uma importante ferramenta biotecnológica a ser aplicada na recuperação de ecossistemas degradados. Muitas espécies necessitam de estudos mais aprimorados, principalmente quanto ao seu desempenho em diferentes regiões.

O diagnóstico da fixação de nitrogênio pelas árvores é um ponto fundamental para o estudo dessas espécies, tanto para o entendimento de seu papel ecológico no ciclo global do N, como para seu manejo sustentável apropriado. A busca por ajustamentos metodológicos capazes de proporcionar uma estimativa segura tem sido o principal objeto de estudo entre os especialistas. A razão entre dois isótopos estáveis do nitrogênio varia na biosfera como resultado de fracionamento em processos físicos, químicos e biológicos. Com o auxílio da determinação da abundância natural dos isótopos ou via enriquecimento isotópico, representa uma forma única de

avaliação direta da FBN, principalmente em condições de campo, em que outras técnicas se tornam inviáveis (HÖGBERG, 1997).

O uso de técnicas isotópicas teoricamente permite a separação do N derivado do solo e da atmosfera. A estimativa baseada na concentração de N na biomassa e em métodos de diluição isotópica encontra dificuldades técnicas em áreas naturais ou em processo de restauração, principalmente para árvores de maior tamanho, comprometendo a eficácia na avaliação da fixação de  $N_2$  (SPRENT; PARSONS, 2000). A técnica que se mostra mais promissora para quantificar as contribuições da fixação de N em árvores é chamada de ‘abundância natural do  $^{15}N$ ’ (SHEARER; KOHL, 1986), que explora diferenças de ocorrência natural na abundância de  $^{15}N$  entre o nitrogênio do solo disponível para as plantas e o  $N_2$  atmosférico (BODDEY et al., 2000). Ela se baseia no fenômeno comumente observado que o N mineral do solo ( $NO_3$  e  $NH_4$ ) geralmente é naturalmente enriquecido (ou menos frequentemente diluído) no isótopo pesado do  $^{15}N$ , comparado com o  $N_2$  atmosférico (SHEARER; KOHL, 1986). Variações regulares da razão isotópica de N ( $^{15}N/^{14}N$ ) podem proporcionar informações úteis a respeito das fontes de N utilizadas pelas plantas, bem como de aspectos relacionados ao fluxo de N nos ecossistemas.

Existem dois isótopos estáveis de nitrogênio,  $^{14}N$  e  $^{15}N$ . O isótopo pesado,  $^{15}N$ , ocorre no  $N_2$  atmosférico numa abundância constante de 0,3663 átomos %. Se a abundância no N do solo disponível para as plantas (mineral) é maior que isso, uma estimativa das proporções do N contido nas leguminosas derivado de cada fonte pode ser feita. Para essa estimativa, a abundância de  $^{15}N$  no N mineral é obtida analisando uma planta referência não fixadora de N, a qual é totalmente dependente do solo para o seu crescimento. Com o aumento da FBN, a abundância do  $^{15}N$  nas plantas fixadoras de N diminui, em função da ‘diluição’ do N assimilado no solo pelo  $N_2$  atmosférico de baixo  $\delta^{15}N$  fixado nos nódulos radiculares (PEOPLES et al, 1989).

Alguns problemas são inerentes à aplicação de qualquer metodologia baseada em  $^{15}N$  voltada para árvores. Esses problemas são relacionados (i) à amostragem representativa de toda a composição da planta; (ii) à escolha de plantas-referência apropriadas e (iii) ao potencial de transferência de N fixado das árvores fixadoras de N para as espécies-referência associadas (BODDEY et al., 2000). No entanto, quando são feitos os ajustamentos necessários, a abundância natural do  $^{15}N$  pode trazer inferências significativas no que diz respeito a aspectos do ciclo global do N e da forma com que esse elemento está sendo assimilado pelas plantas. Gathumbi et al (2002) confirmaram a utilidade do método da abundância natural do  $^{15}N$  para estimar a fixação de

nitrogênio em leguminosas arbóreas e herbáceas no campo. A assinatura do  $\delta^{15}\text{N}$  nas folhas das plantas, em conjunto com sua concentração total de N, podem constituir indicadores relevantes para a identificação de grupos funcionais dentro da comunidade de espécies não-fixadoras de  $\text{N}_2$ , bem como para detectar a ação de microorganismos diazotróficos (ROGGY et al., 1999).

## Referências

AB' SABER, A. N. **A Amazônia: do discurso à práxis**. 2.ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2004. 319 p.

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae: a source book of characteristics, uses, and nodulation**. Madison: University of Wisconsin Press, 1981. 812 p.

ALMEIDA, N. O. **Implantação de matas ciliares por plantio direto utilizando-se sementes peletizadas**. 2004. 269p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2004.

ARAKI, D. F. **Avaliação da semeadura a lanço de espécies florestais nativas para recuperação de áreas degradadas**. 2005. 171p. Tese (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BALENSIEFER, M. Estado de arte em recuperação e manejo de áreas frágeis e/ou degradadas. In: Embrapa-CNPMA. **Recuperação e manejo de áreas degradadas**. Campinas. Memória do Workshop. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. (Embrapa-CNPMA Documentos, 13) p.15-18.

BARBOSA, J. M.; BARBOSA, L. M.; STROSS, S. R.; SILVA, T. S.; GATUZZO, E. H.; FREIRE, R. M. Capacidade de estabelecimento de indivíduos de espécies da sucessão secundária a partir de sementes em sub-bosque de uma mata ciliar degradada do rio Moji Guaçu-SP. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS. **Anais...** Curitiba, 1992. Curitiba: UFPR, 1992. p.400-406.

BARNETT, J. P.; BAKER, J. B. Regeneration Methods. In: DURYEA, M. L. E; DOUGHERTY, P. M. (Ed.) **Forest regeneration manual**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.35-50.

BARRON, P.; DALTON, G. Direct seeding of native trees and shrubs in coastal environments. **Journal of Coastal Research**, Palm Beach, v. 12, n. 4, p.1006-1008, 1996.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária UFV, 3v. 1986. 326 p.

BOCKRIS, J. O' M. Will lack of energy lead to the demise of high-technology countries in this century? **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 32, n. 2, p.153-158, 2007.

BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 57, p. 235-270. 2000.

BRASIL. Lei nº 4771, de 15 de setembro de 1965. Institui o novo Código Florestal. **Diário Oficial**, Brasília, 16 set. 1965. p. 1-18.

\_\_\_\_\_. Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, Resolução n. 303, de 20 de março de 2002. Dispõe sobre parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br>> Acesso em: 23 dez. 2006.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agricultura brasileira em números – Anuário 2005 (atualizado em 3/11/2006). Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 18 dez. 2006.

BROFAS, G.; KARETSOS, G. Revegetation of mining spoils by seeding of woody species on Ghiona Mountain, Central Greece. **Land Degradation and Development**, Indianapolis, v. 13, n. 6, p. 461-467, 2002.

BUDOWSKI, G. Distribution of tropical American rain forest species in the light of successional process. **Turrialba**, Turrialba, v. 15, p. 40-42, 1965.

CABIN, R. J.; WELLER, S. G.; LORENCE, D. H.; CORDELL, S.; HADWAY, L. J. Effects of microsite, water, weeding, and direct seeding on the regeneration of native and alien species within a Hawaiian dry forest preserve. **Biological Conservation**, Kidlington, v. 104, p. 181-190, 2002.

CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K.; IMAKAWA, A. M. Rehabilitation of degraded areas of Central Amazonia using direct sowing of forest tree seeds. **Restoration ecology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 636-644, 2002.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.) **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, 1998. p.183-196.

CARPENTER, F. L.; NICHOLS, J. D.; PRATT, R. T.; YOUNG, K. C. Methods of facilitating reforestation of tropical degraded land with the native timber tree, *Terminalia amazonia*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 202, n.1/3, p. 281-291, 2004.

CHOW J.; KOPP R. J.; PORTNEY P. R. Energy Resources and Global Development. **Science**, Washington, v. 302, n. 5650, p. 1528-1531, 2003.

CORRÊA, H. MS aprova ampliação de usinas de álcool no entorno do Pantanal. **Folha de São Paulo** On-line, 19 dez. 2006. Disponível em <<http://www.folha.com.br>> Acesso em 24 jan. 2007.

DEAN, W. **A Ferro e Fogo: A História e a Devastação da Mata Atlântica Brasileira**. Tradução de C. K. Moreira. São Paulo: Companhia das letras, 1997. 484 p.

DERR, H. J.; MANN, W. F. **Direct seeding pines in the South**. Washington: U.S.D.A Forest Service, 1971. 68p.

DIAS, L. E.; GRIFFITH, J. J. Conceituação e Caracterização de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.) **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, Departamento de Solos/SOBRAD, p.1-7. 1998.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O. de; ALCÂNTARA, I. **Protocolo da Embrapa Agrobiologia para produção de inoculante para leguminosa**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999, 6p. (Embrapa-CNPAB Documentos, 97).

DOUST, S. J.; ERSKINE, P. D.; LAMB, D. Direct seeding to restore rainforest species: Microsite effects on the early establishment and growth of rainforest tree seedlings on degraded land in the wet tropics of Australia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 234, n. 1/3, p.333-343, 2006.

ENGEL, V. L.; PARROTA, J. A. Definindo a restauração ecológica: tendências e perspectivas mundiais. In: KAGEYAMA, P. Y. et al. (Org.) **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. Botucatu: FEPAF, 2003. p.1-26.

ENGEL, V.L.; PARROTA, J.A. An evaluation of direct seeding for restoration of degraded lands in central São Paulo state, Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 152, p. 169-181, 2001.

FARIA, S. M.; LEWIS, G. P.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M. Occurrence of nodulation in the leguminosae. **New Phytologist**, New York, v. 111, p. 607-619, 1999.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A.; JESUS, R. M.; MENANDRO, M. S.; BAITELLO, J. R.; MUCCI, E. S. P.; DÖBEREINER, J.; SPRENT, J. I. New nodulating legume trees from South-East Brazil. **New Phytologist**, New York, v. 98, p. 317-328, 1984.

FERREIRA, R. A. **Implantação de florestas nativas por meio de semeadura direta**. 2002. 138p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2002.

FLORES-AYLAS, W. W. **Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta**: efeito de micorriza e fósforo. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1999.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **State of the World's Forests 2001**. Roma, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acessado em 12 nov. 2006.

\_\_\_\_\_. **Global Forest Resources Assessment 2005** - Progress towards sustainable forest management. Rome, 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acessado em 14 dez. 2006. (Forestry Paper, 147)

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, 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.; CAMPELLO, E. F. C.; SILVA, E. M. R.; FARIA, S. M. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: Embrapa-CNPBS, 1992. 8p. (Embrapa-CNPBS Comunicado Técnico, 9)

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. Revegetation of acidic residues from bauxite mining using nodulated and mycorrhizal legume trees. **Nitrogen Fixing Trees Research Reports**, Paia (special issue), p. 313-320, 1995.

GATHUMBI, S. M.; CADISCH, G.; GILLER, K. E. <sup>15</sup>N natural abundance as a tool for assessing N<sub>2</sub> fixation of herbaceous, shrub and tree legumes in improved fallows. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 8, p.1059-1071, 2002.

GEHRING, C., VLEK, P. L. G.; SOUZA, L. A. G.; DENICH, M. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 111, n.1/4, p. 237-252. 2005.

HARDY, R. W. F. Biological Nitrogen Fertilization: Present and future applications. In: SRIVASTAVA, J. P.; ALDERMANS, H. (Ed.). Agriculture and Environmental Challenges. Agricultural Sector Symposium, 13. **Proceedings...** Washinton: The World Bank. 1993. p.109- 117.

HÖGBERG, P. <sup>15</sup>N natural abundance in soil-plant systems **New Phytologist**, New York, v. 137, p. 179-203, 1997.

HRSÁK, V. Vegetation succession and soil gradients on inland sand dunes. **Ekologia**, Bratislava, v. 23, n. 1, p. 24-39, 2004.

HUNT, J. A.; McMINN, R. G. Mechanical site preparation and forest regeneration in Sweden and Finland: implications for technology transfer. British Columbia Forest Service. **Forestry FRDA Report**, Ontario, v. 31. 1988. 58p.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Recuperação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. (Ed.) **Matas Ciliares**: conservação e recuperação. 3.ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo/Fapesp, 2004. p. 249-269.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; OLIVEIRA, R. E.; MORAES, L. F. D. **Restauração de mata ciliar: manual para recuperação de áreas ciliares e microbacias**. Rio de Janeiro. Semads, 2001. 104p.

KNIGHT, A. J. P.; BEALE, P. E.; DALTON, G. S. Direct seeding of native trees and shrubs in low rainfall areas and on non-wetting sands in South Australia. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 225-239, 1998.

KRONKA, F. J. N.; NALON, M. A.; BAITELLO, J. B.; MATSUKUMA, C. K.; PAVÃO, M.; YWANE, M. S. S.; LIMA, L. M. P. R.; KANASHIRO, M. M.; BARRADAS, A. M. F.; BORGIO, S. C. Levantamento da vegetação Natural e Caracterização de Uso do Solo no Estado de São Paulo. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 11., 2003, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: INPE, 2003. p.2779-2785.

LAL, R. Deforestation and land-use effects on soil degradation and rehabilitation in western Nigeria. III. Runoff, soil erosion and nutrient loss. **Land Degradation and Development**, Indianapolis, v. 7, n. 2, p. 99-119, 1996.

LAL, R. World crop residues production and implications of its use as a biofuel. **Environment International**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 575-584. 2005.

LAURANCE, W. F.; ALBERNAZ, A. K. M.; FEARNESIDE, P. M.; VASCONCELOS, H. L.; FERREIRA, L. V. Deforestation in Amazonia. **Science**, Washington, v. 304, p.1109, 2004.

LAVELLE, P. Ecological Challenges for Soil Science. **Soil Science**, Baltimore, v. 165, n. 1, p.73-86, 2000.

MACHADO, R.B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.G. P.; CALDAS, E.F.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Relatório técnico não publicado**. Conservação Internacional, Brasília, DF. 2004.

MEDICCI, A. P. Para além de escravos e senhores: sociedade e economia paulistas entre 1750 e 1850. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 20, n. 57, p.392-397, 2006.

MELLO, R. B.; FARIA, S. M. **Compatibilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, rizóbio, com espécies da família leguminosae**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 3p. (Embrapa-CNPAB Comunicado Técnico, 27)

MEYER W. B.; TURNER II, B. L. Human Population Growth and Global Land-Use/Cover Change. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 23, p. 39-61, 1992.

MUTCH, L. A.; YOUNG, J. P. W. Diversity and specificity of Rhizobium leguminosarum biovar viciae on wild and cultivated legumes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 2435-2444, 2004.

NFTA. **Nitrogen-fixing tree highlights**. Nitrogen Fixing Tree Association, Morrilton, Arkansas, USA. Disponível em: <<http://www.winrock.org/forestry/factnet.htm>>. Acessado em 20 jan. 2005.

PARROTTA, J. A.; KNOWLES, O.H. Restoration of tropical moist forest on bauxite-mined lands in Brazilian Amazon. **Restoration Ecology**, Oxford, v. 7, n. 2, p.103-116, 1999.

PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. (Ed.) **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 700p. 2000.

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

PRIMAVESI, A. **Manejo Ecológico do Solo**. São Paulo: NOBEL, 1999. 549p.

RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. (Org.) **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: MMA/SBF, 2003. 510p.

- REQUENA, N.; PEREZ-SOLIS, E.; AZCÓN-AGUILAR, C.; JEFFRIES, P.; BAREA, J. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 2, p. 495-498, 2001.
- RODRIGUES, R. R.; TORRES, R. B.; MATTHES, L. A. F.; PENHA, A. S. Tree species sprouting from root buds in a semi-deciduous forest affected by fires. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n.1, p.127-133, 2004.
- RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R.R.; LEITÃO-FILHO (Ed.) **Matas Ciliares: Conservação e Recuperação**. 3.ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo/Fapesp. 2004. p. 235-247.
- ROGGY, J.C.; PRÉVOST, M.F.; GOURBIERE, F.; CASABIANCA, H.; GARBAYE, J.; DOMENACH, 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**, New York, v. 120, n. 2, p. 171-182, 1999.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente / Instituto Florestal. Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo. **Imprensa Oficial**. 200p. 2005a
- \_\_\_\_\_. Decreto nº 49.723, de 24 de junho de 2005. Institui o Programa de Recuperação de Zonas Ciliares do Estado de São Paulo e dá providências correlatas. 2005b
- SCOTTI, M. R.; CORREA, E. J. A. Growth and litter decomposition of woody species inoculated with rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi in Semiarid Brazil. **Annals of Forest Science**, Versailles, v. 61, n. 1, p. 87-95, 2004.
- 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**, Collingwood Victoria, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986.
- SPRENT, J. I. Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4/5, p.401-407, 1995.
- SPRENT, J. I; PARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n.2-3, p. 183-196, 2000.
- SUN, D.; DICKINSON, G. R.; BRAGG, A. L. Direct seeding of *Alphitonia petriei* (Rhamnaceae) for gully revegetation in tropical northern Australia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 73, n. 1/3, p. 249-257, 1995.
- SUN, G.; McNULTY, S.G.; LU, J.; AMATYA, D.M.; LIANG, Y.; KOLKA R.K. Regional annual water yield from forest lands and its response to potential deforestation across the southeastern United States. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 308, p. 258-268, 2005.
- VICENTE, J. R. Comparação de produtividade agrícola entre as unidades da federação, 1970-1995. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 69-83, jul./dez. 2006.
- WRIGHT, L. Worldwide commercial development of bioenergy with a focus on energy crop-based projects. **Biomass and Bioenergy**, Oxford v.30, p. 706–714, 2006.



## **2 Estabelecimento e crescimento inicial de leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas plantadas por semeadura direta: efeito da inoculação com rizóbio**

### **Resumo**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação com rizóbio no estabelecimento e no crescimento inicial de leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas plantadas por semeadura direta no campo. Sementes foram plantadas manualmente em mata ciliar no norte do Estado de São Paulo, com e sem inoculante de rizóbio, numa densidade de 20 sementes por metro linear. Foi avaliada a emergência de plântulas (% em relação ao número de sementes plantadas) até os 3 meses após a semeadura (MAS) e o crescimento em altura aos 13 MAS. De uma forma geral, houve grande variação entre as espécies estudadas. *Acacia polyphylla* e *Enterolobium contortisiliquum*, com taxa de germinação mediana e rápido crescimento. *Mimosa bimucronata* e *Parapiptadenia rigida*, com crescimento relativamente rápido e baixa taxa de germinação. *Erythrina speciosa* e *Poecilanthe parviflora*, com crescimento lento e germinação elevada no campo. Nas condições experimentais apresentadas a inoculação com rizóbio não apresentou diferenças no estabelecimento e no crescimento inicial das mudas.

Palavras-chave: Recuperação de Matas Ciliares; Fixação Biológica de N<sub>2</sub>; Leguminosas Arbóreas Nativas; Semeadura Direta

### **Abstract**

#### **Establishment and early growth of direct-seeded native legume (Fabaceae) trees: rhizobia inoculation effect**

The aim of this work was to assess rhizobia inoculation in establishment and early growth of direct-seeded indigenous legume (Fabaceae) trees. Plants were hand-sown in a riparian zone in northern São Paulo State, Southeastern Brazil, with inoculated and uninoculated plots with a 20 seeds m<sup>-1</sup> density. Seedling emergency (% of total planted seeds) was evaluated until three months after sowing (MAS), as well as the height at 13 MAS. In general, there were strong variations among the species. *Acacia polyphylla* and *Enterolobium contortisiliquum* grew most rapidly, with moderate germination rate. *Mimosa bimucronata* and *Parapiptadenia rigida* were fast-growing but with low establishment rate. *Erythrina speciosa* and *Poecilanthe parviflora* showed low growing rate, but high germination potential. In this field trial conditions presented above, rhizobia inoculation did not show differences in the establishment and early growth of trees.

Keywords: Restoration of Riparian Forests; Biological N<sub>2</sub> fixation; Native Legume Trees; Direct Seeding

## 2.1 Introdução

A Floresta Atlântica e o Cerrado brasileiro, que cobriam respectivamente toda a porção leste e parte do interior do país, hoje estão reduzidos a fragmentos isolados. Dentre as inúmeras atividades antrópicas de ocupação e uso do solo, a exploração agropecuária intensiva é a responsável pela maior extensão de áreas degradadas, resultado de práticas inadequadas às condições de solo e clima tropicais (PRIMAVESI, 1999). 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 de caráter mais rústico assume grande importância, não só como garantia de sobrevivência no campo, mas que possam também condicionar o ambiente para o surgimento de outras espécies, no sentido de facilitar a sucessão vegetal e reverter o processo de degradação.

As leguminosas (família Fabaceae), abundantes nos trópicos, despertam grande interesse para o múltiplo uso já que, em sua maioria, são lenhosas e perenes, se adaptam aos mais diversos ecossistemas brasileiros e são capazes de fixar nitrogênio atmosférico em associação com bactérias comumente chamadas de rizóbio (SPRENT, 1995), num processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). Caracterizada pela presença de nódulos nas raízes, algumas espécies podem incorporar até  $500 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de N ao sistema solo-planta (FRANCO; FARIA, 1997). A simbiose rizóbio-leguminosas é particularmente importante nas condições dos países tropicais, onde o uso de fertilizantes nitrogenados não é amplamente difundido e a economia com estes insumos representa um ganho de produtividade para agricultores menos capitalizados (DÖBEREINER, 1990; ROY et al., 2002).

As leguminosas nodulantes contribuem com a recuperação do solo pela deposição de material vegetal com baixa relação C/N, aumentando a atividade biológica e atuando como agente formador e estabilizador da matéria orgânica do solo (LAVELLE, 2000; RESH et al., 2002). Esses atributos assumem grande importância, principalmente em solos que já se encontram desprovidos de sua camada orgânica superficial. A introdução de espécies-alvo de plantas nativas em associação com comunidades manejadas de micro-simbiontes - como fungos micorrízicos arbusculares e bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$  - constitui uma promissora ferramenta biotecnológica

para auxiliar no repovoamento de ecossistemas desertificados ou em processo de desertificação/degradação (FRANCO; FARIA, 1997; REQUENA et al., 2001).

Em trabalhos técnicos envolvendo reflorestamento com espécies nativas, geralmente o plantio de mudas é o método mais adotado. Novas alternativas para a restauração de florestas vêm sendo contempladas, como a condução da regeneração natural (RODRIGUES et al., 2004) e a semeadura direta (SD) de espécies arbóreas no campo (DOUST et al., 2006). A SD apresenta como principal vantagem a redução dos custos de implantação de povoamentos florestais, com a eliminação da fase de viveiro, e da mão-de-obra, importante em áreas carentes de recursos ou de difícil acesso (BARNETT; BAKER, 1991). Dispondo-se de grande quantidade de sementes de espécies iniciais de sucessão, pode-se revegetar uma área aberta com uma densidade maior de indivíduos, resultando em uma ocupação mais rápida pelas árvores. Além disso, com as sementes germinando diretamente no solo, as raízes se desenvolvem sem as limitações de crescimento que teriam em tubetes ou em sacos plásticos (FLORES-AYLAS, 1999), caso as condições físicas do substrato sejam favoráveis.

No Brasil, onde esta técnica ainda é pouco empregada, os trabalhos de pesquisa com fins ambientais têm se intensificado nos últimos anos, para a recuperação de áreas mineradas (PARROTTA; KNOWLES, 1999), da Amazônia (CAMARGO et al., 2002) e para a restauração de matas ciliares (ALMEIDA, 2004). Em um experimento no interior do Estado de São Paulo, Engel e Parrotta (2001) constataram a facilitação da regeneração natural de espécies florestais nativas, provenientes de matas adjacentes, em áreas onde foi realizada SD, em comparação com as áreas-controle protegidas do fogo e outros distúrbios onde não foi realizado plantio. Apesar da importância das interações entre leguminosas e bactérias eficientes em fixar  $N_2$  ser bem reconhecida, pouco esforço tem sido realizado para se usar a simbiose de plantas nativas para a SD em larga escala visando a reabilitação e restauração de ecossistemas naturais (THRALL et al., 2005). Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação com rizóbio no estabelecimento e no crescimento inicial de leguminosas arbóreas nativas plantadas por semeadura direta no campo.

## 2.2 Material e Métodos

Foi realizado um experimento em condições de campo em área destinada à preservação permanente na Fazenda Mata Chica (Figura 2.1), município de Morro Agudo, Estado de São Paulo (20°40'32" S; 48°04'23" W). O local, originalmente ocupado por mata ciliar descrita fitogeograficamente como contato Savana Florestada (Cerradão) / Floresta Estacional (SÃO PAULO, 2005), foi explorado pela lavoura canavieira em um passado recente e depois ficou ausente de manejo, em respeito à legislação referente às áreas de preservação permanente. O clima local é tropical chuvoso, Cwa na classificação de Köppen (1948), com precipitação pluviométrica anual de 1530 mm e temperatura máxima de 28°C e mínima de 17°C (médias mensais). O solo é classificado como Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999), cuja análise química de amostra de terra apresentou pH (CaCl<sub>2</sub>) 4,8; teor de matéria orgânica 28 g dm<sup>-3</sup>; P 12 mg dm<sup>-3</sup>; K, Ca, Mg e H+Al (mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>) 5, 38, 14 e 31, respectivamente.

Na área de plantio, caracterizada como canavial abandonado, foi feita uma roçada, para remoção das gramíneas remanescentes. Após a limpeza, foram realizadas aração e gradagem, com o objetivo de destorroar o solo e eliminar o banco de propágulos de invasoras existente. Por fim, uma sulcadora abriu as linhas (sulcos) de plantio, onde foi aplicado Superfosfato Triplo, na ordem de 100 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>. Embora o resultado da análise química do solo

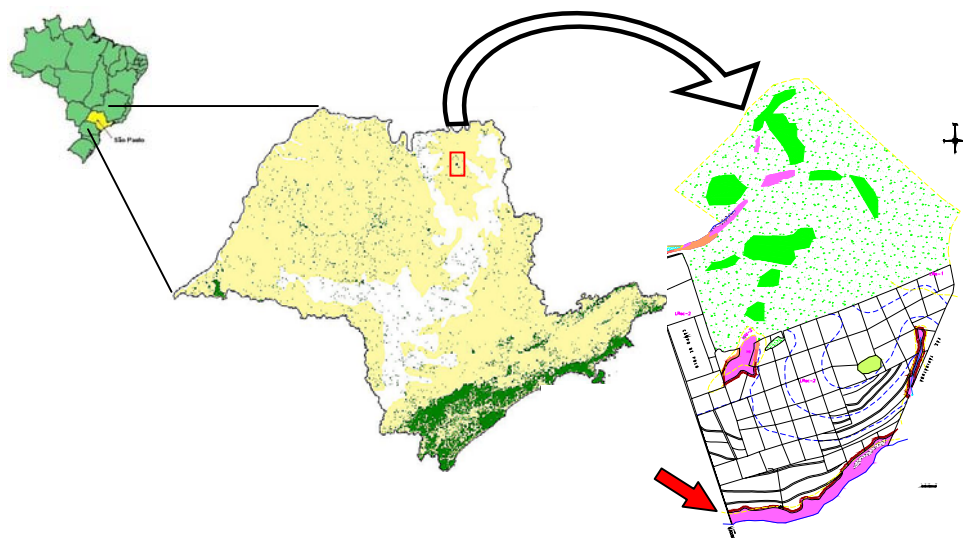


Figura 2.1 - Localização da Fazenda Mata Chica (Morro Agudo, SP) e da área experimental (seta menor)

não tenha demonstrado limitações críticas de P para as plantas, a adubação fosfatada foi realizada para garantir o suprimento (ou prevenir a deficiência) necessário à FBN em leguminosas, tendo em vista o alto requerimento de P neste processo (ISRAEL, 1987; SMITH, 1992; EDWARDS et al., 2006).

Foram plantadas espécies arbóreas pertencentes à família Fabaceae (Leguminosae) que comprovadamente nodulam (FARIA et al, 1987; FARIA; LIMA, 1998; FARIA, 2002) (Tabela 2.1). Para a superação da dormência, as sementes de *Bowdichia virgilioides*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Ormosia arborea* foram mantidas em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 10, 10 e 35 minutos, respectivamente, depois lavadas com água corrente (FOWLER; MARTINS 2001). As demais espécies não receberam nenhum tratamento de quebra de dormência nas sementes.

A semeadura foi feita diretamente no campo, com plantio manual. Cada parcela constituiu uma linha de 10 m. A densidade de plantio foi de 200 sementes por parcela, ou seja, 20 sementes por metro linear. As linhas foram identificadas por estacas. O espaçamento entre linhas é de 1,5 m, totalizando uma área útil de 0,2 ha. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 3 repetições. Cada bloco (repetição) foi formado por 16 parcelas; 8 delas com sementes sem inoculação, mais o mesmo número para as sementes inoculadas.

Tabela 2.1 - Espécies de Fabaceae plantadas por semeadura direta no município de Morro Agudo (SP)

<b>Nome científico</b>	<b>Sub-Família</b>	<b>Nome vulgar</b>
<i>Acacia polyphylla</i> DC.	Mimosoideae	monjoleiro
<i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth	Papilionoideae	sucupira-preto
<i>Enterolobium contortisiliquum</i> (Vell.) Morong	Mimosoideae	orelha-de-negro
<i>Erythrina speciosa</i> Andrews	Papilionoideae	mulungu-do-litoral
<i>Mimosa bimucronata</i> (DC.) O. Kuntze	Mimosoideae	maricá
<i>Ormosia arborea</i> (Vell.) Harms	Papilionoideae	olho-de-cabra
<i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth.) Brenan	Mimosoideae	angico-vermelho
<i>Poecilanthe parviflora</i> Benth.	Papilionoideae	coração-de-negro

Os inoculantes foram produzidos com estirpes de rizóbio devidamente selecionadas para cada espécie de leguminosa com base em experimentos em vasos com solo esterilizado e não esterilizado (FARIA, 2002). Exceção foi dada a *Acacia polyphylla* e *Ormosia arborea* que, não

havendo inoculantes específicos disponíveis, foram usados inoculantes para *A. mangium* e *O. nitida*, respectivamente. A inoculação foi feita um dia antes do plantio, misturando-se as sementes, levemente umedecidas, com o inoculante e mantendo-as à sombra (DE-POLLI; FRANCO, 1985; KEYSER, 1990).

Foram feitos levantamentos periódicos de campo. A emergência das plântulas foi avaliada durante os primeiros três meses após a semeadura (MAS), com base na contagem, em intervalos de 15 dias, dos indivíduos germinados. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação ao total de sementes plantadas. Por ocasião da estação seca, na última contagem realizada (3 MAS) considerou-se as mudas formadas como sobreviventes desta fase inicial, visto que a emergência de novas plântulas havia praticamente cessado. Com as mudas já estabelecidas, em cada parcela foram mantidas até 10 árvores, preferencialmente espaçadas em 1 m, para medição do crescimento. Para evitar competição, as demais árvores da linha sofreram um desbaste aos 10 MAS. O crescimento das plantas foi avaliado medindo-se a altura das árvores aos 13 meses após a semeadura.

Paralelamente às atividades de campo, foram realizados testes de germinação em laboratório (BRASIL, 1992) com as sementes das espécies utilizadas no experimento. A germinação de sementes, em teste de laboratório, é a emergência das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir planta normal sob condições favoráveis de campo (FIGLIOLIA et al., 1993). Para as sementes de *B. virgilioides* e *M. bimucronata* o teste foi realizado em caixas de acrílico com substrato de papel umedecido; para as demais sementes, de tamanho maior, foi utilizado o rolo de papel, também umedecido. Todas as sementes ficaram armazenadas em câmara de germinação sob temperatura de 25° C, de onde periodicamente eram retiradas e contadas as plântulas normais. Para cada espécie foram utilizadas 100 sementes, sendo o número total de plântulas normais expresso em porcentagem. Os testes foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Sementes do Dep. de Produção Vegetal ESALQ/USP.

Com os resultados no campo, as diferenças entre espécies e entre tratamentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e analisadas com auxílio do programa estatístico SAS. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). No caso da variável altura, em função das diferenças naturais relacionadas à velocidade de crescimento entre as espécies, a análise comparativa foi feita com base no efeito do tratamento (inoculação).

### 2.3 Resultados

O teste de germinação em laboratório revelou a capacidade germinativa das sementes que foram utilizadas no experimento, sendo capazes de germinar e produzir acima de 50% de plântulas normais, com exceção de *A. polyphylla*, que apresentou pouco mais de 30% (tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Resultados do teste de germinação em laboratório das sementes de Fabaceae utilizadas no experimento de campo (PN - plântulas normais)

Espécie	PN %	Espécie	PN %
<i>Acacia polyphylla</i>	34	<i>Mimosa bimucronata</i>	57
<i>Bowdichia virgilioides</i>	55	<i>Ormosia arborea</i>	80
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	91	<i>Parapiptadenia rigida</i>	88
<i>Erythrina speciosa</i>	78	<i>Poecilanthe parviflora</i>	57

Em condições de campo, houve grande variação entre as espécies, tanto na taxa quanto na velocidade de germinação. A emergência das plântulas de *A. polyphylla*, *E. contortisiliquum*, *M. bimucronata* e *P. rigida* ocorreu a partir de sementes germinadas nos primeiros 30 dias após a semeadura (DAS), enquanto que nas demais espécies (*B. virgilioides*, *E. speciosa*, *O. arborea* e *P. parviflora*) a germinação e emergência das plântulas se deu mais tardiamente (Figura 2.2).

Na última contagem (90 DAS), pôde-se observar uma maior taxa de germinação para *E. speciosa*, com até 45% de indivíduos germinados no campo, seguida por *P. parviflora* (Figura 2.3). Observou-se também a evidência de um baixo potencial germinativo das sementes pequenas, representadas aqui pelas espécies *B. virgilioides*, *M. bimucronata* e *P. rigida*, quando comparadas com as sementes maiores. A inoculação com rizóbio não causou diferenças significativas na germinação e emergência de plântulas (Figura 2.3).

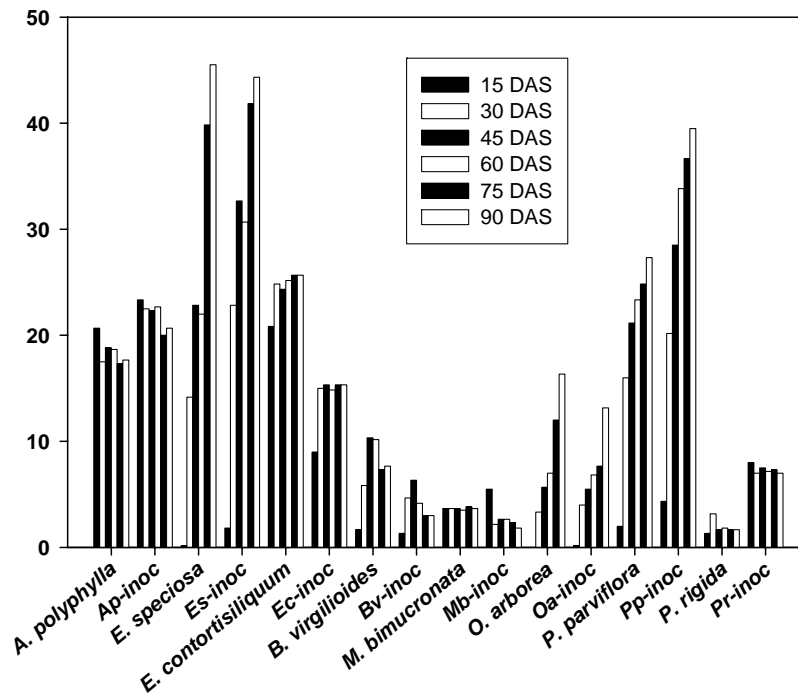


Figura 2.2 - Emergência (%) de plântulas de Fabaceae na área experimental, por época (médias de 3 repetições; DAS: dias após a semeadura; -inoc: tratamento com inoculação)

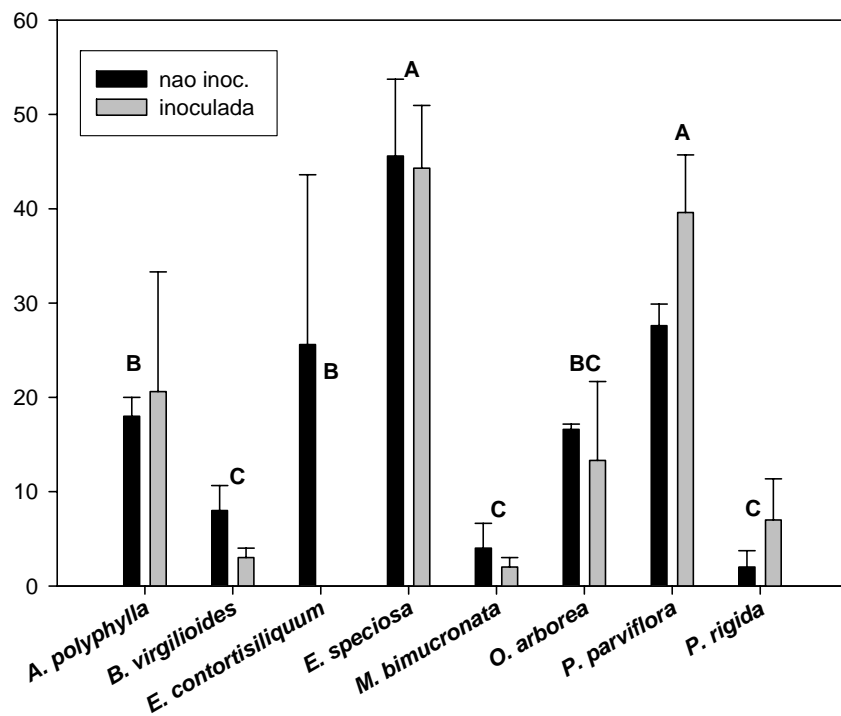


Figura 2.3 - Emergência (%) de plântulas de Fabaceae no campo experimental aos 3 meses após a semeadura (médias de 3 repetições; espécies com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%)



A diferença de altura observada entre as espécies deve-se às próprias características fenotípicas, relacionadas à velocidade de crescimento de cada planta. Para efeito de comparação, a planta que mais cresceu - *A. polyphylla* - apresentou um rápido desenvolvimento, atingindo 3 m de altura, seguida por *E. contortisiliquum* e *M. bimucronata*, que passaram facilmente de 1,5 m de altura aos 13 MAS (Figura 2.4). *P. rigida* e *P. parviflora* apresentaram um crescimento moderado, enquanto que para *B. virgilioides*, *O. arborea* e *E. speciosa* o crescimento foi bastante lento. Vale lembrar que foi observado, nas folhas destas duas últimas, alta incidência de herbivoria.

No presente experimento, a inoculação com rizóbio não causou diferenças significativas em relação ao crescimento em altura das árvores após 1 ano de plantio, com exceção de *Enterolobium contortisiliquum* e *Parapiptadenia rigida*. Apesar da baixa incidência de indivíduos germinados no campo, *P. rigida* foi a única espécie que mostrou resposta positiva à inoculação, em relação ao crescimento. No caso de *E. contortisiliquum*, as mudas oriundas de sementes não inoculadas cresceram mais do que as que tiveram a semente inoculada com rizóbio.

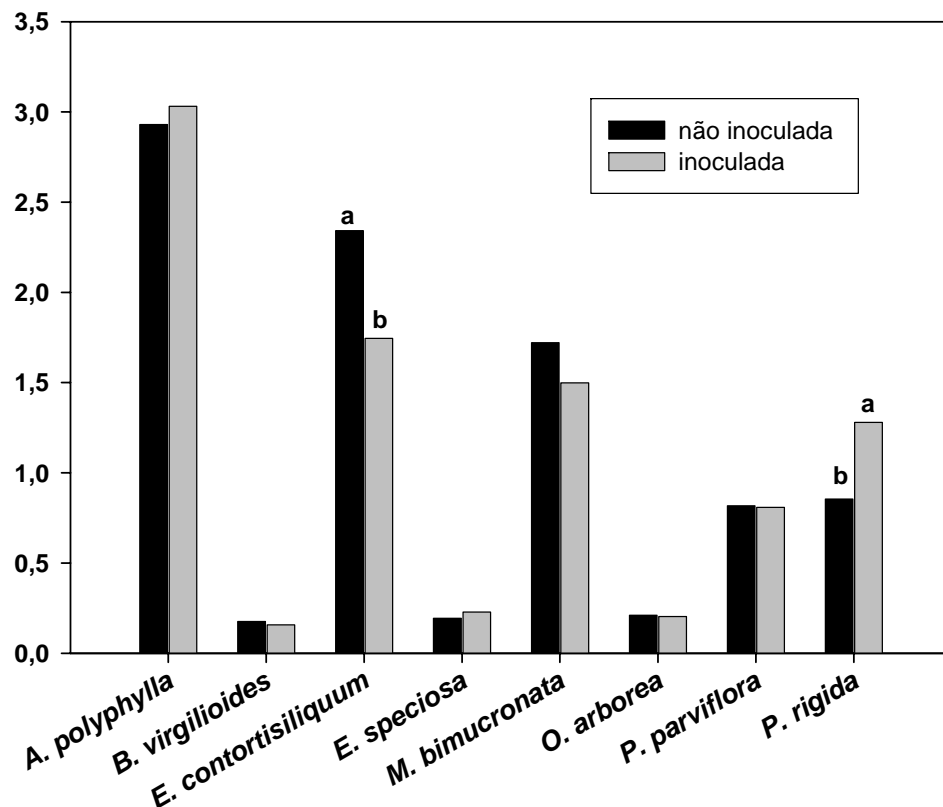


Figura 2.4 - Crescimento em altura (m) das mudas no experimento aos 13 meses após a semeadura (médias de 3 repetições; valores com letras diferentes, dentro da espécie, diferem entre si no teste de Tukey a 5%)

## 2.4 Discussão

O comportamento diferenciado entre as espécies quanto à velocidade de germinação pode gerar informações mais detalhadas que poderiam subsidiar a escolha de espécies em trabalhos de restauração florestal, seja para um rápido preenchimento da área ou para a composição de um banco de sementes, onde estas germinariam tardiamente, promovendo uma ocupação gradual da área e ocupando diferentes nichos. É importante ressaltar uma possível interferência no resultado devido à mortalidade de plântulas no campo entre as datas de contagem, fato este comprovado pela alta incidência de ataque de formigas cortadeiras na área experimental.

O baixa taxa de germinação de sementes pequenas no campo vem sendo confirmado por alguns autores em experimentos com semeadura direta de espécies florestais. Camargo et al. (2002) detectaram uma correlação positiva entre o tamanho das sementes e sua sobrevivência, concluindo que espécies de sementes grandes são mais apropriadas para a técnica de semeadura direta. Doust et al. (2006) também constataram um maior estabelecimento de espécies arbóreas de sementes maiores, em comparação com espécies de sementes de tamanho pequeno e intermediário.

A associação entre a planta e o microorganismo com vistas à FBN e seus efeitos relacionados decorrentes da aquisição do  $N_2$  atmosférico, como sobrevivência, maior crescimento, produção de biomassa, etc., têm mais chances de ocorrer em uma época posterior à germinação das sementes no campo. A formação do cordão de infecção necessária ao desenvolvimento dos nódulos depende de uma interação positiva entre hospedeiro e simbiote, que somente ocorre após o desenvolvimento das raízes e das primeiras folhas, em conjunto com o início da atividade fotossintética (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Isto faz com que diferenças provocadas pela inoculação só estejam presentes em um estágio mais avançado de crescimento, estando o sucesso com a germinação estritamente relacionado com a própria capacidade de desenvolvimento embrionário, associada aos fatores climáticos.

Nos indivíduos removidos em função do desbaste, foi observado o sistema radicular de algumas árvores. Não foram encontrados nódulos nas raízes de *Acacia polyphylla*. Abrangendo cerca de 1200 espécies, o gênero *Acacia* é de longe o mais numeroso da sub-família Mimosoideae. Embora a nodulação seja bastante comum, há várias espécies comprovadamente não-nodulantes (SPRENT, 1995). No presente experimento, além da ausência de nódulos, o

crescimento das árvores similar em ambos os tratamentos (inoculado e não inoculado) e o insucesso obtido na inoculação com estirpes selecionadas para *A. mangium* podem comprovar para esta espécie o status de testemunha leguminosa não-fixadora. Segundo Brockwell et al. (2005), há um número elevado de trabalhos cuidadosamente conduzidos relatando várias acácias que mostraram ausência de nódulos, entre elas *A. polyphylla* (FARIA et al., 1987; FARIA; LIMA, 1998).

A recomendação geral para o uso de inoculantes é feita com base nas condições de viveiro, onde os fatores externos são mais controlados, criando condições para uma associação planta-bactéria mais eficaz nos primórdios do desenvolvimento vegetal e minimizando as competições junto à rizosfera. Na ausência de maiores limitações ambientais, uma resposta positiva à inoculação somente é esperada quando árvores fixadoras de N<sub>2</sub> específicas (não-promíscuas, ou nodulantes com pouca variedade de estirpes de rizóbio) crescem em locais onde a densidade de rizóbio compatível é baixa ou nula (DOMMERCUES, 1995). No caso da SD no campo, a situação fica mais crítica, envolvendo competições com a microbiota do solo, estresse hídrico, possibilidade de radiação solar direta, disponibilidade de N mineral, presença de compostos xenobióticos, etc. Nessas condições, tanto a semente quanto o rizóbio do inoculante nela revestido ficam mais susceptíveis às pressões do clima e do ambiente (HUNGRIA; VARGAS, 2000), podendo comprometer seriamente o resultado esperado.

Além disso, a área experimental, tendo sido lavoura intensiva de cana-de-açúcar em um passado recente, provavelmente tem no solo resíduos de fertilizantes industriais, incluindo nitrogenados. A atividade da nitrogenase demanda alto custo energético para as plantas, conseqüentemente, a FBN pelas leguminosas é fatalmente inibida pela presença de N mineral nestes solos (GEESING et al, 2000; ZHANG; SMITH, 2002). Em relação ao balanço energético, as leguminosas evoluíram dos trópicos para ocupar ambientes com condições drásticas de sobrevivência e limitações ao crescimento vegetal, como o deserto australiano (SPRENT, 1995), onde muitas vezes não só o N é o fator mais limitante. Ainda segundo este autor, a vantagem competitiva das leguminosas arbóreas prevê o uso eficiente de diversas fontes de N, e que suas raízes sejam boas vasculhadoras do N do solo. Com isso, desenvolveram a capacidade não só em fixar o N<sub>2</sub> atmosférico, mas em adquirir este elemento do solo com máxima eficiência, incluindo aí a associação com fungos micorrízicos e o aproveitamento, inclusive, de N proveniente da matéria orgânica em decomposição (BODDEY et al., 2000).

Em ambos os tratamentos foram observados nódulos nas raízes. Em experimento de SD com *Acacia spp.* na Austrália, Thrall et al. (2005) constataram que não houve diferenças na colonização bacteriana entre tratamentos inoculados e não inoculados, mostrando que um pequeno traço de populações de rizóbio de ocorrência natural onde não foi feita inoculação foi hábil em proliferar suficientemente para iniciar o processo que leva à formação de nódulos. A presença de nódulos em *E. contortisiliquum*, nos dois tratamentos, pode indicar uma associação eficiente com a população de rizóbio nativa do solo e uma alta competitividade, apesar do crescimento inferior apresentado, das estirpes provenientes do inoculante em relação às nativas. Este aspecto foi observado por Okogune Sanginga (2003) em plantios de soja na África. Em experimento com *Acacia mangium* em condições silviculturais na Costa do Marfim, Galiana et al. (2002) relacionaram a ausência de diferença de crescimento entre plantas inoculadas e não-inoculadas com a nodulação induzida nas árvores pela população nativa de rizóbio. Futuros estudos, envolvendo o uso da biologia molecular (GRAHAM; VANCE, 2000) e de métodos de avaliação da FBN em árvores no campo (RADDAD et al., 2005), bem como a associação com fungos micorrízicos arbusculares (REQUENA et al., 2001) e a eficiência na absorção de outros nutrientes como o P (SMITH, 1992; STAMFORD et al., 1997) são necessários para uma melhor compreensão sobre a interação das leguminosas nativas e seus microsimbiontes, tanto na revegetação de áreas degradadas, quanto na melhoria das condições edafo-climáticas condicionantes ao surgimento de outras espécies mais exigentes.

De uma forma geral, as espécies estudadas variam em relação ao estabelecimento e crescimento no campo. Elas poderiam ser diferenciadas, de certo modo, entre *Acacia polyphylla* e *Enterolobium contortisiliquum*, que apesar de uma taxa de germinação mediana, compensaram com um crescimento extremamente rápido; *Mimosa bimucronata* e *Parapiptadenia rigida*, com crescimento relativamente rápido, porém baixo potencial germinativo no campo; *Erythrina speciosa* e *Poecilanthe parviflora*: apesar do lento crescimento, germinaram abundantemente, podendo ser eficientes para uma colonização mais rápida e ocupação de estratos inferiores do povoamento. A inoculação com rizóbio não apresentou diferenças no estabelecimento e crescimento inicial da maioria das espécies, nas condições de solo e clima locais. A seleção de estirpes capazes de ocupar o solo e formar associação eficiente com as árvores em diferentes regiões assume grande importância. Novos ajustamentos são necessários para um uso mais efetivo

da inoculação com rizóbio em sementes de leguminosas arbóreas nativas germinadas diretamente no campo, e o seu uso para a recuperação de áreas degradadas em larga escala.

## Referências

- ALMEIDA, N. O. **Implantação de matas ciliares por plantio direto utilizando-se sementes peletizadas**. 2004. 269p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2004.
- BARNETT, J. P.; BAKER, J. B. Regeneration Methods. In: DURYEY, M. L. E; DOUGHERTY, P. M. (Ed.) **Forest regeneration manual**. London: Kluwer Academic Publishers, 1991. p.35-50.
- BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of <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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: CLAV; DNDV; SNAD; MA, 365 p. 1992.
- BROCKWELL, J.; SEARLE, S. D.; JEAUVONS, A. C.; WAAYERS, M. **Nitrogen fixation in acacias: an untapped resource for sustainable plantations, farm forestry and land reclamation**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2005. 132p. (ACIAR Monograph, 115)
- CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K.; IMAKAWA, A. M. Rehabilitation of degraded areas of Central Amazonia using direct sowing of forest tree seeds. **Restoration ecology**. Oxford, v. 10, n. 4, p. 636-644, 2002.
- DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. **Inoculação de Sementes de Leguminosas**. Seropédica: Embrapa - UAPNPBS, 31p. 1985. (Embrapa-UAPNPBS Circular Técnica, 1)
- DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 4, n. 8, p. 144-152, 1990.
- DOMMERGUES, Y. R. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, n. 1/3, p. 215-230, 1995.
- DOUST, S J.; ERSKINE, P. D.; LAMB, D. Direct seeding to restore rainforest species: Microsite effects on the early establishment and growth of rainforest tree seedlings on degraded land in the wet tropics of Australia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 234, n. 1/3, p.333-343, 2006.
- EDWARDS, E. J.; McCAFFERY, S.; EVANS, J.R. Phosphorus availability and elevated CO<sub>2</sub> affect biological nitrogen fixation and nutrient fluxes in a clover-dominated sward. **New Phytologist**. Oxford, v. 169, p. 157-167, 2006.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1999. 412 p.
- ENGEL, V.L; PARROTA, J.A. An evaluation of direct seeding for restoration of degraded lands in central São Paulo state, Brazil. **Forest Ecology and Management**. Amsterdam, v. 152, p. 169-181, 2001.
- FARIA, S. M. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais** (aproximação 2001). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16p. (Embrapa-CNPAB Documentos, 134)
- 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.

- 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.
- FIGLIOLIA, M. B.; OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. Análise de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. (Coord.) **Sementes Florestais Tropicais**. Brasília: ABRATES. 1993. p. 137-174.
- FLORES-AYLAS, W. W. **Desenvolvimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta**: efeito de micorriza e fósforo. 1999. 81p. Tese (Mestrado em Agronomia/Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1999.
- FOWLER, J. A. P.; MARTINS, E. G. **Manejo de sementes de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 76p. (Embrapa-CNPQ Documentos, 58)
- 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.
- GALIANA, A.; BALLE, P.; N'GUESSAN KANGA, A.; DOMENACH, A. M. Nitrogen fixation estimated by the <sup>15</sup>N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 251-262, 2002.
- GEESING, D.; FELKER P.; BINGHAM F. L. Influence of mesquite (*Prosopis glandulosa*) on soil nitrogen and carbon development: Implications for global carbon sequestration. **Journal of Arid Environments**, Cambridge, v.46, n. 2, p. 157-180, 2000.
- GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2/3, p. 93-106, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2/3, p. 151-164, 2000.
- ISRAEL, D. W. Investigations of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiology**. Rockville, v. 84, p. 835-840, 1987
- KEYSER, H. **Inoculating tree legume seed and seedlings with Rhizobia**. Paia: Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legumes (NifTAL) Center, 1990. 2p.
- KÖEPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478 p.
- LAVELLE, P. Ecological Challenges for Soil Science. **Soil Science**, Philadelphia, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.
- OKOGUN, J. A.; SANGINGA, N. Can introduced and indigenous rhizobial strains compete for nodule formation by promiscuous soybean in the moist savanna agroecological zone of Nigeria? **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.38, p.26-31, 2003.
- PARROTTA, J. A.; KNOWLES, O.H. Restoration of tropical moist forest on bauxite-mined lands in Brazilian Amazon. **Restoration Ecology**, Oxford, v. 7, n.2, p.103-116, 1999.
- PRIMAVESI, A. **Manejo Ecológico do Solo**. São Paulo: NOBEL, 1999. 549p.
- RADDAD, E. Y.; SALIH, A. A.; EL FADL, M. A.; KAARAKKA, V.; LUUKKANEN, O. Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the <sup>15</sup>N natural abundance method. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 275, n. 1/2, p. 261-269, 2005.

REQUENA, N.; PEREZ-SOLIS, E.; AZCÓN-AGUILAR, C.; JEFFRIES, P.; BARIES, J. M. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, n. 2, p. 495-498, 2001.

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

RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. F. (Ed.) **Matas Ciliares: Conservação e Recuperação**. 3.ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo/Fapesp. 2004. p. 235-247.

RODRIGUES, R. R.; MARTINS, S. V.; BARROS, L. C. Tropical Rain Forest regeneration in an area degraded by mining in Mato Grosso State, Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 190, p. 323-333, 2004.

ROY, R. N.; MISRA R. V.; MONTANEZ, A. Decreasing Reliance on Mineral Nitrogen - Yet More Food. **AMBIO**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 177-183, 2002.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente / Instituto Florestal. Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo: Imprensa Oficial. 200p. 2005

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: Ministério da Educação/ABEAS; Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 236p.

SMITH, V. H. Effects of Nitrogen: Phosphorus Supply Ratios on Nitrogen Fixation in Agricultural and Pastoral Ecosystems. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 18, n. 1, p. 19-35, 1992.

SPRENT, J. I. Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4/5, p. 401-407, 1995.

STAMFORD, N. P.; ORTEGA, A. D.; TEMPRANO, F. ; SANTOS, D. R. Effects of phosphorus fertilization and inoculation of Bradyrhizobium and mycorrhizal fungi on growth of *Mimosa caesalpiniaefolia* in an acid soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 959-964, 1997.

THRALL, P. H.; MILLSON, D. A.; JEAUVONS, A. C.; WAAYERS, M.; HARVEY, G. R.; BAGNALL, D. J.; BROCKWELL, J. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 42, p. 740-751, 2005.

ZHANG, F.; SMITH, D. L. Interorganismal signaling in suboptimum environments: The legume-rhizobia symbiosis. **Advances in Agronomy**, New York, v. 76, p. 125-161, 2002.

### 3 Efeito da inoculação com rizóbio na abundância natural de $^{15}\text{N}$ de leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas plantadas por semeadura direta

#### Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação com rizóbio em alguns aspectos da dinâmica de N em folhas de leguminosas (Fabaceae) arbóreas nativas semeadas diretamente no campo, em área de mata ciliar no Estado de São Paulo. Para isso, foi usado o método da abundância natural do  $^{15}\text{N}$ . A concentração de N e a razão C/N foliar também foram avaliadas. Foram plantadas as espécies fixadoras de  $\text{N}_2$  *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze, *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, *Erythrina speciosa* Andrews, *Ormosia arborea* (Vell.) Harms e *Poecilanthe parviflora* Benth, inoculadas e sem inoculação, junto com *Acacia polyphylla*, usada como planta-referência não-fixadora de  $\text{N}_2$ . As espécies fixadoras de N mostraram  $\delta^{15}\text{N}$  médio de 2,7‰, enquanto que a referência *Acacia polyphylla* se mostrou cerca de 4,0‰ mais enriquecida em  $^{15}\text{N}$ . *Erythrina speciosa* e *Ormosia arborea* apresentaram os menores valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , enquanto que *Parapiptadenia rigida*, enriquecida em  $^{15}\text{N}$ , mostrou estar obtendo N exclusivamente do solo. *Poecilanthe parviflora*, *Mimosa bimucronata* e *Enterolobium contortisiliquum* apresentaram valores intermediários de  $\delta^{15}\text{N}$ , com grande variação entre os indivíduos amostrados. A concentração de N nos tecidos foliares variou entre 1,5% e 3,6%. De forma geral, esta variável não mostrou relação direta com o  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas. A menor razão C/N foi observada em *Enterolobium contortisiliquum* e *Erythrina speciosa*, seguida por *M. bimucronata*. Em nenhum dos parâmetros avaliados o tratamento utilizado (inoculação com rizóbio) mostrou diferença significativa. As espécies de crescimento mais lento e com alta incidência de herbivoria observados no campo (*E. speciosa* e *O. arborea*) foram também as que apresentaram  $\delta^{15}\text{N}$  na faixa considerada como de ocorrência da fixação biológica de nitrogênio. Os resultados indicam, para as outras espécies, maior aquisição de N proveniente do solo nas condições experimentais locais.

Palavras-chave: Semeadura Direta; Leguminosas Arbóreas; Abundância Natural de  $^{15}\text{N}$

#### Effect of rhizobia inoculation on the $^{15}\text{N}$ natural abundance of direct-seeded native legume (Fabaceae) trees

#### Abstract

The aim of this work was to assess the effect of rhizobia inoculation on some aspects of N dynamics in  $\text{N}_2$ -fixing legume trees planted in a riparian zone of São Paulo State, southeastern Brazil. The  $^{15}\text{N}$  natural abundance method was used. Foliar N concentrations and the C/N ratio were also determined. Seeds of  $\text{N}_2$ -fixing species *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong,



*Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze, *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, *Erythrina speciosa* Andrews, *Ormosia arborea* (Vell.) Harms and *Poecilanthe parviflora* Benth., inoculated and uninoculated with rhizobia, and *Acacia polyphylla* DC, used as a non-N<sub>2</sub>-fixing reference plant, were sown directly in the field. The N<sub>2</sub>-fixers showed an average foliar  $\delta^{15}\text{N}$  of 2,7‰, while the reference-plant was 4,0‰ more <sup>15</sup>N enriched. *Erythrina speciosa* and *Ormosia arborea* showed the lowest  $\delta^{15}\text{N}$  values. The high  $\delta^{15}\text{N}$  of *Parapiptadenia rigida* probably indicated that it is obtaining N exclusively from the soil. *Poecilanthe parviflora*, *Mimosa bimucronata* and *Enterolobium contortisiliquum* showed intermediate  $\delta^{15}\text{N}$  values, with strong variations among the individuals sampled. Foliar N concentrations varied from 1,5% to 3,6%. In general, N concentrations were not correlated with foliar  $\delta^{15}\text{N}$ . The lowest C/N ratio was observed on *E. contortisiliquum* and *E. speciosa*, followed by *M. bimucronata*. For all surveyed parameters, the rhizobia inoculation treatment did not show significant differences to the non-inoculated treatment. The slow-growing species, *E. speciosa* and *O. arborea*, that also had a high herbivore attack observed in the field, showed the lowest foliar  $\delta^{15}\text{N}$ , evidencing these plants were fixing N from the atmospheric air. The results suggested, for the other species, a larger soil N acquisition, in these field conditions.

Keywords: Direct Seeding; Legume Trees; <sup>15</sup>N Natural Abundance

### 3.1 Introdução

As áreas situadas às margens dos cursos d'água são protegidas por lei no território brasileiro, sendo destinadas à preservação permanente, com fins de restauração da cobertura florestal quando esta estiver sido suprimida. Conforme o Inventário Florestal do Estado de São Paulo, no período de 1962 a 1990-92 houve um decréscimo de 57,13% da cobertura vegetal natural do Estado, um índice alarmante. Atualmente, um dos principais problemas enfrentados para a conservação dos remanescentes florestais do Estado é sua extrema fragmentação. No Cerrado, por exemplo, os remanescentes estão distribuídos em cerca de 8.353 fragmentos (BIOTA, 2007). Na região sudeste em geral, devido ao estado de degradação das matas ciliares, além da extensão das áreas a serem recuperadas e da urgência para a execução desta tarefa, a adoção de técnicas que possam acelerar o processo de recomposição florestal assume extrema importância.

A semeadura direta, utilizada há décadas em reflorestamento com coníferas em países de clima temperado (DERR; MANN, 1971; HUNT; McMINN, 1988), recentemente vem sendo apreciada para a restauração de ecossistemas florestais nos trópicos (SUN et al., 1995; BARRON; DALTON, 1996; KNIGHT et al., 1998; BROFAS; KARETSOS, 2002). No Brasil, onde essa técnica ainda é pouco empregada, os trabalhos de pesquisa com fins ambientais têm se intensificado nos últimos anos (ENGEL; PARROTTA, 2001; CAMARGO et al., 2002). Utilizando-se sementes de leguminosas (Fabaceae) arbóreas, pode-se aliar a semeadura direta ao caráter pioneiro de diversos gêneros, aproveitando ainda a diversidade desta família nos trópicos e o potencial de fixação biológica de nitrogênio que muitas espécies apresentam em associação com microorganismos (SPRENT, 1995), para se tornar uma importante ferramenta de recuperação de ecossistemas degradados (FRANCO; FARIA, 1997).

Nos ecossistemas terrestres, onde foi removida a cobertura florestal e com ela rompida a manutenção dos ciclos biogeoquímicos de nutrientes (VITOUSEK; SANFORD, 1986), o nitrogênio é considerado o elemento mais limitante para o desenvolvimento das plantas (VITOUSEK; HOWARTH, 1991). A disponibilidade de N pode atuar como um mecanismo importante no controle da taxa, direção e substituição de espécies que regulam a sucessão. Em áreas degradadas, onde essa disponibilidade é baixa, as leguminosas arbóreas mostram-se como

uma fonte primária de nitrogênio capaz de permitir a recolonização vegetal e o aumento da biodiversidade (LAMB, 1980, apud CAMPELLO, 1998).

O diagnóstico da fixação biológica de nitrogênio (FBN) pelas árvores é um ponto fundamental para o estudo dessas espécies, tanto para o entendimento de seu papel ecológico no ciclo global do N, como para um manejo sustentável apropriado. A razão entre dois isótopos estáveis no nitrogênio,  $^{15}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}$ , variam na biosfera como resultado de fracionamento em processos físicos, químicos e biológicos. Com o auxílio da determinação da abundância natural dos isótopos ou via enriquecimento isotópico, constitui ferramenta única de avaliação direta da FBN, principalmente em condições de campo, em que outras técnicas se tornam inviáveis (HÖGBERG, 1997). Variações regulares da razão isotópica de N ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) podem gerar informações úteis a respeito das fontes de N utilizadas pelas plantas, bem como de aspectos relacionados ao fluxo de N nos ecossistemas. A estimativa baseada na concentração de N na biomassa e em métodos de diluição isotópica encontra dificuldades técnicas em áreas naturais ou em processo de restauração, principalmente para as árvores de maior tamanho, comprometendo a eficácia na avaliação da fixação de  $\text{N}_2$  (SPRENT; PARSONS, 2000). Em contrapartida, a avaliação do fracionamento isotópico pela abundância natural do  $^{15}\text{N}$  (SHEARER; KOHL, 1986) mostra-se promissora, pois representa um método não-destrutivo capaz de revelar aspectos do ciclo do nitrogênio sem perturbar o sistema com o uso de marcadores (HÖGBERG, 1997). Gathumbi et al (2002) confirmaram a utilidade do método da abundância natural do  $^{15}\text{N}$  para estimar a FBN em leguminosas arbóreas e herbáceas no campo. Isto pode ser testado através dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , que ficam entre 0 e 2 ‰ nas plantas que estão fixando  $\text{N}_2$  atmosférico, visto que o valor do  $\delta^{15}\text{N}$  do  $\text{N}_2$  atmosférico é 0 ‰ e considera-se que não há fracionamento isotópico durante o processo de FBN (SHEARER; KOHL, 1986).

O estudo da FBN pela abundância natural do  $^{15}\text{N}$ , amplamente difundido em sistemas agrícolas, tem se intensificado nas últimas décadas para o estudo da dinâmica do N em ecossistemas naturais, como a Floresta Amazônica (OMETTO et al., 2006; GEHRING et al., 2005; PONS et al., 2007) e o Cerrado brasileiro (BUSTAMANTE et al, 2004), e em leguminosas arbóreas crescendo naturalmente ou utilizadas em sistemas agroflorestais (RADDAD et al, 2005) ou em sistemas silviculturais puros (GALIANA et al., 2002). No entanto, para espécies destinadas à restauração florestal, o conhecimento sobre a capacidade de fixar  $\text{N}_2$ , sua participação no ciclo do nitrogênio e potencial contribuição para a reversão dos processos de degradação ainda é

escasso. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação com rizóbio na abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em folhas de leguminosas arbóreas crescendo no campo, plantadas por semeadura direta. Aspectos nutricionais das plantas, como concentração de N e razão C/N foliar, também foram avaliados.

### 3.2 Material e Métodos

#### 3.2.1 Área de estudo

O presente estudo foi realizado no município de Morro Agudo (figura 3.1), estado de São Paulo ( $20^{\circ}40'32''$  S;  $48^{\circ}04'23''$  W). O local, originalmente ocupado por mata ciliar sob domínio do contato Savana Florestada (Cerradão) / Floresta Estacional (SÃO PAULO, 2005), foi explorado pela lavoura canavieira em um passado recente e depois ficou ausente de manejo, em respeito à legislação referente às áreas de preservação permanente. À época da instalação do experimento, a condição da área era de um campo sujo, dominado principalmente por capim, em solo classificado como Latossolo Vermelho distroférico (EMBRAPA, 1999), cuja análise química de amostra de terra apresentou pH ( $\text{CaCl}_2$ ) 4,8; teor de matéria orgânica  $28 \text{ g dm}^{-3}$ ; P  $12 \text{ mg dm}^{-3}$ ; K, Ca, Mg e H+Al ( $\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ) 5, 38, 14 e 31, respectivamente. O clima local é tropical chuvoso, Cwa na classificação de Köppen (1948), com precipitação pluviométrica anual de 1530 mm e temperatura (médias mensais) máxima de  $28^{\circ}\text{C}$  e mínima de  $17^{\circ}\text{C}$  (Figura 3.2).

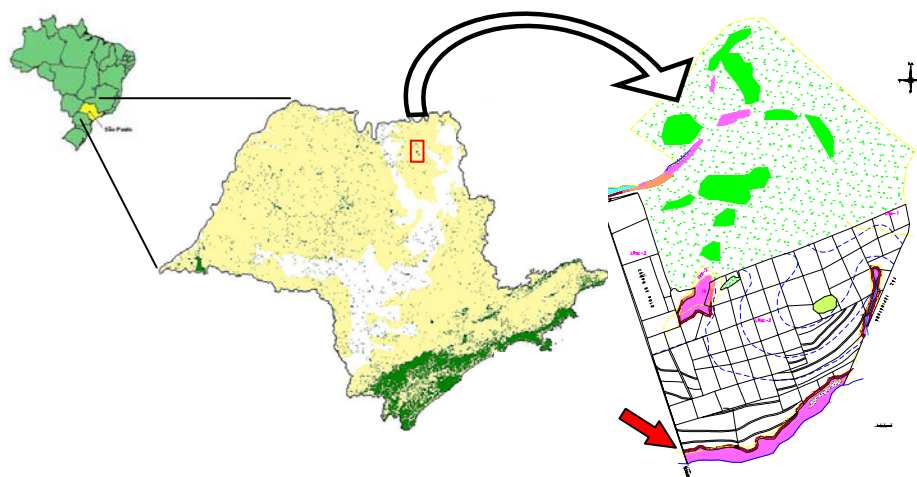


Figura 3.1 - Localização da Fazenda Mata Chica (mapa à direita), município de Morro Agudo (SP), do fragmento florestal de mesmo nome (seta maior) e da área experimental (seta menor); espaço em branco no mapa à direita representa o plantio de cana-de-açúcar

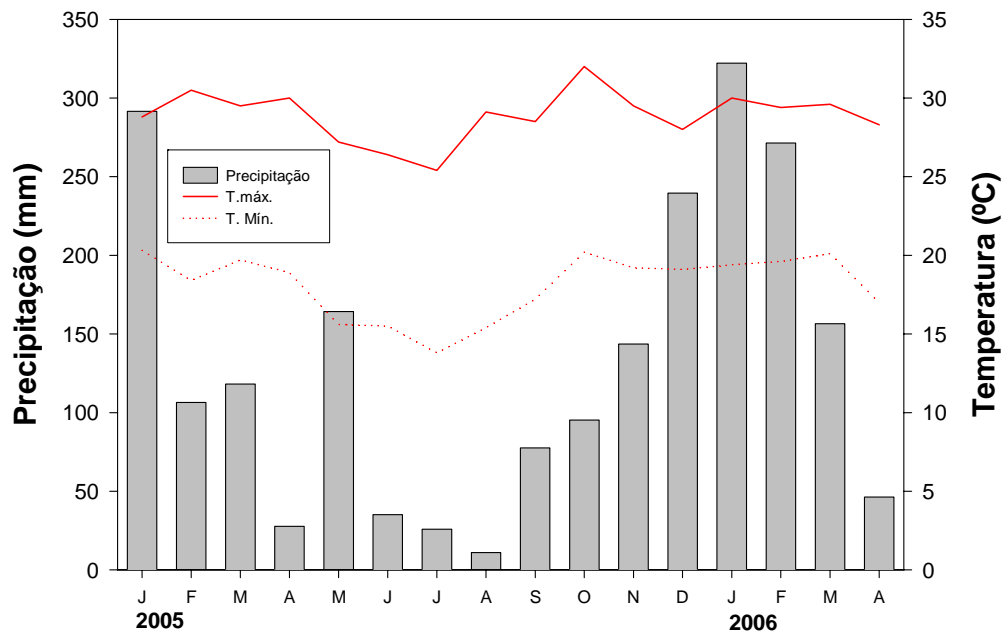


Figura 3.2 - Precipitação pluviométrica mensal e temperatura média (máxima e mínima) na época e região onde foi conduzido o experimento (Morro Agudo, SP)

### 3.2.2 Implantação do experimento

Foram plantadas espécies de leguminosas (Fabaceae) arbóreas fixadoras de N: *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze, *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Mimosoideae); *Erythrina speciosa* Andrews, *Ormosia arborea* (Vell.) Harms, *Poecilanthe parviflora* Benth (Papilionoideae); e uma leguminosa não-fixadora de N, *Acacia polyphylla* DC (Mimosoideae).

Na área de plantio foi realizada uma roçada, para remoção das gramíneas remanescentes, e após a limpeza, aração e gradagem, com o objetivo de destorroar o solo e eliminar o banco de propágulos de invasoras existente. Após essa etapa, uma sulcadora abriu as linhas (sulcos) de plantio onde ao mesmo tempo foi aplicado Superfosfato Triplo, na ordem de  $100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ . Embora o resultado da análise química do solo não tenha demonstrado limitações críticas de P para as plantas, a adubação fosfatada foi realizada para garantir o suprimento (ou prevenir a deficiência) de P necessário à FBN, caso ela ocorra, tendo em vista o alto requerimento deste elemento no processo (ISRAEL, 1987; EDWARDS et al., 2006).

A semeadura foi realizada diretamente no campo, cada parcela representada por linhas de 10 m de comprimento, com espaçamento de 1,5 m entre linhas. A densidade de plantio foi de 200 sementes por parcela (20 sementes por metro linear). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 4 repetições. Cada bloco (repetição) é constituído por 14 parcelas; 7 delas com sementes sem inoculação, mais o mesmo número para as sementes inoculadas.

Para a superação da dormência, as sementes de *Enterolobium contortisiliquum* e *Ormosia arborea* foram mantidas em ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 10 e 35 minutos, respectivamente, depois lavadas com água corrente (FOWLER; MARTINS, 2001). A inoculação foi feita um dia antes do plantio, misturando-se as sementes, levemente umedecidas, com o inoculante e mantendo-as à sombra (DE-POLLI; FRANCO, 1985; KEYSER, 1990).

Os inoculantes foram produzidos com estirpes de rizóbio devidamente selecionadas para cada espécie de leguminosa, com base em experimentos em vasos com solo esterilizado e não esterilizado (FARIA, 2002). Exceção foi dada a *Acacia polyphylla* e *Ormosia arborea*: não havendo inoculantes específicos disponíveis, para estas espécies foram usados inoculantes produzidos com estirpes desenvolvidas para *Acacia mangium* e *Ormosia nitida*, respectivamente. Sementes de *Acacia polyphylla* foram inoculadas visando à confirmação da ausência de nodulação para esta espécie, conforme verificado por Brockwell et al. (2005).

Estacas foram utilizadas para delimitar o início e o final das linhas de plantio (parcelas). Com vistas ao combate à infestação de plantas invasoras, prejudiciais ao crescimento das plântulas emergentes, foram feitas roçadas periódicas, manuais e com o uso de ferramentas, nas entrelinhas do plantio.

### **3.2.3 Determinação isotópica de N e concentração de N e C total em planta e solo**

Aos sete meses após a semeadura, em outubro de 2005, foram colhidas amostras de folha madura das mudas do experimento, para a determinação da abundância natural do <sup>15</sup>N (SHEARER; KOHL, 1986), além da concentração de nitrogênio total e razão C/N nas plantas. Foram amostradas folhas de três indivíduos em cada parcela, nas quatro repetições. As folhas foram retiradas na parte central do caule, com a máxima expansão observada, evitando não desfolhar as pequenas mudas. Para *Mimosa bimucronata* e *Parapiptadenia rigida*, o número de indivíduos amostrados por parcela foi relativamente menor, inclusive com parcelas perdidas, em

função do baixo índice de emergência de plântulas observado para essas espécies (dados não relatados). Foi coletado solo da área experimental, na profundidade de 0-5 cm, de onde foram retiradas 36 amostras para análise.

*Acacia polyphylla* foi utilizada como planta-referência não-fixadora de N. Foram colhidas folhas de árvores desta espécie também em um fragmento florestal localizado próximo à área experimental, conhecido como Mata Chica (figura 3.1). Três indivíduos foram amostrados, cada um contribuindo com duas sub-amostras de material foliar. O solo deste fragmento também foi colhido, em cinco pontos diferentes da floresta, também na profundidade de 0-5 cm.

O material foliar foi primeiramente seco em estufa a 65 °C por 72 h e depois moído a fino pó. As amostras de solo foram secas ao ar, em estufa a 50 °C e destorroadas em peneira de 2mm. Sub-amostras de solo foram obtidas através do quarteador de Jones, e destas foram removidas raízes e fragmentos de rocha ou carvão, para serem finalmente moídas. Do material previamente preparado, foram pesadas sub-amostras de 1,5 a 2 mg do material vegetal ou de 20 a 25 mg de solo, as quais foram acondicionadas em cápsulas de estanho. Essas cápsulas foram introduzidas num analisador elementar Carla Erba (modelo 1110, Milão, Itália), que por combustão determina a concentração de N e C total. O gás proveniente da combustão foi purificado numa coluna de cromatografia gasosa e introduzido diretamente num espectrômetro de massas para razões isotópicas ThermoQuest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT, Califórnia, EUA). O preparo do material, bem como suas análises, foi realizado no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA (Universidade de São Paulo).

Variações da razão  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  são expressas em desvio por milhar (‰) de um padrão internacionalmente reconhecido. Uma substância contendo maior quantidade do isótopo pesado em relação a uma outra substância é referida como “enriquecida” ou “mais pesada”, enquanto que uma substância contendo menos do isótopo pesado é descrita como “mais leve”. A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) é comumente usada para representar o fracionamento isotópico do nitrogênio, através da eq. (1):

$$\delta^{15}\text{N} = \left[ \left( \frac{R_{\text{amostra}}}{R_{\text{padrão}}} \right) - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

onde R é a razão molar  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  na amostra e no padrão. O padrão usado para o nitrogênio foi o ar atmosférico. A atropina foi utilizada como referência para o material foliar e LECO foi usado para o solo. O erro analítico aceitável para C, N e  $^{15}\text{N}$  foi de 0,30 %, 0,05% e 0,50‰, respectivamente.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software Statistica for Windows (STATSOFT Inc., 2004). O teste de Mann-Whitney — não paramétrico para amostras independentes — foi aplicado para verificar diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre as médias de  $\delta^{15}\text{N}$ , concentração de N e razão C/N dos tratamentos (com e sem inoculação) para cada uma das espécies fixadoras de  $\text{N}_2$  e entre estas e a referência não-fixadora de  $\text{N}_2$ , *A. polyphylla*. Este teste também foi utilizado para comparar os resultados dessas variáveis no solo da área experimental e no da mata adjacente. Apesar da diferença entre o número de amostras de solo coletadas nas duas áreas, o reduzido desvio padrão observado em ambas permitiu a realização dessa análise.

### 3.3 Resultados

O  $\delta^{15}\text{N}$  do solo coletado na área experimental foi 7,34‰ ( $\pm 0,16\%$ ), diferindo significativamente em relação ao  $\delta^{15}\text{N}$  do solo da mata fechada, com quase 2‰ a mais, em média. Houve diferenças entre as concentrações de N-total, de 0,16% contra 0,26% do fragmento próximo. No entanto, a razão C/N no solo de ambas as localidades foi similar, na faixa de 13.

O  $\delta^{15}\text{N}$  foliar médio das leguminosas estudadas, obtido a partir dos dados contidos na Tabela 1, foi de 2,69‰ ( $\pm 2,09\%$ ). Uma faixa de 5,8‰ foi observada entre os  $\delta^{15}\text{N}$  médios das espécies; 4,5‰ se forem contados somente as espécies fixadoras de N estudadas. Houve grande variação no  $\delta^{15}\text{N}$  entre as espécies. O valor mínimo foi de -0,67‰ para *Erythrina speciosa* e o máximo foi observado, entre as fixadoras de N, em *Enterolobium contortisiliquum* com 7,82‰. *Acacia polyphylla* obteve um  $\delta^{15}\text{N}$  máximo de 8,77‰ entre os indivíduos amostrados. Em relação à inoculação com rizóbio nas sementes plantadas, não foram observadas diferenças no  $\delta^{15}\text{N}$  foliar das mudas no campo, com exceção de *M. bimucronata* (Tabela 3.1).



Tabela 3.1 - Abundância natural de  $^{15}\text{N}$  (‰) e teor de N total (%) nos tecidos foliares de leguminosas arbóreas nativas, semeadas diretamente no campo, aos 7 meses após o plantio, em Morro Agudo - SP (médias de 4 repetições; número à direita do símbolo ( $\pm$ ) referente ao desvio em relação à média; dados com letras diferentes na mesma espécie e (\*\*)) diferem estatisticamente entre si em relação ao tratamento e à referência não-fixadora de N, respectivamente, pelo teste de Mann-Whitney,  $p \leq 0,05$ )

Espécies Fabaceae	$\delta^{15}\text{N}$		N total	
	Não-inoculada	Inoculada	Não-inoculada	Inoculada
	‰		%	
Fixadoras de N				
Papilionoideae				
Erythrina speciosa	1,48 $\pm$ 1,01**	1,37 $\pm$ 1,46**	3,53 $\pm$ 0,14**	3,36 $\pm$ 0,33**
Ormosia arborea	1,39 $\pm$ 0,43**	1,19 $\pm$ 0,74**	2,00 $\pm$ 0,15**	2,23 $\pm$ 0,21**
Poecilanthe parviflora	3,03 $\pm$ 1,49**	2,48 $\pm$ 1,28**	2,02 $\pm$ 0,14**	2,10 $\pm$ 0,24**
Mimosoideae				
Enterolobium contortisiliquum	3,17 $\pm$ 2,14**	2,82 $\pm$ 2,02**	3,37 $\pm$ 0,23**	3,28 $\pm$ 0,20**
Mimosa bimucronata	4,14 $\pm$ 2,08**a	5,18 $\pm$ 0,45**b	2,34 $\pm$ 0,10**a	3,09 $\pm$ 0,45**b
Parapiptadenia rigida	5,70 $\pm$ 0,71**	5,00 $\pm$ 1,29**	2,08 $\pm$ 0,65**	2,11 $\pm$ 0,34**
Planta referência não-fixadora				
Acacia polyphylla (plantada)	6,83 $\pm$ 1,28	6,99 $\pm$ 0,25	3,11 $\pm$ 0,19	3,06 $\pm$ 0,31
Acacia polyphylla (mata)	5,72 $\pm$ 1,06	..	2,62 $\pm$ 0,08	..

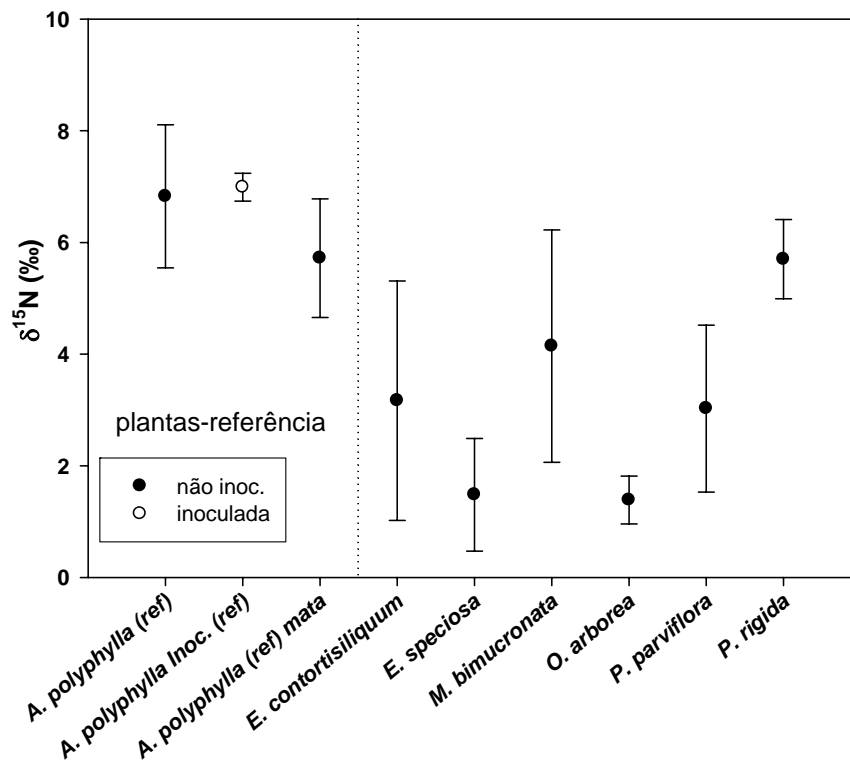


Figura 3.3 - Abundância natural de  $^{15}\text{N}$  (‰) nos tecidos foliares de leguminosas arbóreas fixadoras de N, não inoculadas com rizóbio, semeadas diretamente no campo, aos 7 meses após o plantio, em Morro Agudo - SP (médias de 4 repetições; círculo branco no valor médio corresponde ao tratamento inoculação de sementes de *Acacia polyphylla* com estirpes de rizóbio selecionados para *A. mangium*)

*A. polyphylla*, a referência não-fixadora de N<sub>2</sub>, mostrou um enriquecimento médio em <sup>15</sup>N cerca de 4‰ maior que as espécies fixadoras de N<sub>2</sub>. Os indivíduos de *A. polyphylla* coletados na floresta mostraram ser menos enriquecidos com <sup>15</sup>N (1,0 ‰ a menos em média), além de ter uma menor concentração de N em seu tecido foliar, comparado com os indivíduos plantados. O valor do  $\delta^{15}\text{N}$  foliar (média  $\pm$  desvio padrão) de *A. polyphylla* foi de  $6,83 \pm 1,28$  ‰ e os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  foliar encontrados para *Ormosia arborea* e *Erythrina speciosa* foram significativamente menores (dentro da faixa de valores considerada de FBN), indicando maior proporção do N<sub>2</sub> fixado da atmosfera na constituição de seus tecidos foliares (Figura 3.3). Embora alguns valores de  $\delta^{15}\text{N}$  das demais espécies estudadas tenham se mostrado similares aos de *A. polyphylla*, o teste de estatístico revelou diferenças significativas entre o  $\delta^{15}\text{N}$  da planta-referência e o das espécies fixadoras de N<sub>2</sub>.

Apesar do número máximo observado não ser desta espécie, as mudas de *Parapiptadenia rigida* apresentaram os maiores valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , estando bem próximos aos da planta-referência. *Poecilanthe parviflora*, *Mimosa bimucronata* e *Enterolobium contortisiliquum* apresentaram valores intermediários de  $\delta^{15}\text{N}$ , com grande variação entre os indivíduos amostrados, evidenciada pelo elevado desvio padrão do  $\delta^{15}\text{N}$  foliar encontrado (Figura 3.3; Tabela 3.1). Para estas espécies, a dependência maior pela aquisição do N<sub>2</sub> atmosférico ocorreu de forma individualizada; principalmente *E. contortisiliquum*, que no fracionamento isotópico teve indivíduos com valores de  $\delta^{15}\text{N}$  elevados, característicos de plantas-não fixadoras, contrastando com indivíduos que mostraram valores brutos próximo a 0 ‰ ou mesmo negativos, indicando possivelmente para estes uma maior proporção do N oriundo da FBN em suas folhas (Figura 3.4).

A sub-família Mimosoideae mostrou, em média, maior enriquecimento de  $\delta^{15}\text{N}$  nas folhas em comparação com a sub-família Papilionoideae, com 3,9‰ contra 1,8‰, respectivamente (Tabela 3.1). Uma tendência mais uniforme à maior utilização do N<sub>2</sub> atmosférico se revelou para *O. arborea* e *E. speciosa*. Da mesma forma, *P. rigida* teve um comportamento homogêneo: neste caso, todos os indivíduos amostrados mostraram ter obtido nitrogênio exclusivamente do solo (Figura 3.4).

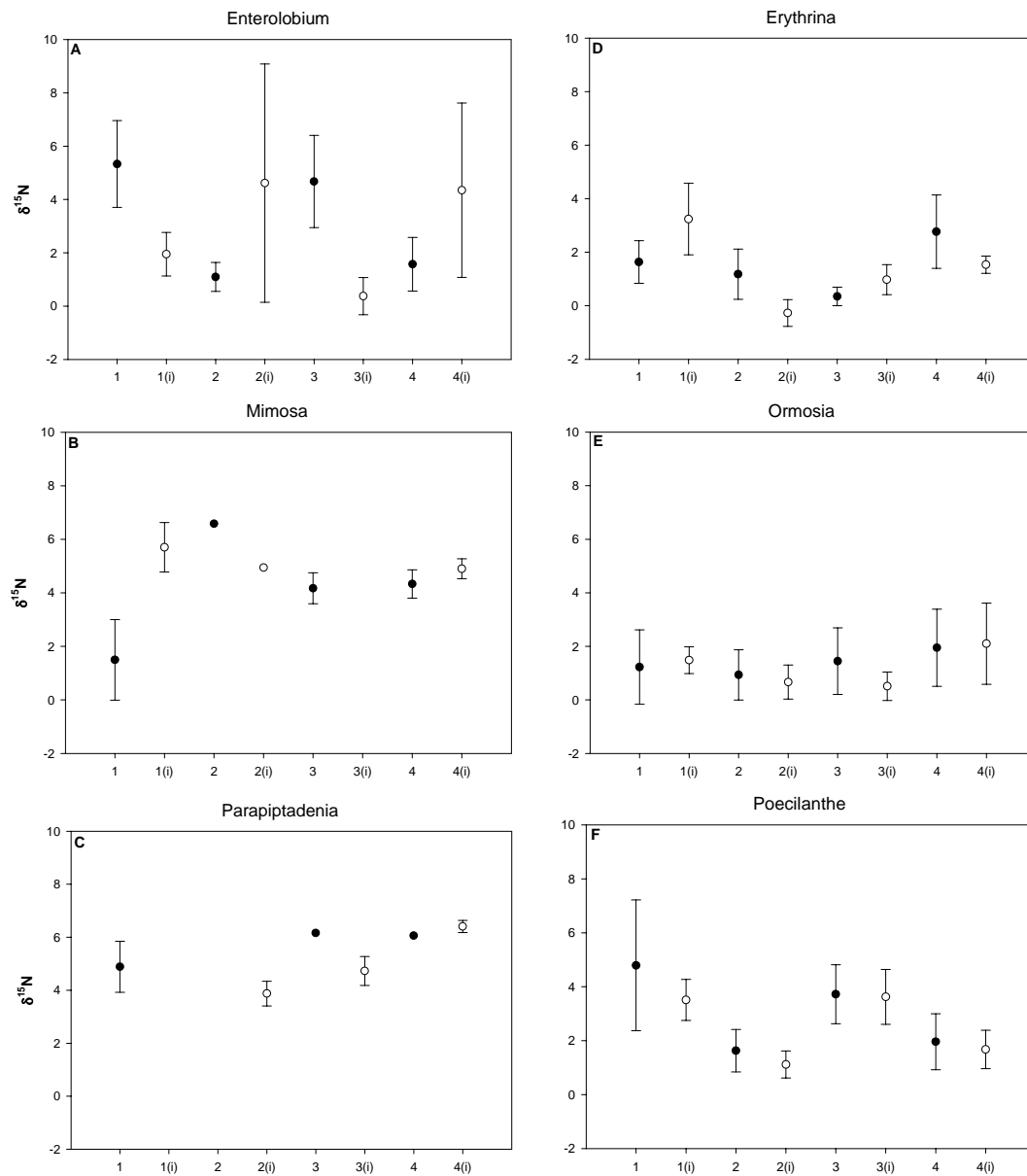


Figura 3.4 - Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) nos tecidos foliares de leguminosas arbóreas, distribuídos pelas repetições do experimento, aos 7 meses após a semeadura direta no campo em Morro Agudo, SP (A:*Enterolobium contortisiliquum*; B:*Mimosa bimucronata*; C:*Parapiptadenia rigida*; D:*Erythrina speciosa*; E:*Ormosia arborea*; F:*Poecilanthe parviflora*; linhas verticais indicam desvio em relação à média entre os indivíduos amostrados na parcela; círculo preenchido: sementes não-inoculadas com rizóbio; círculo branco: tratamento de sementes inoculadas com rizóbio, indicado também pelo símbolo (i) no eixo horizontal)

A concentração média de N foliar foi de  $2,7 \pm 0,68\%$ . Variou de 1,4% para alguns indivíduos de *P. rigida* até 3,6% em *E. speciosa*. Apesar de estas espécies serem, respectivamente,

as detentoras de maior e menor valor de  $\delta^{15}\text{N}$ , o teor de N nos tecidos foliares, de uma forma geral, não mostrou relação direta e significativa com o das plantas ( $r = 0,13$ ).

A razão C/N média foi 18, embora tenham ocorrido variações entre as espécies. *Enterolobium contortisiliquum* e *Erythrina speciosa*, seguidos por *M. bimucronata*, apresentaram razão C/N 14, enquanto que para as demais essa razão foi 22. A referência *A. polyphylla* teve razão C/N média de 15, um pouco menor que os indivíduos desta espécie encontrados na Mata Chica (Figura 3.5). O teste estatístico utilizado revelou diferenças significativas, tanto para a concentração de N quanto para a razão C/N foliar, entre a planta referência e as espécies fixadoras de  $\text{N}_2$  estudadas. Como foi observado com o  $\delta^{15}\text{N}$ , apenas *M. bimucronata* mostrou diferenças significativas para estas variáveis, em relação ao tratamento utilizado (inoculação).

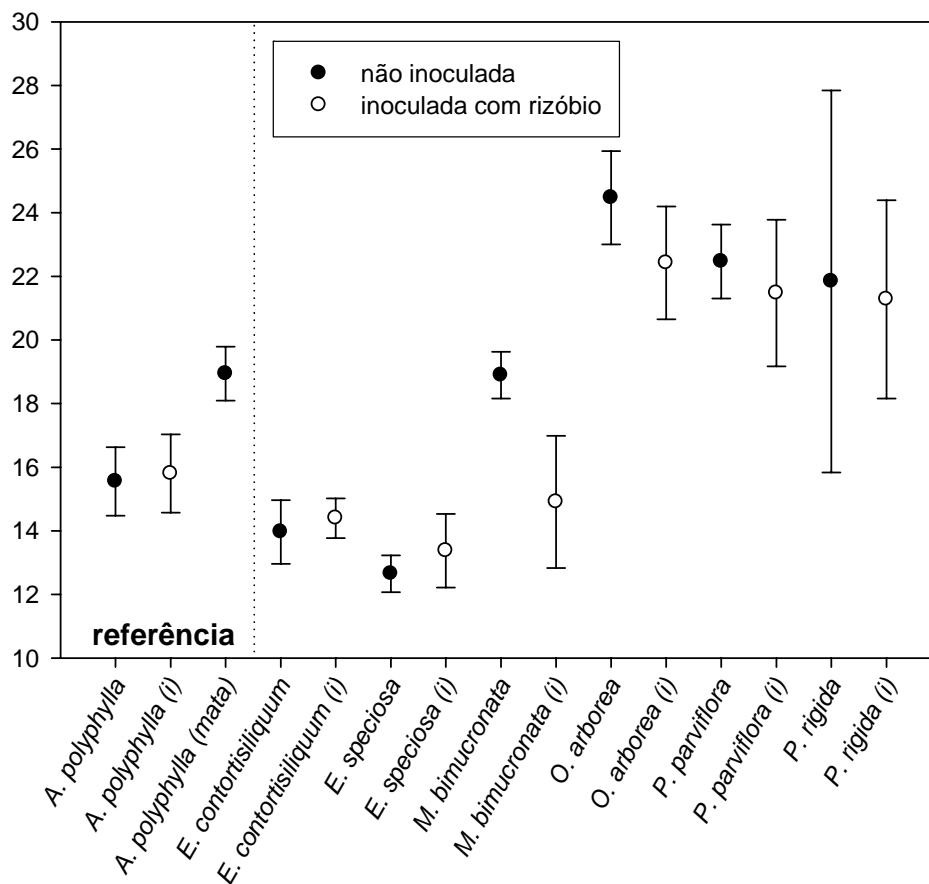


Figura 3.5 - Razão C/N nos tecidos foliares de leguminosas arbóreas plantadas por semeadura direta, aos 7 meses após o plantio, em Morro Agudo - SP (médias de 4 repetições; círculo branco no valor médio corresponde às sementes inoculadas (i); círculo preenchido corresponde às sementes não-inoculadas)

### 3.4 Discussão

Perdas de nitrogênio (denitrificação e lixiviação de nitrato) são conhecidas por causar enriquecimento em  $^{15}\text{N}$ , com valores maiores encontrados em solos com maior teor de argila (ROGGY et al., 1999a; PEREZ et al., 2006). N do solo muitas vezes é ligeiramente enriquecido em  $^{15}\text{N}$  como resultado de fracionamento durante os processos microbiológicos como a mineralização da matéria orgânica e denitrificação (HÖGBERG, 1997). O  $\delta^{15}\text{N}$  do solo da mata, ligeiramente inferior ao da área experimental, é provável resultado da ‘diluição’ do isótopo pesado do N pelas árvores fixadoras de  $\text{N}_2$ , representadas em grande número de indivíduos e espécies nesta floresta (RODRIGUES et al., dados não publicados), na medida em que suas folhas, menos enriquecidas em  $^{15}\text{N}$ , vão sendo depositadas sobre o solo, compondo a camada superficial. Este fenômeno foi detectado por alguns autores em solos de floresta tropical tomados por leguminosas fixadoras de  $\text{N}_2$  (BODDEY et al., 2000).

A Razão C/N observada no solo das duas áreas encontra-se num patamar dentro do desejável, segundo Attiwill e Adams (1993), para que a mineralização do N contido na camada orgânica superficial não seja insuficiente para a sua aquisição entre as plantas, devido à competição com a microbiota do solo por este elemento (desde que o material orgânico adicionado ao substrato também tenha baixa razão C/N).

Comparando sub-famílias, Roggy et al. (1999a) constataram uma maior contribuição de  $\text{N}_2$  fixado da atmosfera na nutrição de leguminosas da sub-família Papilionoideae em relação a Mimosoideae, tanto em solos arenosos quanto em solos com maior teor de argila, na floresta tropical da Guiana Francesa. Essa proporção se mostrou similar para as espécies plantadas no experimento, embora a pouca diferença e alta variação observada não possa permitir uma afirmação mais segura quanto à discriminação isotópica entre as sub-famílias.

A ausência de correlação entre os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  e concentração de N foliar, observada nas plantas estudadas, parece ser uma característica típica da família Fabaceae. Segundo Galiana et al. (2002), ela é esperada em se tratando de árvores fixando  $\text{N}_2$  ativamente. Em contrapartida, Gehring e Vlek (2004) observaram, em árvores da floresta amazônica, que a falta de correlações entre as concentrações de N foliar e os sinais de  $\delta^{15}\text{N}$  representou uma distinção a mais entre leguminosas e não leguminosas, tanto em fixadoras de  $\text{N}_2$  em potencial quanto em espécies de leguminosas não-fixadoras de  $\text{N}_2$ . Corroborando com esses resultados, Martinelli et al. (1999) e

Nardoto (2005) também encontraram relação direta entre os dois parâmetros, para espécies não-leguminosas da Amazônia.

A alta concentração de N foliar observada nas espécies estudadas está de acordo com o que Roggy et al. (1999b) encontraram para leguminosas, tanto fixadoras como não-fixadoras de  $N_2$ , na floresta tropical da Guiana Francesa. Isto sugere, segundo esses autores, que leguminosas florestais conseguem extrair grande quantidade de N do solo e que a FBN por essas árvores não deve ser considerada como vantagem competitiva e sim como uma entre várias formas possíveis de obtenção de nitrogênio. Alguns modelos sugerem que a aquisição de N via radicular é energeticamente mais vantajosa para as plantas, isto é, há um menor requerimento de fotossintato, do que fixar  $N_2$  atmosférico (VITOUSEK; FIELD, 2001). Tendo em vista o sucesso adaptativo que as espécies de Fabaceae apresentam em regiões como a do Cerrado brasileiro (SOLBRIG, 1996), parece que as condições edáficas provavelmente afetam mais a nodulação e a fixação de  $N_2$  do que o próprio estabelecimento e persistência dessas plantas no sistema (CREWS, 1999).

Devido ao preparo do solo e os cuidados necessários ao provimento de melhores condições ao estabelecimento das plantas semeadas diretamente no campo, esta fase inicial de recuperação do ambiente florestal teve características análogas à implantação de culturas agrícolas anuais, por exemplo. A perturbação mecânica do solo e o revolvimento de suas camadas superficiais provocado pelas máquinas estimulam a mineralização do N orgânico do solo (BODDEY et al., 2000) e, na ausência de fertilizantes sintéticos, constituem a principal fonte de N para o crescimento vegetal (ATTIWILL; ADAMS, 1993). Com isso, níveis elevados de FBN nesta fase inicial seriam pouco prováveis, principalmente em solos como o da área em estudo — que antes do plantio abrigava densa camada orgânica superficial — para se sobressaírem em estágios intermediários da sucessão vegetal (GEHRING et al., 2005), com as plantas em franco crescimento e o N do solo se tornando cada vez menos disponível.

Pela alta diluição de  $^{15}N$  observada, a FBN mostrou estar ocorrendo efetivamente em *Erythrina speciosa* e *Ormosia arborea*. Na maioria dos indivíduos de ambas as espécies foi observado alto índice de herbivoria no campo, provocado por formigas cortadeiras, prejudicando sensivelmente seu desenvolvimento, principalmente de *E. speciosa*. A reação a situações adversas como esta e, em função do seu lento crescimento, somada ao abafamento por plantas invasoras, além da dificuldade na aquisição de N nas camadas mais profundas do solo devido ao alcance limitado de suas raízes, pode ter induzido a FBN para essas espécies. Em florestas maduras,

Gehring et al. (2005) encontraram uma correlação positiva entre a biomassa vegetal e o  $\delta^{15}\text{N}$  foliar de leguminosas potencialmente fixadoras de  $\text{N}_2$ . O gênero *Erythrina* nodula com uma grande variedade de rizóbio. Faria (1993) observou ocorrência de nodulação, em vários níveis de eficácia, com estirpes isoladas de leguminosas de todas as três sub-famílias. Segundo Sprent e Parsons (2000), isto sugere que as competições com populações naturais no solo podem frustrar tentativas de inoculação com bactérias selecionadas para o aumento da FBN. Para as plantas em estudo, a interação com o rizóbio nativo levou a uma maior proporção do  $\text{N}_2$  fixado da atmosfera em suas folhas em ambos os tratamentos, em relação às demais espécies.

Conforme foi comentado na seção 3.2.3, o baixo índice de indivíduos de *M. bimucronata* submetidos à análise (Figura 3.4), aliado ao elevado desvio padrão observado entre as amostras coletadas (Tabela 3.1, Figura 3.3), impossibilita inferências seguras a respeito do efeito da inoculação com rizóbio no fracionamento isotópico das plantas desta espécie.

Embora Gehring et al. (2005), listando espécies de leguminosas na Amazônia, tenham relatado *Acacia polyphylla* como provavelmente nodulante, não foram encontrados nódulos nas raízes das mudas desta espécie. Essa observação é corroborada por Brockwell et al. (2005), confirmando para esta o status de não-fixadora de  $\text{N}_2$ . O gênero *Acacia* apresenta espécies conhecidamente nodulantes, sendo as australianas as mais estudadas quanto à FBN (SPRENT; PARSONS, 2000); no entanto, são muitas as espécies pan-tropicais, especialmente da África e América, relatadas como não-nodulantes (FARIA et al., 1987; FARIA; LIMA, 1998). Segundo Gehring e Vlek (2004), a proximidade taxonômica entre leguminosas não-fixadoras de  $\text{N}_2$  e outras famílias vegetais é um argumento em favor da escolha desse grupo de plantas como espécies-referência. Sprent et al. (1996) detectaram, na vegetação do Cerrado, altos sinais foliares de  $\delta^{15}\text{N}$  em leguminosas não-fixadoras de  $\text{N}_2$  em comparação com as não-leguminosas, o que contribui para uma posterior estimativa mais confiável da proporção do N derivado da atmosfera pelas leguminosas fixadoras de  $\text{N}_2$  em estudo.

A alta variação intra-específica observada pode ter sido originada por outros atributos do solo não relacionados com a FBN pela simbiose rizóbio-leguminosas na área em estudo. Fatores como o processo de fracionamento específico da aquisição e/ou assimilação de nitrogênio podem interferir significativamente no  $\delta^{15}\text{N}$  foliar (YONEYAMA et al., 1991). Segundo Högberg (1997), a alta variabilidade no  $\delta^{15}\text{N}$  indica diferentes caminhos na aquisição de nitrogênio. Este autor ainda afirma que as dinâmicas complexas do N do solo tornam difíceis os estudos detalhados da

abundância natural do  $^{15}\text{N}$  no estoque de N do solo, principalmente devido às mudanças dramáticas em curtos períodos de tempo provocadas pelo seu componente ativo.

Da mesma forma, a associação com fungos micorrízicos em uma determinada espécie exerce grande influência no seu acesso a fontes diferentes de N (inclusive orgânicas), conseqüentemente, no resultado do  $\delta^{15}\text{N}$  (HÖGBERG, 1990; HOBBIIE et al., 2000). A simbiose com fungos micorrízicos pode alterar o  $\delta^{15}\text{N}$  do nitrogênio transferido do fungo para as plantas hospedeiras. Segundo Hobbie et al. (2000), o mecanismo mais plausível para explicar baixos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  em tecidos foliares, para plantas não-fixadoras de  $\text{N}_2$ , se baseia no fato de um alto fracionamento isotópico durante a transferência de N de fungos micorrízicos para as plantas. Högberg (1990) encontrou maiores diferenças no fracionamento isotópico de espécies florestais africanas entre espécies associadas com ectomicorrizas e com micorrizas vesicular-arbusculares do que entre espécies fixadoras e não-fixadoras de  $\text{N}_2$ . Como essa associação é quase uma regra para a maioria de solos e plantas vasculares (READ, 1991), estudos devem ser aprimorados para avaliar o quão universal este fenômeno pode ser, ou mesmo se raízes não-micorrizadas apresentam esta mesma capacidade (BODDEY et al., 2000).

Os valores da razão C/N observados nos tecidos foliares das leguminosas plantadas no experimento evidenciou, junto com as elevadas concentrações de N foliar, a possibilidade de adição de uma fonte extra de N ao sistema, no caso da ocorrência da FBN e da indisponibilidade deste elemento no solo. Isto pode ser afirmado com base no modelo proposto por Parnas (1975), o qual sugere que um tecido vegetal com razão C/N abaixo de uma faixa crítica (20-30) promove uma rápida mineralização do N orgânico nele contido, devido ao favorecimento da atividade biológica durante o processo de decomposição deste material. Segundo Paul e Clark (1989), quando a razão C/N de resíduos agrícolas excede a marca de 25, o N tende a ser imobilizado no solo, tornando-se indisponível para as plantas. A baixa razão C/N observada em diversas espécies da família Fabaceae, muito desejada na rotação de culturas, em cultivos agrícolas consorciados (BODDEY et al., 1997) ou em sistemas agroflorestais — onde o material rico em N dessas plantas pode ser prontamente aproveitável para as culturas de interesse comercial — é aplicável quando se deseja acelerar o processo de sucessão ecológica na restauração de florestas, promovendo um maior e mais rápido aporte de N ao sistema necessário ao estabelecimento de espécies com maiores exigências nutricionais, características de estágios mais tardios.



Para as espécies estudadas, o melhor exemplo dessas possíveis contribuições pode ser creditado a *Erythrina speciosa* e *Enterolobium contortisiliquum*. A primeira, com alta concentração de N foliar (podendo estar associada com a elevada procura de suas folhas pelas formigas) e baixa razão C/N, além da ocorrência da FBN na área em estudo, confirma as evidências indiretas relatadas por Sprent e Parsons (2000) de uma positiva contribuição em N que o gênero *Erythrina* proporciona ao solo, responsável provavelmente pela sua difusão como cultivo intercalado ao café e coco e pela sua crescente aceitação em sistemas agroflorestais. *Enterolobium contortisiliquum*, de baixa razão C/N e com muitos indivíduos mostrando estarem fixando N<sub>2</sub> atmosférico, além do seu sucesso no estabelecimento no campo quando plantado por semeadura direta (ENGEL; PARROTTA, 2001) aliado ao rápido crescimento observado (dados não publicados), mostra-se promissora para a recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente. Todavia, em se tratando de restauração de florestas, é necessário que a incorporação de N ao sistema seja feita ao longo de um período de tempo superior ao esperado para a nutrição de plantas de ciclo curto, como as de interesse agrícola. Isto pode ser alcançado com o uso de um número maior de espécies, com diferentes padrões e velocidades de decomposição de seus resíduos (THOMAS; ASAKAWA, 1997). Além disso, para uma melhor compreensão da velocidade de decomposição e liberação de nutrientes do material vegetal ao sistema, alguns autores afirmam que a razão C/N deve ser acompanhada da análise de constituintes químicos, como a concentração de lignina e polifenóis (PALM; SANCHEZ, 1991; TIAN et al., 1992; CONSTANTINIDES; FOWNES, 1994).

Como foi sintetizado por Nadelhoffer et al. (1996), o  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas depende da fonte de N assimilado pelas mesmas, da profundidade do solo de onde o N é adquirido, da forma do N utilizado e, finalmente, da influência das associações com micorrizas e do fracionamento durante e após a absorção de N pelas plantas. Para se ter resultados seguros, o método da abundância natural do  $^{15}\text{N}$  prevê que os sinais de  $\delta^{15}\text{N}$  devem ser consideravelmente inferiores, em relação às plantas-referência (GEHRING; VLEK, 2004). Conforme a recomendação de Högberg (1997), a quantificação da FBN deve ser feita somente quando o  $\delta^{15}\text{N}$  foliar das espécies-referência tenham diferenças superiores a 5‰ em relação ao N derivado da FBN. Uma diferença significativa na constituição isotópica entre o N derivado do solo e o N<sub>2</sub> fixado é uma condição necessária, embora insuficiente, para o êxito no uso do método da  $\delta^{15}\text{N}$  para avaliar a FBN (ROGGY et al., 1999a). Galiana et al. (2002), com base em experimento de campo com plantios consorciados de

*Acacia mangium* e *Eucalyptus urophylla*, confirmam que a avaliação da fixação de N<sub>2</sub> por uma dada espécie não pode ser generalizada a partir de situações específicas, visto que muitos fatores ambientais afetam esse potencial, mesmo em uma área relativamente pequena.

Apesar do elevado número de trabalhos relacionados à FBN em leguminosas arbóreas encontrados na literatura, muitos são voltados para a dinâmica dessas plantas em florestas maduras ou em estágio avançado de sucessão secundária (MARTINELLI et al, 1999; GEHRING et al., 2005; OMETTO et al., 2006). Dessa forma, comparações devem ser feitas com cautela em relação a árvores jovens crescendo em solo exposto e/ou em áreas abertas com vistas à restauração florestal. As dificuldades em medir as taxas de FBN no campo, especialmente na vegetação perene, têm levado ao desenvolvimento e ao uso cada vez maior de técnicas usando isótopos estáveis que oferecem uma análise qualitativa capaz de discriminar a origem do N fixado pelas plantas (DAWSON et al., 2002). Devido às limitações metodológicas freqüentemente observadas na estimativa da FBN (BODDEY et al., 2000; GEHRING; VLEK, 2004), este trabalho evitou aproximações relacionadas, por exemplo, à proporção de N<sub>2</sub> derivado da fixação atmosférica, procurando relatar aspectos da dinâmica do N em espécies arbóreas jovens e evidências indiretas do papel da FBN no processo de restauração florestal.

No presente estudo, os resultados mostraram maior aquisição do N<sub>2</sub> atmosférico para algumas espécies, junto com evidências da ocorrência da FBN de forma pontual entre indivíduos da mesma espécie. Revelam também a possibilidade de comportamentos variados destas leguminosas em relação à aquisição e assimilação de N, não necessariamente relacionados com a simbiose com rizóbio, além da influência direta do histórico da área e do preparo do solo no fracionamento isotópico do N nas espécies estudadas durante essa fase inicial de seu desenvolvimento. Novos estudos sobre os diferentes processos de transformação do N no sistema solo-plantas, além das mudanças no  $\delta^{15}\text{N}$  das espécies ao longo do tempo, se fazem necessários para uma compreensão mais detalhada a respeito da dinâmica do nitrogênio em áreas degradadas, na busca por indicadores precisos de avaliação do potencial das leguminosas arbóreas no processo de retomada do ambiente florestal e de monitoramento de áreas sob restauração.

## Referências

ATTIWILL, P.M.; ADAMS, M.A. Nutrient cycling in forests. *New Phytologist*, New York, v. 124, n. 4, p. 561-582, Aug. 1993.

- BARRON, P.; DALTON, G. Direct seeding of native trees and shrubs in coastal environments. **Journal of Coastal Research**, Palm Beach, v. 12, n. 4, p.1006-1008, 1996.
- BIOTA/FAPESP. Disponível em: <<http://biota.org.br>>. Acesso em: 29 jan. 2007.
- BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 57, p. 235-270, 2000.
- BODDEY, R. M.; SÁ, J. C. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p.787-799, 1997.
- BROCKWELL, J.; SEARLE, S. D.; JEAUVONS, A. C.; WAAYERS, M. **Nitrogen fixation in acacias: an untapped resource for sustainable plantations, farm forestry and land reclamation**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 2005. 132p. (ACIAR Monograph, 115)
- BROFAS, G.; KARETSOS, G. Revegetation of mining spoils by seeding of woody species on Ghionia Mountain, Central Greece. **Land Degradation and Development**, Indianapolis, v. 13, n. 6, p. 461-467, 2002.
- BUSTAMANTE, M. M. C.; MARTINELLI, L. A.; SILVA, D. A.; CAMARGO, P. B.; KLINK, C. A.; DOMINGUES, T. F.; SANTOS, R. V.  $^{15}\text{N}$  natural abundance in woody plants and soils of central Brazilian savannas (cerrado). **Ecological Applications** (special issue), Washington, v. 14, n. 4, p. S200-S213, 2004.
- CAMARGO, J. L. C.; FERRAZ, I. D. K.; IMAKAWA, A. M. Rehabilitation of degraded areas of Central Amazonia using direct sowing of forest tree seeds. **Restoration ecology**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 636-644, 2002.
- CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.) **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, 1998. p.183-196.
- CONSTANTINIDES, M.; FOWNES, J. H. Nitrogen mineralization from leaves and litter of tropical plants: relationship to nitrogen, lignin and soluble polyphenol concentrations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 49-55, 1994.
- 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, Jul. 1999.
- DAWSON, T.E.; MAMBELLI, S.; PLAMBOECK, A.H.; TEMPLER, P.H.; TU, K.P. Stable isotopes in plant ecology. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 33, p. 507-559, 2002.
- DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. **Inoculação de sementes de leguminosas**. Seropédica: Embrapa-UAPNPBS, 1985. 31p. (Embrapa-UAPNPBS Circular Técnica, 1)
- DERR, H. J.; MANN, W. F. **Direct seeding pines in the South**. Washington: U.S.D.A Forest Service, 1971. 68p.
- EDWARDS, E. J.; McCAFFERY, S.; EVANS, J.R. Phosphorus availability and elevated CO<sub>2</sub> affect biological nitrogen fixation and nutrient fluxes in a clover-dominated sward. **New Phytologist**, New York, v. 169, p. 157-167, 2006.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Rio de Janeiro, 1999. 412 p.
- ENGEL, V. L.; PARROTA, J. A. An evaluation of direct seeding for restoration of degraded lands in central São Paulo state, Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 152, p. 169-181, 2001.

- 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***. Paia: NFTA, NFTRR Special Issue, 1993. p. 292-296.
- FARIA, S. M. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio para espécies florestais** (aproximação 2001). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16p. (Embrapa-CNPAB Documentos, 134)
- 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.
- 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.
- FOWLER, J. A. P.; MARTINS, E. G. **Manejo de sementes de espécies florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 76p. (Embrapa-CNPB Documentos, 58)
- 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.
- GALIANA, A.; BALLE, P.; N'GUESSAN KANGA, A.; DOMENACH, A. M. Nitrogen fixation estimated by the <sup>15</sup>N natural abundance method in *Acacia mangium* Willd. inoculated with *Bradyrhizobium* sp. and grown in silvicultural conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 251-262, 2002.
- GATHUMBI, S. M.; CADISCH, G.; GILLER, K. E. <sup>15</sup>N natural abundance as a tool for assessing N<sub>2</sub>-fixation of herbaceous, shrub and tree legumes in improved fallows. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 8, p.1059-1071, 2002.
- GEHRING, C.; VLEK, P. L. G. Limitations of the <sup>15</sup>N natural abundance method for estimating biological nitrogen fixation in Amazonian forest legumes. **Basic and Applied Ecology**, Stuttgart, v. 5, n. 6, p.567-580, 2004.
- GEHRING, C.; VLEK, P. L. G.; SOUZA, L. A. G.; DENICH, M. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central Amazonia. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 111, n.1/4, p.237-252, 2005.
- HOBBIE, E. A.; MACKO, S. A.; WILLIAMS, M. Correlations between foliar δ<sup>15</sup>N and nitrogen concentrations may indicate plant-mycorrhizal interactions. **Oecologia**, New York, v. 122, p. 273-283, 2000.
- HÖGGERG, P. <sup>15</sup>N natural abundance as a possible marker of the ectomycorrhizal habit of trees in mixed African woodlands. **New Phytologist**, New York, v. 115, p. 483-486, 1990.
- HÖGGERG, P. <sup>15</sup>N natural abundance in soil-plant systems **New Phytologist**, New York, v. 137, p.179-203, 1997
- HUNT, J. A.; McMINN, R. G. Mechanical site preparation and forest regeneration in Sweden and Finland: implications for technology transfer. British Columbia Forest Service. **Forestry FRDA Report**, Ontario, v. 31. 1988. 58p.
- ISRAEL, D. W. Investigations of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, p. 835-840, 1987.
- KEYSER, H. **Inoculating tree legume seed and seedlings with Rhizobia**. Paia: Nitrogen Fixation in Tropical Agricultural Legumes (NifTAL) Center, 1990. 2p.
- KNIGHT, A. J. P.; BEALE, P. E.; DALTON, G. S. Direct seeding of native trees and shrubs in low rainfall areas and on non-wetting sands in South Australia. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 39, n. 3, p. 225-239, 1998.
- KÖEPPEN, W. **Climatologia**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 478 p.

- MARTINELLI, L. A.; PICCOLO, M. C.; TOWNSEND, A. R.; VITOUSEK, P. M.; CUEVAS, E.; MCDOWELL, W.; 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.
- NADELHOFFER, K. J.; SHAVER, G.; FRY, B.; GIBLIN, A.; JOHNSON, L.; McKANE, R.  $^{15}\text{N}$  natural abundance and N use by tundra plants. **Oecologia**, New York, v. 107, p. 386-394, 1996.
- NARDOTO, G. B. **Abundância natural de  $^{15}\text{N}$  na Amazônia e Cerrado** – implicações para ciclagem de nitrogênio. 2005. 100p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- OMETTO, J. P. H. B.; EHLERINGER, J. R.; DOMINGUES, T. F.; BERRY, J. A.; ISHIDA, F. Y.; E. MAZZI; HIGUCHI, N.; FLANAGAN, L. B.; NARDOTO, G. B.; MARTINELLI, L. A. The stable carbon and nitrogen isotopic composition of vegetation in tropical forests of the Amazon Basin, Brazil. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v.79, p.251-274, 2006.
- PALM, C.A.; SANCHEZ, P.A. Nitrogen release from the leaves of some tropical legumes as affected by their lignin and polyphenolic contents. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 83-88, 1991.
- PARNAS, H. Model for decomposition of organic material by microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 7, p. 161-169, 1975.
- PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. 275 p.
- PÉREZ, T.; GARCIA-MONTIEL, D.; TRUMBORE, S.; TYLER, S.; CAMARGO, P. de; MOREIRA, M.; PICCOLO, M.; CERRI, C. Nitrous oxide nitrification and denitrification  $^{15}\text{N}$  enrichment factors from Amazon forest soils. **Ecological Applications**, Washington, v. 16, n. 6, p.2153-2167, 2006.
- PONS, T. L.; PERREIJN, K.; KESSEL, C. van; WERGER, M. J. A. Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest:  $^{15}\text{N}$  natural abundance measurements supported by experimental isotopic enrichment. **New Phytologist**, New York, v. 173, p. 154-167, 2007.
- RADDAD, E. Y.; SALIH, A. A.; EL FADL, M. A.; KAARAKKA, V.; LUUKKANEN, O. Symbiotic nitrogen fixation in eight *Acacia senegal* provenances in dryland clays of the Blue Nile Sudan estimated by the  $^{15}\text{N}$  natural abundance method. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 275, n. 1/2, p. 261-269. 2005.
- READ, D. J. Mycorrhizas in ecosystems: Nature’s response to the ‘Law of the Minimum’. In: HAWKSWORTH, D. L. (Ed.) **Frontiers in mycology**. Washington: CAB International, 1991. p. 101-130.
- ROGGY, J. C.; PRÉVOST, M. F.; GARBAYE, J.; DOMENACH, A. M. Nitrogen cycling in the tropical rain forest of French Guiana: comparison of two sites with contrasting soil types using  $\delta^{15}\text{N}$ . **Journal of Tropical Ecology**, New York, v. 15, p.1-22, 1999a.
- ROGGY, J.C.; PREVOST, M.F.; GOURBIERE, F.; CASABIANCA, H.; GARBAYE, J.; DOMENACH, A.M. Leaf natural  $^{15}\text{N}$  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**, New York, v. 120, n. 2, p. 171-182, 1999b.
- SÃO PAULO (estado). Secretaria do Meio Ambiente / Instituto Florestal. **Inventário florestal da vegetação natural do estado de São Paulo**. Imprensa Oficial. 200p. 2005
- SHEARER, G.; KOHL, D. H.  $\text{N}_2$  Fixation in Field Settings - Estimations Based on Natural  $^{15}\text{N}$  Abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood Victoria, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986.
- SOLBRIG, O.T. The diversity of the savanna ecosystem. In: SOLBRIG, O.T.; MEDINA, E.; SILVA, JA. (Ed.). **Biodiversity and savanna ecosystem processes**. Heidelberg: Spring-Verlag, 1996. p. 1-27.

SPRENT, J. I. Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4/5, p. 401-407, 1995.

SPRENT, J. I.; PARSONS, R. Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n.2/3, p. 183-196, 2000.

SPRENT, J. I.; GEOGHEGAN, I. E.; WHITTY, P. W.; JAMES, E. K. Natural abundance of <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C in nodulated legumes and other plants in the cerrado and neighboring regions of Brazil. **Oecologia**, New York, v. 105, p. 440-446, 1996.

STATSOFT Inc. **Statistica** (data analysis software system), version 6. 2004.

SUN, D.; DICKINSON, G. R.; BRAGG, A. L. Direct seeding of *Alphitonia petriei* (Rhamnaceae) for gully revegetation in tropical northern Australia. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 73, n. 1/3, p. 249-257, 1995.

THOMAS, R. J.; ASAKAWA, N. M. Decomposition of leaf litter from tropical forage grasses and legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p.1351-1361, 1993.

TIAN, G.; KANG, B. T.; BRUSSAARD, L. Biological effects of plant residues with contrasting chemical compositions under humid tropical conditions – decomposition and nutrient release. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 1051-1060, 1992.

VITOUSEK, P. M.; SANFORD, R. L. Nutrient Cycling in Moist Tropical Forest. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 17, p. 137-167, 1986.

VITOUSEK, P. M.; HOWARTH, R. W. Nitrogen Limitation on Land and in the Sea - How Can It Occur. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 13, n. 2, p. 87-115, 1991.

VITOUSEK, P.M.; FIELD, C.B. Input/output balances and nitrogen limitation in terrestrial ecosystems. In: SCHULZE, E-D; HEIMANN, M.; HARRISON, S.; HOLLAND, E.; LLOYD, J.; PRENTICE, I.C.; SCHIMMEL, D. (Eds.). **Global Biogeochemical Cycles in the Climate System**. San Diego: Academic Press, 2001. p. 217-225.

YONEYAMA, T; OMATA, T; NAKATA, S; YAZAKI, J. Fractionation of nitrogen isotopes during the uptake and assimilation of ammonia by plants. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 32, p. 1211-1217, 1991.

## APÊNDICE

## APÊNDICE - Semeadura direta de leguminosas florestais em plantios puros e mistos

Dados relativos à germinação e crescimento de sementes de espécies florestais em ambientes onde se deseja recompor a biodiversidade devem ser norteados por uma similaridade o maior quanto for possível das condições naturais, admitindo-se com isso um maior número de espécies por unidade de área. Nos capítulos (2 e 3) os experimentos constaram de parcelas com árvores de uma só espécie plantada, com a tentativa de analisar o efeito da inoculação com rizóbio nas sementes, além de observar, de forma isolada, o desempenho de cada espécie quando plantada no campo por semeadura direta. A adoção do plantio puro nos capítulos supracitados teve como premissa fundamental seguir os princípios básicos da experimentação, com o objetivo de facilitar as análises posteriores.

No reflorestamento de áreas destinadas à preservação permanente, os aspectos silviculturais relacionados à exploração da madeira e outros usos deixam de ter máxima importância para dar lugar a outros atributos, como atração da fauna, proteção do solo e dos mananciais, etc. Com isso, a introdução de árvores de diferentes espécies florestais semeadas no mesmo local pode permitir a ocupação de estratos distintos, em função dos diferentes padrões de crescimento característicos das plantas em estudo.

Com vistas à observação do estabelecimento e do padrão de crescimento das espécies estudadas em conjunto, foi realizado um plantio ‘misto’ (sementes de todas as espécies), na mesma data do plantio ‘puro’ (sementes de 1 espécie por parcela) descrito no experimento 1 (**capítulo 2**). Para testar esses dois tratamentos, foram avaliados o estabelecimento e o crescimento inicial das plantas. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com três repetições. As sementes utilizadas neste ensaio não receberam inoculação com rizóbio. A superação da dormência das sementes foi realizada da mesma forma e nas mesmas espécies que no experimento 1.

A densidade de sementes nos plantios mistos foi de 20 sementes.espécie<sup>-1</sup> em cada parcela. Do número de indivíduos germinados em relação a esse total, determinou-se a porcentagem de germinação/sobrevivência em cada espécie (com exceção de *E. speciosa*), para efeito comparativo com o plantio puro, aos 3 meses após a semeadura.

A medição de altura foi realizada aos 10 meses após a semeadura (MAS). As árvores amostradas no plantio puro foram as mesmas do experimento 1 (3 meses antes). Na mesma data



foi medida a altura das árvores no plantio misto, baseado nas médias do número total de indivíduos crescendo em cada parcela.

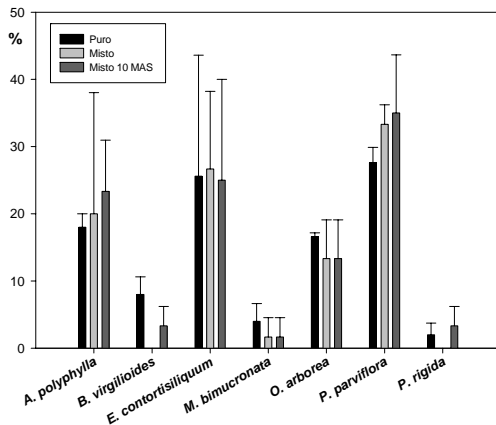


Figura 1. Emergência (%) de plântulas de Fabaceae em plantio puro aos 3 meses e plantio misto aos 3 e 10 meses após a semeadura direta no campo (médias de 3 Repetições)

A porcentagem de germinação /sobrevivência das mudas no campo experimental pode ser vista na Figura 1. Foi incluído também o dado referente à contagem de indivíduos nas linhas de plantio à época da medição de altura, ou seja, 7 meses depois, indicando que algumas sementes germinaram nesse período. De uma forma geral, as espécies plantadas em conjunto tiveram o mesmo comportamento que

plantadas puras, em relação à porcentagem de plântulas emergentes. O baixo potencial das sementes pequenas se mostrou ainda mais evidente, possível consequência do

abafamento provocado pelas plântulas de outras espécies.

A velocidade de crescimento também foi parecida nos dois tratamentos. A altura observada das árvores plantadas puras foi ligeiramente superior à das árvores do plantio misto, principalmente para *Poecilanthe parviflora* (Figura 2). A competição interespecífica, incluindo os efeitos de um maior sombreamento, pode ter influenciado o crescimento inferior médio observado nos plantios mistos. *Acacia polyphylla*, por ocupar os estratos superiores entre as árvores das outras espécies, não apresentou este comportamento, embora o desvio padrão elevado indique pouca uniformidade na altura das plantas nesse tratamento. Embora *Parapiptadenia rigida* esteja mostrando uma condição contrária às demais, o número de indivíduos (n) que tiveram a altura mensurada foi muito pequeno, em função do seu baixo potencial germinativo. Para esta espécie, além de *Bowdichia virgilioides* e *Mimosa bimucronata*, o baixo n impede que se façam maiores inferências sobre diferenças reais de crescimento, quando semeadas em plantios puros ou mistos.

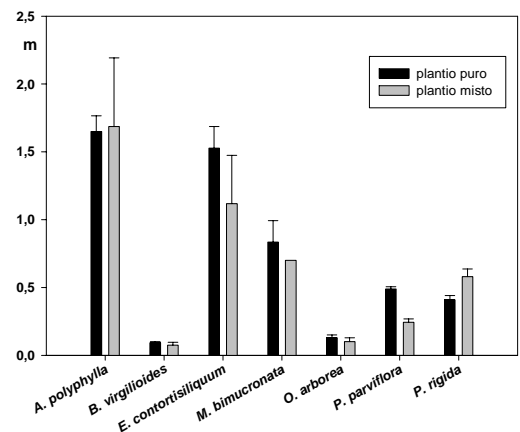


Figura 2. Crescimento em altura (m) das mudas de Fabaceae aos 10 meses após a semeadura direta no campo (médias de 3 repetições)

ANEXO



Foto 1 - Instalação do experimento: roçada na área experimental da fazenda Mata Chica, município de Morro Agudo (SP)



Foto 2 - Instalação do experimento: retirada da vegetação na área experimental



Foto 3 - Área experimental com o preparo do solo e as parcelas delimitadas, 25 dias após a semeadura direta de leguminosas florestais



Foto 4 - Leguminosas arbóreas crescendo na área experimental, 13 meses após a semeadura (MAS) direta



Foto 5 - Vista geral do experimento, 6 MAS



Foto 6 - Vista geral do experimento, 13 MAS



Foto 7 - Limpeza de plantas invasoras nas entrelinhas de plantio



Foto 8 - *Acacia polyphylla*



Foto 13 - *Enterolobium contortisiliquum*



Foto 9 - *Poecilanthe parviflora*



Foto 14 - *Mimosa bimucronata*



Foto 10 - *Erythrina speciosa*



Foto 11 - *Ormosia arborea*



Foto 12 - *Bowdichia virgilioides*



Foto 15 - *Parapiptadenia rigida*