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

**Processos de transferência de N em curto e longo prazo em plantios mistos
de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***

Ranieri Ribeiro Paula

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Programa: Recursos Florestais. Opção em:
Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2015

Ranieri Ribeiro Paula
Engenheiro Florestal

Processos de transferência de N em curto e longo prazo em plantios mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JEAN-PIERRE DANIEL BOUILLET**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Programa: Recursos Florestais. Opção em:
Silvicultura e Manejo Florestal

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Paula, Ranieri Ribeiro

Processos de transferência de N em curto e longo prazo em plantios mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* / Ranieri Ribeiro Paula. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
142 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Árvores fixadoras de nitrogênio 2. Facilitação 3. Transferência de nitrogênio
4. Raízes finas 5. Resíduos de colheita I. Título

CDD 634.9734
P324p

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

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria agradecer as pessoas que de alguma forma me ajudaram atravessar e concluir mais essa etapa da minha vida.

À minha família e namorada e aos meus amigos por todo apoio e por trazer tanta alegria à minha vida.

Ao Prof. Visitante Dr. Jean-Pierre Bouillet, por toda ajuda, amizade e orientação, pelos ensinamentos, insetivos e críticas sempre construtivas.

Aos Professores Dr. José Leonardo de Moraes Gonçalves, Dr. Jean-Paul Laclau, Dr. Paulo César O. Trivelin, por toda ajuda, pelos ensinamentos, insetivos e críticas sempre construtivas.

Aos funcionários da Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga-SP por toda ajuda durante o tempo que estive lá. A empresa FlorAgro e seus funcionários pelo apoio aos experimentos de campo e com as amostras no laboratório.

Aos professores, funcionários e estudantes do laboratório de isótopos estáveis (CENA), do laboratório de nutrição mineral de plantas (CENA), e do laboratório de microbiologia (LSO) por toda ajuda com as análises e o armazenamento de amostras.

Aos pesquisadores do UMR Eco&Sols, Dra. Agnès Robin e Dra. Claude Plassard, e do LSTM Dr. Yves Prin e Estelle Tournier por todo apoio, incentivo e ensinamentos durante meu período de doutorado sanduíche na França.

Aos pesquisadores, Dr. Yan Nouvellon, Dr. Bernd Zeller e Dr. Fabiano Balieiro, pelo apoio na elaboração da metodologia, sugestões e correções nos artigos.

Aos colegas de república em Piracicaba, da estação e da cidade de Itatinga, do PTSM e da França, pelas sempre boas conversas, risadas e pela ajuda.

Ao PTSM pelo apoio financeiro e logístico, e pelas oportunidades dadas para aumentar minha experiência profissional.

Eu agradeço à ESALQ-USP e ao departamento de Ciências Florestais pela oportunidade dada através de concurso para realização do doutorado, além da Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga-SP e Empresa Suzano pela disponibilização da área de estudo e apoio técnico e científico durante às pesquisas de campo, e também a USP e ao

CIRAD (UMR Eco&Sols e UMR LSTM) pela infraestrutura e apoio técnico e científico disponibilizados durante às pesquisas no laboratório.

A CAPES, pela bolsa de estudos durante os seis primeiros meses a FAPESP, pelo apoio financeiro através de bolsa de estudo e reserva técnica no Brasil (processo: 2011/20510-8) e no exterior (processo: 2013/23293-3) no restante do tempo de doutoramento, e pelo apoio através do projeto temático (processo: 2010/16623-9).

Finalmente, eu gostaria de agradecer ao CANP-UFF, a UFRRJ, a UFV, a USP e ao CIRAD, seus professores e pesquisadores, funcionários, estudantes, aos colegas e amigos que encontrei, pela oportunidade de conhecer mais sobre mim mesmo e o sobre o mundo.

BIOGRAFIA

Ranieri Ribeiro Paula, filho de Umberto de Oliveira Paula e Jussara Mesquita Ribeiro, nasceu em Volta Redonda, Rio de Janeiro, em 09 de maio de 1985.

No ano de 2000, ingressou no antigo Colégio Agrícola Nilo Peçanha da Universidade Federal Fluminense tendo concluído o Ensino Médio e Técnico em Agropecuária em 2002. Em 2004, ingressou no Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro obtendo, no ano de 2009, o título de Engenheiro Florestal. Nesse mesmo ano, ingressou no programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal da Universidade Federal de Viçosa obtendo o título de *Magister Scientiae* em Ciência Florestal, no ano de 2011. Nesse mesmo ano, ingressou no programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Querioz” da Universidade de São Paulo obtendo o título de *DoctorScientiae* em Recursos Florestais no ano de 2015.

EPÍGRAFE

“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior”.

Albert Einstein

SUMARIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
RESUME	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Intensificação ecológica das plantações florestais tropicais.....	21
1.2 Intensificação ecológica com espécies de Eucalyptus e Acacia.....	22
1.3 Funcionamento ecológico das PFM com Eucalyptus e Acacia.....	24
1.4 O papel da facilitação a partir da Acacia para Eucalyptus	26
Referências	28
2 MAIOR FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE N ₂ PELA ACÁCIA ASSOCIADA COM EUCALIPTODO QUE EM MONOCULTURA APÓS UMA ROTAÇÃO FLORESTAL	35
Resumo	35
Abstract.....	35
2.1 Introdução	36
2.2 Material e Métodos	38
2.2.1 Área de estudo	38
2.2.2 Desenho experimental	39
2.2.3 Crescimento das plantas	40
2.2.4 Aplicação do fertilizante enriquecido com ¹⁵ N	40
2.2.5 Amostragens e análises isotópicas.....	42
2.2.6 Estimativa da biomassa e conteúdo de N	43
2.2.7 Cálculos	44
2.3 Resultados.....	44
2.3.1 Crescimento relativo.....	44
2.3.2 Nitrogênio nas árvores e produção de biomassa	45
2.3.3 Variação sazonal do ¹⁵ N e do %Ndfa	47
2.4 Discussão	49
2.4.1 Variação sazonal da fixação do N ₂	49
2.4.2 O tipo de plantio altera as quantidades de N fixadas pela <i>Acacia</i> durante a segunda rotação?.....	50
2.4.3 Competição, facilitação e outros aspectos	52
2.5 Conclusões.....	53
Referências	54

3 TRANSFERÊNCIA DE NITROGÊNIO EM CURTO PRAZO E ABAIXO DO SOLO A PARTIR DE <i>Acacia mangium</i> PARA <i>Eucalyptus grandis</i> EM UMA FLORESTA TROPICAL PLANTADA	61
Resumo.....	61
Abstract	61
3.1 Introdução	61
3.2 Material e Métodos	64
3.2.1 Descrição do sítio.....	64
3.2.2 Desenho experimental.....	64
3.2.3 Aplicação do ^{15}N nas árvores de <i>Acacia</i>	65
3.2.4 Amostragens.....	66
3.2.5 Preparo das amostras e análises isotópicas	68
3.2.6 Cálculos da transferência de N.....	68
3.2.7 Análises estatísticas.....	70
3.3 Resultados	71
3.3.1 $\delta^{15}\text{N}$ nas árvores de <i>Acacia</i>	71
3.3.2 $\delta^{15}\text{N}$ na rizosfera	71
3.3.3 $\delta^{15}\text{N}$ nas árvores de <i>Eucalyptus</i>	72
3.3.4 Transferência de nitrogênio	74
3.4 Discussão	75
3.4.1 Uma metodologia adequada para a marcação com ^{15}N de árvores doadoras	75
3.4.2 Evidência da transferência em curto prazo e abaixo do solo	76
3.4.3 Transferência de N em curto prazo a longas distancias a partir das árvores de <i>Acacia</i> ..	78
3.5 Conclusões	79
Referências.....	79
4 RASTREAMENTO DO NITROGÊNIO LIBERADO DE RESÍDUOS DE COLHEITA DE PLANTAÇÕES MONOESPECÍFICAS DE <i>Eucalyptus grandis</i> e <i>Acacia mangium</i> PELO USO DE TÉCNICAS ISOTÓPICAS.....	87
Resumo.....	87
Abstract	87
4.1 Introdução	88
4.2 Material e Métodos	91
4.2.1 Área de estudo.....	91
4.2.2 O experimento.....	91

4.2.3 Avaliações	95
4.2.4 Preparo das amostras e análises de laboratório	97
4.2.5 Cálculos e análise estatística.....	98
4.3 Resultados e discussão	99
4.3.1 Nitrogênio nos resíduos e nas frações da serapilheira.....	99
4.3.2 Nitrogênio no solo	103
4.3.3 Nitrogênio e crescimento das árvores.....	108
4.4 Considerações finais	110
Referências	111
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
APÊNDICES	119
ANEXOS	135

RESUMO

Processos de transferência de N em curto e longo prazo em plantios mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*

A intensificação ecológica das plantações florestais tropicais (PFT) pela introdução de árvores fixadoras de nitrogênio (AFN) pode levar a maior produção de biomassa e ao aumento dos serviços ecossistêmicos (e.g. manutenção dos recursos hídricos e da biodiversidade, recuperação de áreas degradadas e sequestro de carbono). Essa intensificação é particularmente importante nos trópicos, por causa da escassez de solos ricos em nutrientes destinados ao estabelecimento das PFT, e devido aos altos custos ambientais e econômicos do uso de fertilizantes minerais. A facilitação a partir de AFN para não-AFN ocorre pela transferência de N após a decomposição da serapilheira, resíduos culturais, raízes e nódulos e exudados radiculares; ou diretamente com auxílio de redes de micorrizas em comum. Foi usado o traçador ^{15}N para adquirir novas percepções sobre a funcionalidade do nitrogênio de plantações florestais puras e mistas de *Eucalyptus* e *Acacia*. O capítulo 2 aborda a variação sazonal da fixação do N_2 pela *Acacia mangium* numa segunda rotação florestal com monoculturas (1111 plantas ha^{-1}) ou associada com *Eucalyptus grandis* (com 555 plantas por espécie ha^{-1}) (em Itatinga-SP). A competição com árvores de *Eucalyptus* reduziu o crescimento da *Acacia* em mistura. Em contraste, *Eucalyptus* em mistura obtiveram maior crescimento e conteúdo de N por árvore do que em monocultura. Maior fixação de N_2 pela *Acacia* em mistura do que em monocultura pode ser relacionado a mais alta competição das árvores de *Eucalyptus* do que de *Acacia* para o N do solo. A maior mineralização do N no monocultivo da *Acacia* do que no plantio misto após uma rotação florestal pode reduzir a fixação de N_2 no monocultivo de *Acacia* durante a segunda rotação florestal em comparação ao plantio misto. O capítulo 3 focou sobre a transferência de N em curto prazo e abaixo do solo a partir da *A. mangium* para *E. grandis* vizinhos, com monitoramento durante 60 dias em um plantio misto com 1111 plantas espécie $^{-1}\text{ha}^{-1}$ (Itatinga-SP). $^{15}\text{N-NO}_3^-$ foi injetado no fuste de três árvores dominantes de *Acacia* (com 26 meses de idade). A maior parte das folhas, raízes finas e rizosfera das duas espécies foram enriquecidas com ^{15}N a partir dos 5 dias após a marcação, até 6,2 m a partir da *Acacia* marcada. Esse estudo destacou que a transferência de N em curto prazo e abaixo do solo poderia prover quantidades significativas do requerimento de N de árvores vizinhas as AFN em florestas mistas. O capítulo 4 abordou os efeitos de resíduos de colheita (RC: folhas, galhos e casca) de *A. mangium* e *E. grandis* sobre a dinâmica do N no solo e serapilheira, a absorção de N pelas árvores e a produção de biomassa durante a rotação seguinte de *Eucalyptus* em monocultivo com 1667 plantas ha^{-1} (Bofete-SP). O conteúdo de N nos RC da *Acacia* foi cerca de 3 vezes maior do que RC de *Eucalyptus*. Os resultados preliminares mostraram que a transferência de N a partir de RC da *Acacia* para o solo e para árvores de *Eucalyptus* foi mais rápida (observados aos 3 meses após o replantio) do que a partir de RC de *E. grandis* (observado aos 7 meses após o replantio). Outros estudos relacionados aos temas abordados em cada capítulo são apresentados nos Apêndices. Esta tese destaca o potencial de uso de AFN para promover a intensificação ecológica de PFT.

Palavras-chave: Árvores fixadoras de nitrogênio; Facilitação; Transferência de nitrogênio; Raízes finas; Resíduos de colheita

ABSTRACT

Processes of N transfer in the short and long-term in mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*

Ecological intensification of tropical forest plantations (TFP) through the introduction of nitrogen-fixing trees (NFTs) may lead to higher biomass production and to enhancement of ecosystem services (e.g. maintenance of water resources and biodiversity, land reclamation and carbon sequestration). Such intensification can be particularly important in tropics, because of the scarcity of nutrient-rich land area devoted for TFP, and environmental and economic constraints with the use of mineral fertilizers. Facilitation from NFTs to non-NFTs can occur through N-transfer after decomposition of litter, roots and nodules and pruning residues, roots exudates or through common mycorrhizal networks. We used ^{15}N tracers to gain insights into nitrogen functioning of pure and mixed-species plantations of *Eucalyptus* and *Acacia*. Chapter 2 deals with the seasonal variation of N_2 fixation by *Acacia mangium* in a second stand rotation of monoculture (1111 trees ha^{-1}) or associated with *Eucalyptus grandis* (with 555 trees ha^{-1} for each species) (in Itatinga-SP). Competition with *Eucalyptus* trees depleted *Acacia* tree growth in mixture. By contrast, individual *Eucalyptus* tree growth and N content were higher in mixed-species plantations than in monoculture. Higher N_2 fixation by *Acacia* in mixture than in pure stand may be linked to higher competition of *Eucalyptus* trees than *Acacia* trees for soil N. Higher soil N mineralization in pure *Acacia* stand than in mixture after one stand rotation may deplete N_2 fixation in *Acacia* monoculture during the second rotation in comparison to mixture. Chapter 3 focuses on the short-term belowground N transfer from *A. mangium* to *E. grandis* neighbors, monitored during 60 days in a mixed-species plantation with 1111 trees ha^{-1} for each species (Itatinga-SP). $^{15}\text{N-NO}_3^-$ was injected in the stem of three big *Acacia* trees (26 months of age). Most of leaves, fine roots and rhizosphere samples of both species were ^{15}N enriched from 5 days after labelling onwards, up to 6.2 m from the labelled acacias. Our study highlights that short-term belowground N transfer may provide significant amounts of the N requirements of neighbors of N-fixing trees in mixed-species forests. Chapter 4 deals with the effect of harvested residues (HRs: leaves, branches and bark) of *A. mangium* and *E. grandis* on litter and soil N dynamics, N tree uptake and tree biomass production during a following rotation of *Eucalyptus* in monoculture with 1667 trees ha^{-1} (Bofete-SP). N content of *Acacia* HRs was 3 times higher than of *Eucalyptus* HRs. Our preliminary results showed that N transfer from *Acacia* HR to the soil and to replanted *Eucalyptus* trees was more rapid (3 months after replanting) than from N transfer from *E. grandis* HRs (7 months of age). Other studies related to the chapters are presented in Appendices. Our study highlights the potential use of the NFTs to promote the ecological intensification of TFP.

Keywords: Trees nitrogen-fixing; Facilitation; Nitrogen transfer; Fine roots; Harvest residues

RESUME

Processus de transfert de N à court et long terme dans les plantations mixtes d'*Eucalyptus grandis* et *Acacia mangium*

L'intensification écologique des plantations forestières tropicales (PFT) via l'introduction d'arbres fixateurs d'azote (AFA) peut conduire à de plus fortes production de biomasse et à l'amélioration des services environnementaux induits (e.g. qualité et quantité des ressources hydriques, biodiversité, séquestration de carbone). Une telle intensification est particulièrement importante sous les tropiques à cause de la rarefaction des terres arables destinées aux PFT et aux limitations économiques et environnementales liées à l'utilisation d'engrais minéraux. Une facilitation des AFA pour les non-AFA peut s'observer par le transfert de N après décomposition de la litière aérienne et souterraine, des nodules et des résidus d'exploitation, des exudats racinaires ou via des transferts par des réseaux mycéliens mycorrhiziens communs. Nous avons utilisé dans ce travail des méthodologies basées sur l'utilisation de l'isotope ^{15}N afin de mieux comprendre le fonctionnement azoté des plantations pures et mixtes d'*Eucalyptus* et d'*Acacia*. Le chapitre 2 se rapporte aux variations au cours des saisons de la fixation de N_2 par *Acacia mangium*, en seconde rotation d'une monoculture (1111 arbres ha^{-1}) ou en association avec *Eucalyptus grandis* (555 arbres ha^{-1} pour chacune des espèces (à Itatinga-SP). Les *Eucalyptus* en association présentent de plus fortes biomasses et minéralomasses azotée individuelles qu'en monoculture. La compétition avec les eucalyptus a un effet dépressif sur la croissance des acacias dans le peuplement mixte. À l'inverse, la croissance individuelle des eucalyptus est plus importante en association avec les acacias. La plus forte fixation de N_2 par les acacias en association peut être liée à une plus forte compétition pour l'azote du sol des eucalyptus que des acacias. La plus forte minéralisation de l'azote du sol dans les plantations pures d'acacia après une rotation peut avoir diminué la fixation de N_2 durant la seconde rotation, en comparaison avec les plantations mixtes. Le chapitre 3 se rapporte au transfert de N à court terme par voie souterraine d'*A. mangium* vers *E. grandis*. Ce transfert a été suivi sur 60 jours dans une plantation mixte avec 1111 arbres ha^{-1} de chaque espèce (à Itatinga-SP). Du $^{15}\text{N-NO}_3^-$ été injecté dans le tronc de 3 gros acacias âgés de 26 mois. La plupart des échantillons de feuilles, racines fines et rhizosphère ont été enrichis en ^{15}N dès 5 jours après marquage, ceci jusqu'à 6.2 m des acacias marqués. Notre étude a montré que le transfert rapide de N par voie souterraine peut satisfaire une part significative des besoins azotés des arbres voisins des AFA dans les plantations mixtes. Le chapitre 4 traite de l'effet des résidus d'exploitation (REs: feuilles, branches et écorces) d'*A. mangium* et d'*E. grandis* sur la dynamique de l'azote dans les litières et le sol, le prélèvement par les arbres et leur production en biomasse. Ceci sur la rotation suivante d'une monoculture d'*Eucalyptus* 1667 arbres ha^{-1} (Bofete-SP). La minéralomasse azotée des REs d'acacia était 3 fois plus forte que celle des eucalyptus. Les résultats préliminaires montrent un transfert plus rapide du N vers le sol et vers les eucalyptus replantés à partir des REs d'acacia (observé 3 mois après replantation) que d'eucalyptus (observé à partir de 7 mois après replantation). D'autres études relatives aux thèmes des chapitres sont présentés en Appendice. Notre étude met en évidence le potentiel d'utilisation des AFA pour une intensification écologique des PFTs.

Mots clés : Arbres fixateurs d'azote, Facilitation; Transfert d'azote; Racines fines; Résidus d'exploitation

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 54,4% (ou 463,2 milhões de hectares) do território brasileiro são cobertos por florestas naturais (456,1 milhões de hectares) e florestas plantadas, principalmente, com espécies de rápido crescimento (7,1 milhões de hectares) (Serviço Florestal Brasileiro, 2012). Os ecossistemas naturais são essenciais para a manutenção dos recursos hídricos e da biodiversidade e precisam ser preservados para resguardar suas funções ambientais (e porque ainda sabemos pouco sobre eles) e conservados através do uso sustentável.

As plantações florestais de rápido crescimento vêm tendo um papel crescente no atendimento da demanda por produtos florestais no país, enquanto o papel do extrativista a partir de florestas naturais vem diminuindo (IBGE, 2010). Em 2012, plantações com o gênero *Eucalyptus* ocupam a maior área plantada (70,8%), seguido do gênero *Pinus* (22,1%) e, outros 7,2% estabelecidas com espécies, tais como, *Acacia mearnsii* (acácia negra), *Acacia mangium*, *Hevea brasiliensis* (seringueira), *Schizolobium amazonicum* (parica) and *Tectona grandis* (teca) (ABRAF, 2013). Plantações com o gênero *Eucalyptus* tem um importante papel na geração de produtos florestais, principalmente para a indústria de celulose e papel (36,1%), energia a partir de biomassa (26,3%), madeira em tora (18,8%), carvão vegetal (10%), painéis reconstituídos (7,4%), madeira tratada (0,9%) e outras tipos de indústria (0,6%) (GONÇALVES et al., 2013). O setor de base florestal é importante para o desenvolvimento do país, contribuindo com 3,4% do PIB nacional e com milhões de empregos diretos e indiretos (Sociedade Brasileira de Silicultura, 2008). Além disso, plantações de eucalipto são as principais fornecedoras de celulose e papel de fibra curta no mundo, sendo 50% produzidos a partir de plantações nas regiões tropicais (FAO, 2010).

Plantações florestais atendem também a uma importante demanda local, pelo fornecimento de lenha e carvão, mourões, postes, estacas e móveis, entre outros. Além disso, tem havido uma crescente geração de produtos não madeireiros a partir das plantações florestais, como os extrativos de eucalipto, casca de acácia negra, resina, embora representem apenas 1,3% da geração de renda da silvicultura (IBGE, 2010). O investimento em plantações florestais estabelecidas numa escala pequena e média (e.g. produtores rurais e áreas de arrendamento) e que possam atender o consumo local é importante para a preservação dos recursos naturais.

Embora tenha havido expansão das áreas com plantações florestais nas regiões tropicais (FAO, 2010), existe também uma pressão para que essas plantações ocupem áreas cada vez mais pobres em nutrientes, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P). Este é um

fenômeno mundial, sendo ocasionados pelo aumento do custo das terras e pelos conflitos de interesse com populações locais (COSSALTER; PYE-SMITH, 2003; GONÇALVES et al., 2013). Somente no Brasil, enquanto as plantações florestais ocupam menos de 1% do território, aproximadamente 19% e 32% são ocupados por cultivos agrícolas e por pastagens (IBGE, 2010). A aflorestação destas áreas anteriormente ocupadas pela agricultura e pastagens, as quais geralmente estão em algum estágio de degradação, favorece a recuperação dos serviços ecossistêmicos dessas terras, por exemplo, aumentando o sequestro de carbono, a manutenção dos recursos hídricos e da biodiversidade, e a recuperação do solo (FAO, 2010).

A sustentabilidade das plantações florestais de rápido crescimento, como com genótipos de *Eucalyptus*, é limitada pela deficiência nutricional, sendo esperadas respostas aos fertilizantes, principalmente, nos primeiros anos de crescimento, quando em áreas muito pobres em nutrientes (GONÇALVES et al., 2008, 2013; LACLAU et al., 2010; NAMBIAR; HARWOOD, 2014). Durante o primeiro ano após o plantio, eucaliptos podem acumular na biomassa valores na ordem de 155 kg ha⁻¹ de nitrogênio e 10 kg ha⁻¹ de fósforo (LACLAU et al., 2010). Embora os ganhos em produtividade precisem ser sustentados por adubações nitrogenadas e fosfatadas, essas adubações devem ser mais limitadas futuramente. Adubação nitrogenadas tem um custo alto em energias fósseis que são usadas na conversão do N₂ do ar para NH₃ (sob alta temperatura e pressão) por meio do processo de fixação industrial de Haber-Bosch; além de riscos de contaminação ambiental do lençol freático e cursos de água por nitritos (caso do N, GALLOWAY, 1998). Adubos fosfatados serão limitados futuramente porque tem reservas mundiais economicamente viáveis diminuindo rapidamente e outras reservas com custo mais alto para exploração (GILBERT, 2009).

Além disso, o Brasil tem uma dependência alta por fertilizantes produzidos no exterior, sendo importados 60%, 40% e 90% de todos adubos nitrogenados, fosfatados e potássicos, respectivamente pelo Brasil no ano de 2004 (DIAS; FERNANDES, 2006), sendo destinados, sobretudo a produção agrícola (mais de 92,2% do consumo é usado pelas 18 principais culturas agrícolas) do que reflorestamentos e pastagens (5%) (CUNHA et al., 2010). A alta dependência externa gera uma instabilidade dos preços dos fertilizantes, que podem elevar os custos de produção em função da taxa cambial do dólar, o qual representa uma insegurança aos pequenos e médios agricultores que querem estabelecer plantações florestais, devido ao tempo mais longo para o retorno do investimento.

Dentro desse contexto, o estabelecimento dos novos plantios florestais poderá elevar os custos do plantio, por causa da maior demanda de fertilizantes, principalmente em solos mais pobres em nutrientes e matéria orgânica. Assim, outras formas de manejo no âmbito das

plantações florestais de rápido crescimento poderiam ser mais bem pensadas. A intensificação ecológica do ecossistema antropizado tem como foco manter ou aumentar a produção do novo ecossistema preservando ao máximo os recursos naturais existentes, por exemplo, pela escolha de espécies que fazem associações simbióticas com microrganismos e que desenvolvam as interações ecológicas que ocorrem naturalmente nos ecossistemas (e.g. como a exploração de nichos complementares, a competição e a facilitação); além de técnicas de manejo que promovam a manutenção da matéria orgânica do solo e sua melhoria, tais como rotações culturais envolvendo leguminosas fixadoras de nitrogênio (GRIFFON, 2006).

1.1 Intensificação ecológica das plantações florestais tropicais

A intensificação ecológica das plantações florestais tropicais monoespecíficas poderia ocorrer após sua evolução para sistemas mais complexos (e.g. para plantações florestais pluriespecíficas e sistemas agroflorestais) (PAQUETTE; MESSIER, 2010). Essa intensificação poderia ocorrer com base no manejo do ecossistema antropizado (e.g. pastagens abandonadas e plantações florestais monoespecíficas com baixa produtividade) (Figura 1), levando em consideração a escolha de espécies (ou planejamento da biodiversidade induzida) que favoreçam o estabelecimento da biodiversidade pré-existente na área ou a partir de áreas próximas (ou a biodiversidade associada) (ALTIERI, 1999; VANDERMEER; PERCECTO, 1995). Plantações florestais mistas (PFM) com associação de árvores fixadoras de nitrogênio (AFN) e árvores não fixadoras (não-AFN) são potenciais para promover a intensificação ecológica das plantações florestais tropicais e fornecer, além dos produtos florestais esperados, outros importantes serviços ecossistêmicos (e.g. recuperação de solos degradados e sequestro de carbono, manutenção dos ecossistemas naturais e dos recursos hídricos, entre outros) (BOUILLET et al., 2013; KELTY, 2006; PAQUETTE; MESSIER, 2010).

Além disso, muitos outros aspectos positivos podem ser associados ao estabelecimento das plantações mistas. O papel da biodiversidade sobre a regulação interna do ecossistema (e.g. dos ciclos biogeoquímicos, do controle de pragas e doenças, da eficiência no uso dos recursos) é essencial para a manutenção dos ecossistemas naturais (ALTIERI, 1994, 1999; KEESING et al. 2006) e deve ter um papel importante nas plantações florestais tropicais mistas. A introdução de AFN como a *Acacia mangium* em plantações de *Eucalyptus* foi capaz de modificar rapidamente a estrutura da comunidade microbiana do solo aumentando a disponibilidade de N e P no solo (BINI et al., 2013; DIAS et al., 2006; RACHID et al., 2013, 2015). Plantações florestas mistas e sistemas agroflorestais, podem também promover o múltiplo uso de produtos madeireiros e não madeireiros e aumentar a produtividade dos

componentes do sistema (BOUILLET et al., 2013; KELTY, 2006; PAQUETTE; MESSIER, 2010; SILVA et al., 2007). Nos estudos de Binkley e Giardina (1997), Döbereiner (1984), Franco e Faria (1997) e Silva et al. (2007) são apresentados diversas espécies de plantas fixadoras de N com potencial uso para promover a intensificação ecológica das plantações florestais mistas e dos sistemas agroflorestais em regiões tropicais.

Figura 1 – Estratégias para promover a intensificação ecológica das plantações florestais mistas e sistemas agroflorestais a partir de terras antropizadas. A escolha das espécies, que irão compor o sistema, pelo manejador (i.e. das espécies de árvores, culturas agrícolas, pastagens e animais) devem promover condições ambientais para o estabelecimento da biodiversidade associada (e.g. fauna e flora do solo, herbívoros, carnívoros, decompositores, entre outros) a partir de ecossistemas próximos ou já presentes na área. Ambas biodiversidade planejadas e associadas tem um papel direto sobre a funcionalidade do ecossistema e sua intensificação, dado pelas linhas fechadas; entretanto, a biodiversidade planejada tem efeito indireto (positivo ou negativo) sobre a biodiversidade associada (linha pontilhada). Figura adaptada de Vandermeer e Perfecto (1995) e Altieri (1999)

1.2 Intensificação ecológica com espécies de *Eucalyptus* e *Acacia*

Os gêneros *Eucalyptus* e *Acacia* são amplamente utilizados na obtenção de produtos florestais, principalmente, celulose e energia nas regiões tropicais. O consórcio entre espécies destes gêneros foi proposto visando aumentar o uso dos recursos naturais (e.g. pela estratificação das copas com aumento da interceptação da luz, e pela absorção de água e

nutrientes no solo) através da exploração de nichos complementares (FORRESTER et al., 2006; KELTY, 2006). Elas também podem aumentar a produção de biomassa, o status mineral e carbono dos solos, com redução dos custos com fertilizantes, quando em condições ambientais favoráveis (BINKLEY et al., 2003; FORRESTER et al., 2006; LACLAU et al., 2008; RICHARDS et al., 2010).

Nas regiões tropicais, *Acacia* e outras AFN são importantes não somente pela geração de produtos madeireiros e não madeireiros, mas também porque elas podem melhorar a ciclagem de diversos nutrientes, notadamente de N e P (BINKLEY; GIARDINA, 1997; FORRESTER et al., 2006). Estudos mostraram grandes quantidades de N adicionadas no solo durante uma rotação florestal com AFN (BINKLEY; GIARDINA, 1997; BINKLEY et al., 2003; PARROTTA et al., 1996; VOIGTLAENDER et al., 2012). No final de uma rotação (6,5 anos) com *A. mangium*, Voigtlaender (2012) encontrou quantidades maiores de N acumulados pela *A. mangium* do que pelo *E. grandis*, mesmo em regiões sub ótimas para o crescimento da *A. mangium*. A autora estimou, por diferenças de N acumulado nas duas espécies, que a fixação biológica gerou 304 kg de N ha⁻¹ no sistema, sob um latossolo de textura média (16% de argila), e 511 kg de N ha⁻¹ num latossolo de textura muito argilosa (63% de argila). No caso do plantio misto (com 555 plantas por espécie ha⁻¹), as estimativas da fixação chegaram a valores entre 65% e 75% das quantidades acumuladas nos plantios monoespecíficos de *A. mangium*; entretanto, a produção de biomassa do plantio misto não foi maior do que nos monocultivos de *Eucalyptus* (VOIGTLAENDER, 2012).

Os ganhos em biomassa e fixação de N observados podem ser limitados quando *A. mangium* e outras AFNs são estabelecidas em condições sub-ótimas de crescimento (BOUILLET et al., 2013; VOIGTLAENDER et al., 2012), ao contrário do que deverão ser à medida que essas plantações forem estabelecidas em regiões com clima mais favoráveis ao seu crescimento. Embora, *A. mangium* apresente alta plasticidade climática (sendo encontradas em locais com precipitações médias anuais de 1000-4500 mm e temperatura média de 12 °C a 34 °C) e edáficas (suporta solos ácidos e se desenvolvem bem degradados com presença de altos teores de óxidos de ferro e alumínio), as condições ótimas de crescimento são em regiões de clima úmido (com precipitação acima de 2000 mm) e com temperatura estável (CATIE, 1992; ROSSI et al., 2003).

Além da mistura de espécies, a intensificação ecológica poderia ocorrer através do estabelecimento de monocultivos de *A. mangium* e outras AFN em áreas em processo de degradação num primeiro momento, ou serem estabelecidas entre rotações de *Eucalyptus* e outras não-AFN, para melhorar a fertilidade do solo (VOIGTLAENDER et al., 2012),

diminuir os custos com fertilizantes, e reduzir os riscos fitossanitários, como observados para os agrossistemas (CREWS; PEOPLES, 2004). O efeito desses resíduos com altos teores de N derivados da AFN sobre os estoques de N no solo e sua contribuição para sustentar a produção da rotação seguinte com não-AFN poderá fornecer indicativos sobre a viabilidade das diversas vias para promover a intensificação ecológica das plantações florestais tropicais. Entretanto, poucos estudos abordaram o uso de adubações verdes de leguminosas em plantios de *Eucalyptus* (CORBEELS et al., 2003). É possível prever que, embora as PMF mostrem grande potencial em aumentar a sustentabilidade das plantações florestais tropicais, às vezes pode haver restrições ao estabelecimento de plantios mistos por parte das grandes empresas do setor florestal, principalmente por questões logísticas (e.g. no plantio, colheita diferenciada das árvores, modificação do processo de produção, entre outros), sendo as rotações florestais com AFN uma opção promissora.

1.3 Funcionamento ecológico das PFM com *Eucalyptus* e *Acacia*

O estudo do funcionamento ecológico em plantações mistas, sobretudo, das interações competitivas e facilitadoras envolvendo leguminosas e não leguminosas auxiliará na implantação e manejo de plantações mistas a fim de aumentar a geração de produtos florestais e os ganhos ambientais, com menor uso de fertilizantes. Sobre um ponto de vista prático, a escolha de espécies AFN em função de sua adaptação às condições edafoclimáticas do sítio é essencial. Nessas condições é esperado que haja um crescimento vigoroso nos primeiros anos após o plantio e elas podem promover a facilitação sobre não-AFN, através da fixação do N_2 em solos pobres em N mas não deficientes em P, e com posterior fornecimento de N ao solo e as não-AFN pela deposição da serapilheira e pela transferência de N abaixo do solo (BATTERMAN et al., 2013; MUNROE; ISAAC, 2014). O N disponibilizado pelas AFN poderia, dessa forma, sustentar pelo menos uma parte do crescimento inicial das não-AFN. O uso final da produção e o retorno financeiro para cada espécie poderá dirigir a estratégia de manejo (e.g. através de desbastes), de forma a minimizar a competição sobre a espécie de maior interesse.

Efeito das interações ecológicas, principalmente a competição entre espécies, sobre o crescimento e a produção de biomassa de árvores de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* foram feitos no Brasil. De maneira geral, a mistura das duas espécies não promoveu mais biomassa do que as florestas monoespecíficas de *E. grandis* em regiões com climas desfavoráveis ao crescimento da *A. mangium* favorável para o crescimento do *Eucalyptus* (LACLAU et al., 2008; BOUILLET et al., 2013). Os mesmos autores verificaram que nos

plantios mistos localizados no Congo, com clima mais favorável ao crescimento da *A. mangium*, com solos arenosos e pobres em nutriente, os plantios mistos mostraram maiores ganhos em biomassa do que os respectivos monocultivos.

O uso complementar de luz ocorreu em florestas mistas de *E. grandis* e *A. mangium* devido à estratificação das copas e o maior índice de área foliar em comparação as florestas monoespecíficas; entretanto, limitações de outros recursos (e.g. água) diminuiu a eficiência do uso da luz das duas espécies no final da rotação de 6 anos (LE MAIRE et al., 2013). O menor uso de água pela *A. mangium* quando associada com *E. grandis* foi mostrado num estudo recente (DEUS JR., 2014). O total anual de água transpirada pelas plantas, mensurados entre 2,8-3,8 anos após o plantio, foi 271 mm e 906 mm quando *Acacia* estavam no plantio misto (com 555 plantas por espécie ha⁻¹) e monocultivo (1111 plantas ha⁻¹), respectivamente. Menores quantidades de água transpirada pela *Acacia* no plantio misto foram relacionadas ao seu baixo crescimento (DEUS JR., 2014). *Eucalyptus*, ao contrário, cresceram mais e transpiraram mais água por unidade de árvore quando estavam associados com a *Acacia* do que em monocultivo (DEUS JR., 2014).

Outros estudos avaliaram os efeitos da associação *Eucalyptus-Acacia* sobre a disponibilidade de nutrientes e funcionalidade dos microorganismos do solo. Voigtlaender et al. (2012) encontraram quantidades duas vezes mais altas de N disponível no solo (como nitrato e amônio) no final da rotação de plantios monoespecíficos de *A. mangium* do que nos de *E. grandis*, possuindo no plantio misto (com 555 plantas por espécie ha⁻¹) valores intermediários de N disponível, em Itatinga-SP. Rachidet al. (2013) observaram que a introdução de *A. mangium* aumentou os níveis de P e nitrato no solo em plantios mistos com *E. grandis* x *E. urophylla* em comparação ao plantio monoespecífico do *Eucalyptus* numa região com clima mais favorável para o crescimento da *A. mangium* (Seropédica-RJ). Os autores observaram também que a mistura das duas espécies alteraram a estrutura da comunidade microbiana do solo, resguardando indivíduos das duas comunidades (RACHID et al., 2013).

A fixação do N₂ pode ser influenciada por vários fatores tais como a disponibilidade de N e água no solo, a limitação nutricional (e.g. fosforo e molibdênio), sombreamento e intensidades das interações entre as plantas e microorganismos do solo (DOMMERGUES, 1995; VITOUSEK et al., 2002; BARRON et al., 2009). O N derivado da fixação simbiótica do N₂ (%Nd_{fa}) ranqueia entre 40 e 90 % do N de leguminosas tropicais (BINKLEY; GIARDINA, 1997; BOUILLET et al., 2008), com variações em função da espécie e idade (PARROTTA et al., 1996; MENGE; HEDIN, 2009; BARRON et al., 2011). Normalmente, é

observado uma queda da fixação do N_2 com o passar do tempo em leguminosas ocupando ambas as florestas naturais (BATTERMAN et al., 2013b) e plantadas (PARROTTA et al., 1996). Essa queda tem sido associada, principalmente, com a capacidade das leguminosas em regular a fixação em função de suas necessidades e da disponibilidade de N no solo, e esse mecanismo tem sido identificado em florestas tropicais naturais (BARRON et al., 2011; MENGE et al., 2009; MENGE; HEDIN, 2009) e plantações florestais tropicais mistas (PARROTTA et al., 1996), quando as leguminosas mostram altas taxas de crescimento e sofrem pouca competição com não-AFN (RICHARDS et al., 2010).

Em contraste, pouco é conhecido sobre a variação sazonal da fixação do N quando leguminosas estavam sob efeito forte da competição a partir de não leguminosas (BALIEIRO et al., 2008; BOUILLET et al., 2008; RICHARDS et al., 2010), como no caso de *A. mangium* e *E. grandis* estabelecidas em clima do tipo Cwa (Itatinga-SP). Entender como a fixação está ocorrendo nessas condições é importante, visto que os ganhos em produtividade das PMF são associados a menor competição interespecífica e as interações facilitativas ao longo do desenvolvimento do povoamento mistos de *E. grandis* e *A. mangium* (BOUILLET et al., 2013).

1.4 O papel da facilitação a partir da *Acacia* para *Eucalyptus*

Ainda carece mais conhecimento sobre os processos de facilitação entre espécies de *Acacia* e *Eucalyptus* (FORRESTER et al., 2006; RICHARDS et al., 2010;). Esses processos primariamente incluem a facilitação direta, que poderia ser pelo aumento da biodisponibilidade de recursos (e.g. N e P) promovido a partir de uma espécie para outra espécie, e a facilitação indireta, que poderia ocorrer através de uma modificação favorável no ambiente (e.g. mais rápido fechamento de copas promovendo menor competição, modificação da estrutura da comunidade microbiana do solo) (BROOKER et al., 2008; LITTLE et al., 2002; RACHID et al., 2015).

A facilitação pelo aumento da biodisponibilidade de N a partir da *Acacia* para o *Eucalyptus* poderia ocorrer de diferentes formas. O N fixado pela *Acacia* pode ser transferido para o *Eucalyptus* por processos que ocorrem acima do solo (e.g. serapilheira, resíduos de colheita, lixiviação das copas e tronco) e abaixo do solo (RICHARDS et al., 2010; FORRESTER et al., 2006). Abaixo do solo, a transferência de N deve ocorrer por mecanismos, tais como, a rizodeposição, exudação, turnover de tecidos e nódulos e redes de micorrizas (CHALK et al., 2014). Estudos têm indicado altos inputs de N através da rizodeposição e exudação de compostos nitrogenados (JONES et al., 2004; FUSTEC et al.,

2010; BAIS et al., 2006) e através do rápido turnover de raízes finas e muito finas e nódulos (BOUILLET et al., 2008; FORRESTER et al., 2006; MUNROE; ISAAC, 2014).

A facilitação através da transferência de N abaixo do solo a partir de leguminosas para não leguminosas é ainda questionada devido aos poucos dados experimentais, particularmente em condições de campo (WICHERN Et al., 2008; CHALK et al., 2014); sendo que ainda não existem estudos em campo sobre a facilitação promovida pela transferência de N abaixo do solo em curto prazo a partir de árvores leguminosas para árvores não-AFN. A transferência de N a partir da serapilheira pode ser muito variável em função de sua qualidade (BACHEGA, 2012; CHEEVER et al., 2013). De uma maneira geral existe um efeito sinérgico na mistura da serapilheira de AFN e não-AFN sobre a decomposição (RICHARDS et al., 2010). Entretanto, muitos fatores relacionados à qualidade (e.g. teores de C, N, P, lignina, polifenóis, taninos condensados) e as relações estequiométricas de C, N e P, na serapilheira aportada durante o ano podem ser alteradas em virtude do tipo de plantio (RICHARDS et al., 2010). Bachega (2012) mostrou que as altas quantidades de polifenóis e lignina limitaram as perdas de massa e de N a partir de folhas de *A. mangium*, mas que folhas de *E. grandis* poderiam transferir quantidades importante de N para auxiliar nos processos de decomposição das folhas de *Acacia*. Adicionalmente, grandes quantidades de N são aportadas através da serapilheira e resíduos de colheita (como folhas, galhos e casca) durante e após uma rotação de *A. mangium* com ou sem o *E. grandis* (VOIGTLAENDER, 2012). O efeito dos resíduos de colheita sobre os estoques de N no solo e a nutrição das árvores de uma rotação seguinte ainda foi pouco estudado sobre um ponto de vista qualitativo e quantitativo (SWANSTON; MYROLD, 1997; VERSINI et al., 2013).

A facilitação pela transferência de N a partir de AFN para não-AFN pode ser estudada em condições de campo por meio de técnicas adaptadas usando o traçador isotópico ^{15}N . O ^{15}N é um dos isótopos estáveis do N que ocorre em condições naturais numa abundância isotópica de 0,3663 atoms%. O traçador ^{15}N poderia ser usado para estimar a transferência direta de N entre plantas e a transferência a partir de resíduos orgânicos para o solo e para as plantas (CHALK et al., 2014). Essas estimativas de transferência podem ser feitas a partir de princípios de diluição isotópica, sendo geralmente a fonte de N (e.g. AFN, serapilheira e resíduos de colheita) enriquecida com ^{15}N e o caminho do $^{15}\text{N}/\text{N}$ no sistema solo-planta pode ser monitorado no tempo. Além disso, o ^{15}N pode ser usado para estimativas da proporção do N derivado da fixação do N_2 (%Nd_{fa}) pela AFN. Nesse caso, um fertilizante nitrogenado enriquecido com ^{15}N pode ser usado para marcação do solo e as estimativas da %Nd_{fa} são feitas com base nas diferenças do enriquecimento com ^{15}N nos tecidos de AFN e não-AFN

(BOUILLET et al., 2008; PARROTTA et al., 1996). O uso do ^{15}N para estimação da %Ndfa é uma alternativa ao uso de técnicas de abundância natural do ^{15}N que às vezes não permite estimativas precisas do %Ndfa (BOUILLET et al. 2008).

A presente pesquisa envolveu estudos em condições de campo sobre alguns aspectos relacionados ao funcionamento ecológico das plantações florestais puras e mistas de *Eucalyptus* e *Acacia*. Foi identificada uma carência de pesquisas sobre: A) a variação sazonal da fixação do N_2 quando *Acacia mangium* estava ou não sobre o efeito da competição com o *Eucalyptus grandis*, sendo esse o objetivo do estudo descrito no segundo capítulo; B) a transferência de N em curto prazo e abaixo do solo a partir da *A. mangium* para o *E. grandis*, sendo esse objetivo do estudo descrito no terceiro capítulo; C) a contribuição do N derivado a partir de resíduos de colheita (e.g. folhas, galhos e casca) de *A. mangium* e *E. grandis* para manter os estoques de N no solo e sustentar o crescimento das árvores durante os 12 primeiros meses da rotação seguinte com *Eucalyptus*, sendo esse estudo descrito no quarto capítulo, mas os resultados são inconclusivos. Informações adicionais oriundas dos experimentos principais ou de outros estudos realizados durante o período de doutoramento (e.g. sobre as estimativas da fixação não simbiótica em plantios de *Eucalyptus* e *Acacia*, e sobre uma metodologia de estudo da associação em comum entre plantas e ectomicorrizas) e, que não constituíram um capítulo, foram apresentadas no tópico Apêndice.

A hipótese geral da tese é que a leguminosa *Acacia mangium* poderia atuar como planta facilitadora para o *Eucalyptus grandis* por promover o aumento da biodisponibilidade de nitrogênio em solos tropicais inférteis.

Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. Anual estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012. Brasília. 148p.
<<http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF10-BR/controle.html>>. Acesso em: 29 de jan. 2015.

ADAMS, M.A.; ATTWILL, P.M. Role of *Acacia* spp. in nutrient balance and cycling in regenerating *Eucalyptus regnans* F. Muell. forests. II* Field studies of acetylene reduction. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 32, p. 217-223, 1984.

ALTIERI, M.A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 74, p.19-31, 1999.

BACHEGA, L. R. **Efeito das espécies na decomposição da serapilheira e na transferência de N entre folhas em plantios mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***. 2012. 107p. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. 2012.

BAIS, H.P.; WEIR, T. L; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BALIEIRO, F.C.; ALVES, B.J.R.; PEREIRA, M.G.; FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C. Biological nitrogen fixation and nutrient release from litter of the Guachapele leguminous tree under pure and mixed plantation with *Eucalyptus*. **Cerne**, Lavras, v. 14, p. 185-193, 2008.

BARRON, A.R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J.P.; WRIGHT, S.J.; KRAEPIEL, A.M.L.; HEDIN, L.O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geoscience**, London, v. 2, p. 42–45, 2009.

BARRON, A.R.; PURVES, D.W.; HEDIN, L.O. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. **Oecologia**, London, v. 165, p. 511–520, 2011.

BATTERMAN, S.A; HEDIN, L.O.; VAN BREUGEL, M.; RANSIJN, J.; CRAVEN, D.J.; HALL, J.S. Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession. **Nature**, London, v. 502, p. 224–227, 2013.

BINI D.; SANTOSA C.A.; BOUILLET J-P. ; GONÇALVES J.L.M.; CARDOSO E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 57–66, 2013.

BINKLEY, D.; GIARDINA, C. 1997. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. In: NAMBIAR, E.K.S., BROWN, A.G. (Ed.), **Management of Soil, Nutrients and Water in Tropical Plantation Forests**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, n. 43, 1997. p. 297–337.

BINKLEY, D.; SENOCK, R.; BIRD, S.; COLE, T.G. Twenty years of stand development in pure and mixed stands of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Facaltaria moluccana*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 182, p. 93–102, 2003.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; MOREIRA, R.M.; TRIVELIN, P.C.O.; JOURDAN, C.; SILVA, E.; PICCOLO, M.C.; TSAI, S.; GALIANA, A. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil 2: Nitrogen accumulation in the stands and biological N₂ fixation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3918–3930, 2008.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; VOIGTLAENDER, M.; GAVA, J.; LEITE, F.P.; HAKAMADA, R.; MARESCHAL, L.; MABIALA, A.; TARDY, F.; LEVILLAIN, J.; DELEPORTE, P.; EPRON, D.; NOUVELLON, Y. *Eucalyptus* and *Acacia* tree growth over entire rotation in single- and mixed-species plantations across five sites in Brazil and Congo. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 89-101, 2013.

BROOKER, R.W.; MAESTRE, F.T.; CALLAWAY, R.M.; LORTIE, C.L.; CAVIERES, L.A.; KUNSTLER, G.; LIANCOURT, P.; TIELBÖRGER, K.; TRAVIS, J.M.J.; ANTHELME, F.; ARMAS, C.; COLL, L.; CORCKET, E.; DELZON, S.; FOREY, E.; KIKVIDZE, Z.; OLOFSSON, J.; PUGNAIRE, F.; QUIROZ, C.L.; SACCONI, P.; SCHIFFERS, K.; SEIFAN, M.; TOUZARD, B.; MICHALET, R., 2008. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. **Journal of Ecology**, London, v. 96, p. 18–34, 2008.

CATIE. Mangium (*Acacia mangium* Willd) Especie de Árbol de Uso Múltiple em América Central. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 1992. 56 p. (Colección de Guías Silviculturales, 5).

CHALK, P.M.; PEOPLES, M.B.; MCNEILL, A.M.; BODDEY, R.M.; UNKOVICH, M.J.; GARDENER, M.J.; SILVA, C.F.; CHEN, D. Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of ^{15}N -enriched techniques. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 73, p. 10-21, 2014.

CORBEELS, M.; O'CONNELL, A.M.; GROVE, T.S.; MENDHAN, D.S.; RANCE, S.J. Nitrogen release from eucalypt leaves and legume residues as influenced by their biochemical quality and degree of contact with soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 250, p. 15-28, 2003.

COSSALTER, C.; PYE-SMITH, C. **Fast-wood forestry: myths and realities**. Jakarta: Center for International Forestry Research. 2003. 50p.

CREWS, T.E.; PEOPLES, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 279-297, 2004.

CUNHA, J.F.; CASARIN, V.; PROCHNOW, L.I. Balanço de nutrientes na agricultura brasileira. **IPNI: Informações agronômicas**, n.130, Junho/2010.

DEUS JÚNIOR, J.C. **Transpiração e eficiência de uso da água em plantios puros e mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***. 2014. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2014.

DIAS, P.F.; SOUTO, S.M.; CORREIA, M.E.F.; ROCHA, G.P.; MOREIRA, J.F.; RODRIGUES, K.M.; FRANCO, A.A. Árvores fixadoras de nitrogênio e macrofauna do solo em pastagem de híbrido de Digitaria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1015-1021, 2006.

DIAS, V.P.; FERNANDES, E. Fertilizantes: uma visão global sintética. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 24, p. 97-138, 2006.

DOBEREINER, J. Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 83-90, 1984.

DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 215–230, 1995.

FAO. **Global Forest Resources Assessment**, Rome, Italy, 2010. 378p. Disponível em: URL <http://www.fao.org/forestry/fra/fra2010/en/>.

FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; COWIE, A.L.; VANCLAY, J.K. Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: A review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, p. 211–230, 2006.

FRANCO, A.A.; FARIA, S.M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, cidade, v.29, p. 897-903, 1997

FUSTEC, J.; LESUFFLEUR, F.; MAHIEU, S.; CLIQUET, J-B. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. **Agronomy for sustainable development**, Paris, v. 30, p. 57–66, 2010.

GALLOWAY, J.N. The global nitrogen cycle: changes and consequences. **Environmental Pollution**, London, v. 102, p. 15–24, 1998.

GILBERT, N. Environment: The disappearing nutrient. **Nature**, London, v. 461, p. 716-718, 2009.

GONÇALVES, J.L.M.; ALVARES, C.A.; HIGA, A.R.; SILVA, L.D.; ALFENAS, A.C.; STAHL, J.; FERRAZ, S.F.B.; LIMA, W.P.; BRANCALION, P.H.S.; HUBNER, A.; BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; NOUVELLON, Y.; EPRON, D. Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 6–27, 2013.

GRIFFON, M. **Nourrir la planète, pour une révolution doublement verte**. Paris: Odile Jacob, 2006. 456p.

HULVEY, K.B.; HOBBS, R.J.; STANDISH, R.J.; LINDENMAYER, D.B.; LACH, L.; PERRING, M.P. Benefits of tree mixes in carbon plantings. **Nature Climate Change**, London, v. 3, p. 869–874, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Produção e extração vegetal e da silvicultura**, Rio de Janeiro, v.25, p.1, 2010.

JONES, D.L.; HODGE, A.; KUZYAKOV, Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. **New Phytologist**, Cambridge, v.163, p. 459–480, 2004.

KEESING, F.; HOLT, R.D.; OSTFELD, R.S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecology letters**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 485–498, 2006.

KELTY, M.J. The role of species mixtures in plantation forestry. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, n. 2/3, p. 195–204, 2006.

LACLAU, J-P.; BOUILLET, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; SILVA, E.V.; JOURDAN, C.; CUNHA, M.C.S.; MOREIRA, R.M.; SAINT-ANDRÉ, L.; MAQUÈRE, V.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil 1. Growth dynamics and aboveground net primary production. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3905–3917, 2008.

LACLAU, J.; RANGER, J.; GONÇALVES, J.L.M.; MAQUERE, V.; KRUSCHE, A.; M'BOU, A.; NOUVELLON, Y.; SAINT-ANDRÉ, L.; BOUILLET, J-P.; PICCOLO, M.C.; DELEPORTE, P. Biogeochemical cycles of nutrients in tropical *Eucalyptus* plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 259, p. 1771–1785, 2010.

- LACLAU, J.-P.; NOUVELLON, Y.; REINE, C.; GONÇALVES, J.L.M.; KRUSHE, A.V.; JOURDAN, C.; LE MAIRE, G.; BOUILLET, J.-P. Mixing *Eucalyptus* and *Acacia* trees leads to fine root over-yielding and vertical segregation between species. **Oecologia**, London, v. 172, p. 903–913, 2013.
- LE MAIRE, G.; NOUVELLON, Y.; CHRISTINA, M.; PONZONI, F.J.; GONÇALVES, J.L.M.; BOUILLET, J.-P.; LACLAU, J.-P. Tree and stand light use efficiencies over a full rotation of single- and mixed-species *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 288, p. 31–42, 2013.
- LITTLE, K.M.; SCHUMANN, A.W.; NOBLE, A.D. Performance of a *Eucalyptus grandis* × *E. camaldulensis* hybrid clone as influenced by a cowpea covercrop. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 168, p. 43–52, 2002.
- MENGE, D.N.L.; HEDIN, L.O. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. **Ecology**, Ithaca, v. 90, p. 2190–2201, 2009.
- MENGE, D.N.L.; LEVIN, S.A.; HEDIN, L.O. Facultative versus obligate nitrogen fixation strategies and their ecosystem consequences. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, p. 465–477, 2009.
- MUNROE, J.W.; ISAAC, M.E. N₂-fixing trees and the transfer of fixed-N for sustainable agroforestry: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, p. 417–427, 2014.
- PAQUETTE, A.; MESSIER, C. The role of plantations in managing the world's forests in the Anthropocene. **Frontiers in Ecology and the Environment**, Washington, v. 8, n. 1, p. 27–34, 2010.
- PARROTTA, J.A.; BAKER, D.D.; FRIED, M. Changes in dinitrogen fixation in maturing stands of *Casuarina equisetifolia* and *Leucaena leucocephala*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, p. 1684–1691, 1996.
- RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; PEIXOTO, R.S.; PINHEIRO, Y.A.S.; PICCOLO, M.C.; CHAER, G.M.; ROSADO, A.S. Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 66, p. 146–153, 2013.
- RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; FONSECA, E.S.; PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. Intercropped silviculture systems, a key to achieving soil fungal community management in eucalyptus plantations. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 10, e0118515. doi:10.1371/journal.pone.0118515, 2015.
- RICHARDS, A.E.; FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; SCHERER-LORENZEN, M. The influence of mixed tree plantations on the nutrition of individual species: a review. **Tree physiology**, Oxford, v. 30, p. 1192–208, 2010.
- ROSSI, L.M.B.; AZEVEDO, C.P.; SOUZA, C.R. *Acacia mangium*. Manuais: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 29p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Fatos e números do Brasil florestal, 93 p. 2008. Disponível em: <http://www.sbs.org.br/FatoseNumerosdoBrasilFlorestal.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2015.

SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. Disponível em: <http://www.florestal.gov.br/> Acesso em: 11 fev. 2015.

SILVA, E.V.; GONÇALVES, J.L.M.; COELHO, S.R.F.; MOREIRA, R.M.; MELLO, S.L.M.; BOUILLET, J-P.; JOURDAN, C.; LACLAU, J-P. Dynamics of fine root distribution after establishment of monospecific and mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 325, p. 305–318, 2009.

SILVA, G.T.A.; RESENDE, A.S.; CAMPELLO, E.F.C; DIAS, P.F.; FRANCO, A.A. **O papel da fixação biológica do nitrogênio na sustentabilidade de sistemas agroflorestais**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 36p. (Documentos, Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498;231).

VANDERMEER, J.; PPERFECTO, I. **Breakfast of biodiversity: the truth about rainforest destruction**. Food First Books, Oakland, 1995. 185p.

VERSINI, A.; ZELLER, B.; DERRIEN, D.; MAZOUIMBOU, J-C.; MARESCHAL, L.; SAINT-ANDRE, L.; RANGER, J.; LACLAU, J-P. The role of harvest residues to sustain tree growth and soil nitrogen stocks in a tropical *Eucalyptus* plantation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 376, p. 245–260, 2013.

VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E.B.; SPRENT, J.I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 57/58, p. 1–45, 2002.

VOIGTLAENDER, M.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; PICCOLO, M.C.; MOREIRA, M.Z.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J.; BOUILLET, J-P. Introducing *Acacia mangium* trees in *Eucalyptus grandis* plantations: consequences for soil organic matter stocks and nitrogen mineralization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 352, p. 99–111, 2012.

WICHERN, F.; EBERHARDT, E.; MAYER, J.; JOERGENSEN, R.G.; MÜLLER, T. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.40, p. 30-48, 2008.

2 MAIOR FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE N₂ PELA ACÁCIA ASSOCIADA COM EUCALIPTODO QUE EM MONOCULTURA APÓS UMA ROTAÇÃO FLORESTAL

Resumo

A associação de árvores fixadoras de nitrogênio (AFN) e *Eucalyptus* podem promover ganhos em biomassa, nutrientes no solo e carbono estocado. Estudos têm mostrado que o N derivado a partir da fixação simbiótica (%Nd_{fa}) pelas AFN muda ao longo do ano em função da disponibilidade de recursos no ambiente. Uma tendência de diminuição do %Nd_{fa} é geralmente observada com o passar da idade das plantas. Aqui, foi estudada a variação sazonal do %Nd_{fa} pela *Acacia mangium* estabelecidas em monocultura ou em associação com *Eucalyptus grandis*, entre 27 e 39 meses após o plantio de uma segunda rotação florestal. %Nd_{fa} foi estimado a cada três meses pela técnica da diluição isotópica do ¹⁵N. Foi aplicado o fertilizante sulfato de amônio enriquecido com ¹⁵N sobre a serapilheira de parcelas de 900 m² parcela⁻¹ com plantios puros de *Acacia* (100A) e *Eucalyptus* (100E) e plantio misto com proporção igual entre *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis* (50E:50A). Em cada parcela e espécie, foram amostradas folhas em cada terço de copa a partir de 4 árvores representativas da área basal do povoamento. O crescimento das árvores foi regularmente mensurado e a biomassa foi estimada aos 39 meses. A fixação de N₂ pelas árvores de *Acacia* no 100A foi insignificante, exceto no verão, com %Nd_{fa} de 40% e foi condizente com o maior crescimento em altura e diâmetro da *Acacia* no 100A. Em contraste, o %Nd_{fa} das árvores de *Acacia* no 50E:50A mudou pouco durante o período de estudo, com valores variando de 29% a 60%. A competição com o *Eucalyptus* reduziu o crescimento da *Acacia* em mistura. Entretanto, o crescimento e o conteúdo de N por unidade de árvore de *Eucalyptus* foram maiores no plantio misto do que em monocultura. Esse estudo mostra que a maior disponibilidade de N no solo no 100A do que no 50E:50A após uma rotação florestal pode reduzir a fixação na monocultura de *Acacia* durante a segunda rotação em comparação a mistura entre *Acacia* e *Eucalyptus*. Maior fixação de N₂ pela *Acacia* no 50E:50A do que no 100A pode ser relacionado a mais alta competição das árvores de *Eucalyptus* do que das árvores de *Acacia* pelo N do solo.

Palavras-chave: Fixação do N₂; ¹⁵N; Diluição isotópica; Competição; Plantio misto; Monocultivo; *Eucalyptus grandis*; *Acacia mangium*

Abstract

Association of Nitrogen-Fixing Trees (NFT) and *Eucalyptus* may promote gains in biomass, nutrient soil availability and carbon storage. Studies have shown that the N derived from symbiotic N₂-fixation (%Nd_{fa}) by NFT may change along the year as function of the availability of environment resources. A trend in %Nd_{fa} decrease with tree age is generally observed. Here, we studied the seasonal variation of %Nd_{fa} by *Acacia mangium* trees established in monoculture or in association with *Eucalyptus grandis*, between 27 and 38 months after planting. %Nd_{fa} was estimated every three months, by ¹⁵N isotopic dilution technique. ¹⁵N-enriched ammonium sulfate fertilizer was applied on the litter in 900 m² plots of pure *Acacia* (100A) and pure *Eucalyptus* (100E), and of mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* trees in equal proportion (50E:50A). For each plot and species, we collected leaves on four trees covering the range of tree basal area. The leaves were sampled in each third of canopy. Tree growth was regularly measured and tree biomass was estimated at 39 months. *Acacia* exhibited negligible N₂ fixation in 100A except in summer with %Nd_{fa} of 40%. In summer, the %Nd_{fa} was followed by higher growth rates in diameter and height in 100A. By contrast, %Nd_{fa} of *Acacia* trees in 50A:50E showed little variation during the study period with values ranging between 29% and 60%. Competition

with *Eucalyptus* trees depleted *Acacia* tree growth in mixture. By contrast, individual *Eucalyptus* tree growth and N content were higher in mixed-species plantations than in monoculture. Higher soil N available in 100A than in 50A:50E after one stand rotation may deplete N₂ fixation in *Acacia* monoculture during the second rotation in comparison to mixture of *Acacia* and *Eucalyptus*. Higher N₂ fixation by *Acacia* in 50A:50E than in 100A may be linked to higher competition of *Eucalyptus* trees than *Acacia* trees for soil N.

Keywords: N₂ fixation; ¹⁵N; Isotope dilution; Competition; Mixed-species plantations; Monoculture; *Eucalyptus grandis*; *Acacia mangium*

2.1 Introdução

A associação de árvores fixadoras de nitrogênio (AFN) e árvores não fixadoras de nitrogênio pode ser benéfico para a produção de biomassa do povoamento (BOUILLET et al., 2013; FORRESTER, 2014; PIOTTO, 2008), o sequestro de carbono no solo (BLASER et al. 2014; FORRESTER et al. 2013), a diversidade da fauna e dos microrganismos do solo (BINI et al., 2013; MANHÃES et al. 2013; RACHID et al., 2013) e a disponibilidade de nutrientes no solo (BLASER et al. 2014; KOUTIKA et al. 2014; VOIGTLAENDER et al. 2012). Além disso, AFN foram responsáveis por fornecer mais do que 50% do nitrogênio necessário para suportar a acumulação de 50 Mg ha⁻¹ de carbono nas plantas durante os primeiros 12 anos de sucessão florestal em florestas tropicais na América central (BATTERMAN et al., 2013a). O fornecimento de N a partir de AFN como as árvores leguminosas para outras espécies em companhia pode ocorrer rapidamente através de caminhos abaixo do solo ou em mais longo prazo através da decomposição da serapilheira e de resíduos culturais (BEER, 1988; BINKLEY et al., 2003; FORRESTER et al., 2006).

A fixação do N₂ é controlada por vários fatores, como a disponibilidade de N e água no solo, a limitação nutricional (e.g. fosforo – P e molibdênio), sombreamento e interações entre as plantas e microrganismos do solo (BARRON et al., 2009; DOMMERGUES, 1995; HARTWIG, 1998; WALSH, 1995; VITOUSEK et al., 2002), os quais podem sofrer influência da sazonalidade climática (VITOUSEK et al., 2002). A fixação de N₂ da leguminosa *Inga punctata* foi limitada pelo P em solos deficientes em P e foi controlado pela disponibilidade de N em solos não limitados pelo P (BATTERMAN et al., 2013b). Mudanças de *Acacia mangium* crescendo em condições controladas sobre solos deficientes em P apresentaram altas taxas de crescimento, produção de nódulos e taxas de fixação de N₂ quando estavam associadas com ectomicorrizas (DIAGNE et al., 2013). O efeito da disponibilidade de água sobre a produção de nódulos e a fixação é ainda controverso. Seca moderada aumentou as deficiências de N no solo, a biomassa e nódulos e o acúmulo de N de *Robinia pseudocacia* crescendo em condições controladas (WURZBURGER; MINIAT,

2014). Entretanto, Boring e Swank (1984) associaram o estresse hídrico ocorrido no período de verão à forte diminuição da massa de nódulos de *Robinia pseudocacia* com 4 anos de idade. Elevadas temperaturas e umidades do solo durante a primavera e o outono levaram ao aumento da massa de nódulos e das taxas de redução do acetileno de plantas de *A. dealbata* em florestas dominadas por *Eucalyptus regnans* com dois anos de idade (ADAMS; ATTIWILL, 1984). A atividade dos nódulos de *Glycine max* crescendo em condições controladas foi maior quando estavam em sombreamento moderado (~ 20%) e diminuiu com o aumento do sombreamento (TRANG; GIDDENS, 1980; WAHUA; MILLER, 1978).

O percentual de N derivado a partir do N₂ atmosférico (%Nd_fa) varia dependendo da idade e espécie (BARRON et al., 2011; HOULTON et al., 2008; ISAAC et al., 2011; MENGE; HEDIN, 2009; PARROTTA et al., 1996). Valores de %Nd_fa variando a partir de 10 e 90% podem ser encontrados para a maioria das árvores leguminosas tropicais (BINKLEY; GIARDINA, 1997; BOUILLET et al., 2008; FORRESTER et al., 2006). Entre 1 e 3,5 anos após o plantio em associação com *Eucalyptus robusta*, *Leucaena leucocephala* reduziu linearmente o %Nd_fa a partir de 100% para menos de 40%, enquanto o %Nd_fa de *Casuarina equisetifolia* variou pouco entre 45% para 60% (PARROTTA et al., 1996). À queda da fixação do N₂ ao longo do tempo tem sido associada, principalmente, à habilidade de árvores leguminosas em regular a fixação dependendo de seus requerimentos em N, que podem ser supridos pela ciclagem bioquímica e mudanças na disponibilidade de N no solo (MENGE; HEDIN, 2009; RICHARDS et al., 2010). Esse mecanismo tem sido identificado em florestas tropicais naturais (BARRON et al., 2011; MENGE et al., 2009) e plantações florestais tropicais mistas (PARROTTA et al., 1996).

A competição intra e interespecífica pode também influenciar a fixação do N₂ (DOMMERGUES et al., 1995; HAGAN; JOSE, 2011; FORRESTER et al., 2007; RICHARDS et al., 2010). O decréscimo na atividade de redução do acetileno em nódulos da *A. mangium* entre 18 e 30 meses após o plantio foi associada ao aumento da competição intra e interespecífica (e.g. pela água no solo) em monocultivos ou em mistura com *E. grandis* (BOUILLET et al., 2008). Os menores valores de fixação de N₂ de *Pisum sativum* quando associada com *Hordeum vulgare* do que em plantios monoespecíficos foram atribuídos pela competição por luz por *H. vulgare* (JENSEN, 1996). A competição promovida por *Pinus palestris* induziu ao aumento da massa de nódulos e da fixação de N de *Morella cerifera* (HAGAN; JOSE, 2011). Os maiores valores de %Nd_fa por *Pseudosamanea guachapele* em plantações mistas com *Eucalyptus grandis* do que em monocultivo poderia ser explicado pela maior competição de *E. grandis* do que *P. guachapele* para o N do solo (BALIEIRO et al.,

2008). Uma competição mais forte pelo N do solo a partir de gramíneas induziu a fixação de N_2 a partir de diversas espécies de *Acacia* presentes nas savanas africanas (CRAMER et al., 2007).

Dessa forma, a quantidade de N fixado e a facilitação promovida a partir da leguminosa para não leguminosas pode ser alterado em função das variações sazonais no ambiente e pela competição entre as plantas pelos recursos de crescimento como nutrientes, água e luz (RICHARDS et al., 2010). Não foram encontrados estudos que avaliassem em condições de campo a variação sazonal da fixação do N_2 , em plantações florestais de *A. mangium* em monocultivo ou em associação com *E. grandis*, sendo esse o objetivo do presente estudo. Essas espécies fornecem grande parte dos produtos florestais ao redor do mundo (FAO, 2010) e a introdução da *Acacia* tem se mostrado como potencial para aumentar a biomassa e o sequestro de carbono nas plantações de *Eucalyptus* tropicais (FORRESTER et al., 2006; BOUILLET et al., 2013). As hipóteses dessa pesquisa foram: 1) existe uma variação sazonal da %Ndfa independentemente do tipo de plantio (misto ou monocultivo); 2) o %Ndfa da *A. mangium* é maior quando está associada com *E. grandis* do que em monocultura devido a competição interespecífica pelo N do solo.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido na estação experimental de Itatinga (23°80'20"S e 48°83'80"W – 863 m de altitude) da Universidade de São Paulo. O relevo da área de estudo é típico do planalto ocidental de São Paulo, com topografia suave ondulada. O experimento está localizado no topo de uma encosta com declividade menor que 3%. Os solos foram classificados como Latossolos Vermelho-Amarelo Distrófico de acordo com critérios de classificação da EMBRAPA (1999). Foi observada alta uniformidade textural até 1 m de profundidade, com média de 13% de argila, e de média 17% entre 1 e 3 m de profundidade (VOIGTLAENDER et al. 2012). A fertilidade do solo e a matéria orgânica diminuíram bruscamente abaixo de 5 cm de profundidade. Na primeira camada de solo (entre 0-5 cm) foram observados C total de 17,6 g kg⁻¹ de solo, N total de 0,9%, P-resina de 4,0 mg kg⁻¹ e CTC de 1,76 cmolc kg⁻¹ de solo (VOIGTLAENDER et al., 2012). O baixo estoque de nutrientes no solo aliados ao longo período de cultivo com eucaliptos (> 60 anos) indicaram um ambiente promissor para respostas da inclusão de leguminosas N_2 -fixadoras em plantios de *Eucalyptus* (LACLAU et al., 2008).

A precipitação média anual na área de estudo nos 15 anos anteriores foi de 1360 mm e a temperatura média anual de 19 °C, com estação seca e fria no período de junho a setembro, onde a precipitação média acumulada é de 225 mm e temperatura média é de 17,8 °C. Durante o período do experimento (abril/12–março/13) a precipitação acumulada foi de 1611 mm e a temperatura média foi de 19,8 °C (Figura 1).

Figura 1—Temperatura média (triângulos) e precipitação diária (barras) durante o período experimental e indicação das épocas de amostragem (setas) após a aplicação do ^{15}N em 15-16 de abril

2.2.2 Desenho experimental

Em maio de 2003, o experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados contendo sete tratamentos em quatro blocos, para testar plantios puros e consorciados de *A. mangium* e *E. grandis*. Cada parcela experimental tinha área total de 30 x 30 m, com 18 x 18 m de parcela útil, com plantas espaçadas 3 x 3 m e bordadura dupla. Detalhes do procedimento de plantio, tratos culturais e tratamentos testados são apresentados por Laclau et al. (2008). Em maio de 2009 as árvores foram cortadas e os resíduos foram uniformemente distribuídos em cada parcela. Em novembro de 2009 mudas de *A. mangium* e *E. grandis* foram replantadas respeitando o mesmo desenho experimental da rotação anterior. Mudas de *A. mangium* foram inoculadas com estirpes de bactérias fixadoras de N_2 (BR 3609T e BR 6009) selecionados especificamente pela EMBRAPA Agrobiologia (Seropédica-RJ) para promover a fixação de N_2 em associação com *A. mangium*. No plantio foram aplicados 40, 9, 3, 6, 3 e 1 g planta⁻¹ de P, K, B, Fe, Zn, respectivamente, a 20 cm de distância de cada planta.

Não foram aplicados fertilizantes nitrogenados durante a primeira e segunda rotação, exceto num tratamento controle com monocultivo de *E. grandis* e aplicação de 120 kg fertilizante nitrato de amônio por hectare. Uma resposta a fertilização nitrogenada foi detectada nos primeiros 2 anos após o plantio da primeira rotação nesse tratamento.

O presente estudo envolveu os seguintes tratamentos com plantas espaçadas 3 x 3 m (1111 plantas ha⁻¹):

- 100A, monocultivo de *A. mangium*;
- 100E, monocultivo de *E. grandis*;
- 50E:50A, plantio misto com mesma proporção de plantas de *E. grandis* e *A. mangium* (555 plantas ha⁻¹ por espécie).

2.2.3 Crescimento das plantas

O crescimento em altura (m) e diâmetro a 1,3 m de altura foi mensurado em todos os tratamentos e blocos aos 22, 24, 31 34 e 41 meses após plantio.

2.2.4 Aplicação do fertilizante enriquecido com ¹⁵N

Entre os dias 15 e 16 de abril de 2012 (~ 29 meses após o plantio) foi aplicado com um regador 0,027 g m⁻² de N como sulfato de amônio (com 99,8% atoms de ¹⁵N) diluído em ~ 1 L de água m⁻², sobre a serapilheira de uma parcela, totalizando uma área de 900 m² por tratamento. Essa quantidade aplicada corresponde a 0,3 kg de N ha⁻¹. Foi considerado que a taxa de fixação não foi alterada pela aplicação do ¹⁵N no solo (PARROTA et al., 1996; BOUILLET et al., 2008). Somente um bloco foi utilizado para esse estudo devido a problemas operacionais (i.e. altos custos na aplicação do ¹⁵N altamente enriquecido e instalação de andaimes com até 18 m de altura para amostragens das árvores, e.g. Figura 2). Entretanto, não foram observados diferenças estatísticas para o crescimento em altura e área basal individual entre o bloco 2 (onde ocorreu a aplicação do ¹⁵N) e os demais blocos (Figura 3); e o crescimento das plantas no bloco 2 foi intermediário ao crescimento das plantas nos demais blocos.

Figura 2 - Andaimos instalados (com até 18 m de altura) para as coletas de folhas das árvores amostras no monocultivo de *E. grandis* ao longo de 12 meses de experimento. Outro andaime semelhante foi instalado para as coletas de folhas do *E. grandis* no plantio misto

Figura 3 - Crescimento em altura e diâmetro de árvores de *A. mangium* em parcelas experimentais (Blocos: 1, 2 e 3) com a mistura de *E. grandis* (50A:50E – *Acacia*) ou monocultivo (100A). As barras de erros indicam o desvio padrão com N=36 *A. mangium* (100A) and N=18 (50A:50E – *Acacia*). Não foram observadas diferenças estatísticas (ANOVA, tratamento x data) no crescimento em altura e área basal individual entre os blocos

2.2.5 Amostragens e análises isotópicas

Em cada tratamento e espécie, 4 árvores foram selecionadas de acordo com a distribuição em classes de área basal. As coletas ocorreram nos meses de junho (final do outono), setembro (final do inverno), dezembro (final da primavera) e março (final do verão) subsequentes à aplicação do ^{15}N no mês de abril (2012). Em cada árvore e data de coleta foram amostradas todas as folhas de dois ramos sistematicamente distribuídos (norte-sul ou leste-oeste) em cada terço da copa (em média 35 g de folhas por terço da copa). Essa metodologia foi utilizada por ser alternativa a amostragens destrutivas e pode ser usada devido as fortes correlações entre o N das folhas e de outros compartimento da planta (PARROTTA et al., 1996; BOUILLET et al., 2008;). Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar com 65 °C, até peso constante. Posteriormente, elas foram

moídas em moinho de facas do tipo Wiley ($\pm 0,8$ mm) e armazenadas em potes estanques de acrílico de 0,03 L. A limpeza entre amostras foi efetuada com aspirador de pó, jato de ar comprimido e álcool etílico.

As análises de N total (%) e ^{15}N (atom %) foram realizadas no laboratório de isótopos estáveis (CENA-USP), em espectrômetro de massas para análise de razão isotópica de elementos leves (modelo Hydra 20-20), acoplado a um analisador automático de N (modelo ANCA-GSL, Sercon Co., Krewe, UK). Foram utilizados nas análises, aproximadamente, 8 mg de folhas. As precisões das análises isotópicas foram de 0,001 átomos % de ^{15}N .

2.2.6 Estimativa da biomassa e conteúdo de N

A biomassa das árvores foi avaliada no mês de janeiro de 2013 aos 39 meses após o plantio. Foram derrubadas entre 6 e 10 árvores por tratamento, distribuídas por classes de área basal. Para os tratamentos com *Acacia* foram mensurados a biomassa de todos os fustes por planta. Em cada árvore, foi mensurado o peso úmido de todas as folhas em cada terço da copa (inferior, médio e superior), galhos, casca e madeira, e recuperado amostras para avaliação do teor de umidade no laboratório (em estufa com 65°C , até peso constante).

A metodologia para avaliação da biomassa completa e coletas de amostras é fornecida por Laclau et al. (2008). A biomassa seca por planta de cada compartimento que nesse estudo envolveu folhas, galhos, casca e madeira foi para o ajuste da eq. 1 (Tabela 2.1, Anexo A):

$$\text{Biomassa} = a + b * \text{Dap}^2 * H \quad (1)$$

Onde: Biomassa em g de matéria seca planta⁻¹ de cada compartimento; a e b, coeficientes do modelo; H, altura total em m; Dap, diâmetro na altura de 1,30 m do solo, em m.

O Dap equivalente foi calculado quando havia mais de um fuste por acácia, sendo o resultado da raiz quadrada da soma dos diâmetros ao quadrado de cada fuste por árvore:

$$\text{Dap equivalente} = \sqrt{\sum_{i=1}^j \text{Dap } i^2 + \dots + \text{Dap } j^2} \quad (2)$$

Onde: o Dap equivalente em m.

Amostras de folhas, galhos, casca e madeira de cada uma das árvores usadas para a análise da produção de biomassa, foram moídas e análises de N total foram feitas pelo método Kjeldahl no laboratório de Ecologia Aplicada (LEA-LCF) da Universidade de São Paulo. As concentrações de N foram utilizadas para calcular o conteúdo de N por compartimento e

planta. As equações foram ajustadas de maneira semelhante aquelas geradas para biomassa (Tabela 2.2, AnexoA), sendo y o conteúdo de N por compartimento e planta (g N planta^{-1}).

2.2.7 Cálculos

A partir das amostras de folhas coletadas sazonalmente, os valores de ^{15}N (atom%) encontrados nas análises no espectrômetro foram convertidos para $\delta\text{‰}$ de acordo com a eq. (1):

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{amostra}}(\text{‰}) = \left(\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{amostra}} - (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar}}} \right) \times 1000 \quad (1)$$

Onde: ^{15}N é o valor em átomos % observados na amostra e no ar (0,3663); $^{14}\text{N} = 100 - ^{15}\text{N}$ (atom%).

O percentual do N derivado da fixação do N_2 (%Ndfa) foi calculado para cada *Acacia* através da eq. (2) (FRIED; MIDDELBOE, 1977):

$$\% \text{Ndfa } Acacia = \left(1 - \frac{AE_{\text{Fx}}}{AE_{\text{REFx}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: AE_{Fx} é o ^{15}N (átom% em excesso) da *Acacia* em cada período de amostragem e AE_{REFx} é o valor médio ($N=4$) de ^{15}N (átom% em excesso) do *E. grandis* em cada período de amostragem.

Foi adotado o *Eucalyptus* no monocultivo (100E) como espécie referência para a fixação da *Acacia* em monocultivo e em plantio misto. Não foi aberto trincheiras para o isolamento das parcelas (PARROTTA et al., 1996) devido ao tamanho da parcela (900 m^2) e a seleção das árvores localizadas apenas nas regiões centrais de cada parcela útil (540 m^2).

Devido ao desenho experimental com aplicação do ^{15}N em um bloco e as amostragens concentradas nesse bloco, não foi possível comparar estatisticamente os resultados obtidos. Foram usadas tendências nos valores médios e respectivos desvios padrões para suportar os resultados. As informações sobre a serapilheira foram usadas como material complementar, e os resultados são discutidos com as figuras localizadas no Anexo A (Figura 2.1). As equações de biomassa e de mineralomassa de N foram estabelecidas no software SigmaPlot 11.0 (Systat Software, 2008).

2.3 Resultados

2.3.1 Crescimento relativo

O crescimento relativo das *Acacias* e *Eucalyptus* nos plantios mistos em relação aos respectivos monocultivos variou ao longo do tempo (Figura 4). *Acacia* associada ao *Eucalyptus* cresceu menos do que *Acacia* em monocultivo entre 22 e 41 meses de idade. Aos

41 meses de idade, *Acacia* associada ao *Eucalyptus* apresentou, em média, 88% da altura e do diâmetro da *Acacia* em monocultivo. A altura média dos *Eucalyptus* no plantio misto foi menor do que a do *Eucalyptus* em monocultivo, mas a diferenças diminuíram com a idade. Em contraste, *Eucalyptus* no plantio misto cresceram mais em diâmetro (10% em média) do que *Eucalyptus* em monocultivo.

Figura 4 - Crescimento relativo em altura e diâmetro de árvores *A. mangium* (50E:50A - *Acacia*) e *E. grandis* (50E:50A - *Eucalyptus*) no plantio misto em relação ao monocultivo de *A. mangium* (100A) ou *E. grandis* (100E), respectivamente, em função da idade das plantas. Barras de erros indicam o desvio padrão da média (N= 3 blocos)

2.3.2 Nitrogênio nas árvores e produção de biomassa

As concentrações de N (%) nas folhas foram diferentes entre as espécies em função do tipo de plantio (Figura 5). As concentrações de N foram maiores nas folhas da *Acacia* associado com *Eucalyptus* (2,6%) do que na *Acacia* em monocultivo (2,1%), independente da época do ano.

Figura 5 - Variação sazonal na concentração de N (%) nas folhas em monocultivo de *A. mangium* (100A) e *E. grandis* (100E) e no plantio misto de *A. mangium* (50E:50A - *Acacia*) e *E. grandis* (50E:50A - *Eucalyptus*). As barras de erros indicam o desvio padrão da média (N=4)

No final do experimento, aos 39 meses de idade das plantas (período de verão), plantas de *Eucalyptus* apresentaram 24% mais biomassa (soma de folhas, galhos, casca e madeira, estimados a partir de equações de biomassa) quando associados com *Acacia* do que no plantio monoespecífico de *Eucalyptus* (Figura 6a). Em contrapartida, um crescimento 24% menor foi observado na *Acacia* associada com *Eucalyptus* em comparação ao monocultivo de *Acacia*. A soma do conteúdo de N (g planta^{-1}) mostrou que *Eucalyptus* associados com *Acacia* apresentaram 37% mais N na biomassa de folhas, galhos, casca e madeirado que *Eucalyptus* em monocultivo (Figura 6b). Valores menores foram observados em relação aos plantios de *Acacia*, com 28% menos N na biomassa de *Acacia* associada com *Eucalyptus* do que na *Acacia* em monocultura.

Figura 6 – Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de biomassa (kg planta⁻¹) (a) e conteúdo de N nas (g planta⁻¹) (b) de *A. mangium* e *E. grandis* em monocultura (100A ou 100E, respectivamente) e plantações mistas (50E:50A – *Acacia* ou 50E:50A – *Eucalyptus*) aos 39 meses de idade.

2.3.3 Variação sazonal do ¹⁵N e do %Nd_fa

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) foram sempre inferiores nas folhas da *Acacia* no plantio misto do que quando elas estavam em monocultura, independente da época do ano; e o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ foram 23,9 ‰ e 41,8‰, respectivamente (Figura 7a).

Figura 7 - Variação sazonal do $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nas folhas *A. mangium* e *E. grandis* em monocultura (100A ou 100E, respectivamente) e plantações mistas (50E:50A – *Acacia* ou 50E:50A – *Eucalyptus*) (a); e, (b) N derivado da fixação (%Ndfa) a partir da *A. mangium* em monocultura e plantio misto usando *E. grandis* em monocultura ou plantio misto, respectivamente, como espécie referência para a fixação. As barras de erros indicam o desvio padrão da média (N=4)

Em contraste, os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas do *Eucalyptus* no plantio misto (80,6‰) foram, aproximadamente, o dobro do encontrado no *Eucalyptus* no monocultivo (43,6‰) e apresentaram pouca variação sazonal. *Acacia* e *Eucalyptus* em monocultivo apresentaram valores similares de $\delta^{15}\text{N}$ em 3 sobre 4 épocas do ano. Entretanto, uma mudança ocorreu principalmente no verão (março), onde os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) foram 67% maiores

nas folhas do *Eucalyptus* no monocultivo (50,3‰) do que na *Acacia* no monocultivo (30,0‰).

Os valores de %Ndfa da *Acacia* variaram de 29% a 60% no plantio misto e de 4% a 40% quando *Acacia* estava em monocultivo, sendo que os valores médios anuais de %Ndfa foram de 44% e 14%, respectivamente (Figura 7b).

2.4 Discussão

2.4.1 Variação sazonal da fixação do N₂

%Ndfa foi estimado pelas diferenças nos valores de ¹⁵N (átomos em excesso) nas folhas da *Acacia* e nas folhas do *Eucalyptus* (Figura 7a). Valores similares de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nas folhas de *Acacia* e *Eucalyptus* em monocultivos no mês de junho, setembro e dezembro indicam, dessa forma, que muito pouco do N demandado pela *Acacia* teve como origem a fixação biológica do N₂ (Figura 7b). *Acacia* no 100A, entretanto, passaram a investir na fixação que atendeu, aproximadamente, 40% do N delas no período de verão. Em contraste, o %Ndfa da *Acacia* foi pouco alterado ao longo do ano quando ela estava associada com *Eucalyptus*. Diversos fatores podem ser associados a essas variações sazonais na fixação do N₂, como, por exemplo, a diminuição na disponibilidade de N no solo nas épocas de menor temperatura e precipitação (junho e setembro) ou aumento da disponibilidade de N nas épocas mais quentes e húmidas (Figura 1) (VOIGTLAENDER, 2012). A ausência de %Ndfa no final do inverno (setembro) e baixo %Ndfa no início do verão (dezembro) poderia estar associada à existência de reservas de N estocado durante período de mais baixo crescimento (MILLARD; GRELET, 2010), os quais foram suficientes para atender as demandas da *Acacia* no 100A (RICHARDS et al., 2010). Além disso, embora tenha havido alta mineralização do N nos períodos mais quentes e úmidos (VOIGTLAENDER, 2012), as quantidades de N disponíveis no solo ou derivado da ciclagem bioquímica podem não ter sido suficientes para sustentar a demanda de N para promover o crescimento da *Acacia* no 100A entre dezembro e março. *Acacia* no 100A cresceu mais do que quando ela estava associada com *Eucalyptus* (Figura 4) e, dessa forma, um investimento na produção de nódulos e na fixação seria esperado (ADAMS; ATTIWILL, 1984; RICHARDS et al., 2010).

Esses resultados sugerem que enquanto *Acacia* no 100A regula as taxas de fixação do N₂ sazonalmente em função de suas demandas e associados às condições ambientais (e.g. disponibilidade de N no solo, maiores temperaturas e precipitações favoráveis ao crescimento), *Acacia* está fadada a investir na fixação devido à competição com o *Eucalyptus* pelo N do solo. Esses resultados foram condizentes com outros estudos como, por exemplo, o

%Ndfa de *Pseudosamanea guachapele* foi maior (até 60%) quando ela estava ocupando o sub-bosque de *Eucalyptus grandis* do que em monocultura (até 36%) aos 7 anos de idade (BALIEIRO et al., 2008). Resultados opostos foram observados quando *Leucaena leucocephala* não sofria competição forte com *E. robusta*, e uma queda no %Ndfa foi observada entre 1 e 3,5 anos após o plantio, sendo associados a melhoria da qualidade do solo e da disponibilidade de N (PARROTTA et al., 1996). Essas diferenças, entretanto, estão de acordo com estudos que indicam que leguminosas tropicais adotam a estratégia de fixação facultativa em função da disponibilidade de recursos no solo notadamente o N (MENGE et al., 2009; BARRON et al., 2011). O presente estudo com diluição isotópica com ^{15}N como maneira indireta de estimar o %Ndfa pode ajudar a explicar outros estudos, em que não foi possível estimar a fixação pela abundância natural do ^{15}N quando espécies do gênero *Acacia* estavam ocupando o sub-bosque de *Eucalyptus* (FORRESTER et al., 2007; BOUILLET et al., 2008).

2.4.2O tipo de plantio altera as quantidades de N fixadas pela *Acacia* durante a segunda rotação?

Acacia fixou mais do que 40% do seu N quando estava em competição interespecífica com *Eucalyptus*, mas ela reduziu em 24% e 28% a biomassa e N acumulado na biomassa, respectivamente, em relação ao 100A aos 39 meses após o plantio (Figura 6a e b). Entretanto, se considerado o valor médio anual do %Ndfa que foi 14% (100A) e 44% (50E:50A) multiplicado pelas quantidades de N acumuladas na biomassa de cada árvore da parcela aos 39 meses (estimadas com equações de mineralomassa no bloco 2), teria-se $35 \pm 22 \text{ g planta}^{-1}$ (100A) e $94 \pm 35 \text{ g planta}^{-1}$ (50E:50A). Se os valores forem extrapolados para escala de hectare (a partir da soma das massas de N fixado na parcela), teria-se 38 kg ha^{-1} (100A) e 50 kg ha^{-1} (50E:50A) de N fixado até os 39 meses de idade.

Esses resultados devem ser consistentes, se considerado que as quantidades de N mineral produzidos nos últimos dois anos da rotação anterior foram mais que duas vezes maiores no 100A ($148 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) do que no 100E ($65 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) (VOIGTLAENDER et al., 2012). Além disso, durante os dois primeiros anos desse experimento, as diferenças de N mineral produzidos nos plantios puros 100A e 100E se mantiveram, com 136 e $68 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, respectivamente, enquanto uma produção intermediária de N na ordem de $91 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ foi observado no plantio misto (50E:50A) (VOIGTLAENDER, 2012). A mesma autora verificou que após a rotação florestal com 7 anos no 100A e 50E:50A houve um incremento de N no solo de 456 e 287 kg ha^{-1} , respectivamente, em relação aos plantios monoespécíficos

de *E. grandis* (VOIGTLAENDER, 2012). Dessa forma, porque havia mais N disponível no solo com *Acacia* em monocultivo, elas, então, poderiam regular para baixo a fixação por causa dos custos energéticos da fixação que podem ser três vezes mais altos se comparados com os custos com a absorção de N a partir do solo (GUTSCHICK, 1981; POSTGATE, 1998; SCHUBERT, 1986). Ao contrário, *Acacia* precisou manter a fixação do N sempre alta porque não havia N suficientemente disponível no solo para as duas espécies, embora a um custo alto para *Acacia*. Como foi observado nesse estudo, *Eucalyptus* no 50E:50A acumularam em média 146 kg de N ha⁻¹ na biomassa enquanto 214 kg de N ha⁻¹ foram acumulados na biomassa dos *Eucalyptus* no 100E, aos 39 meses após o plantio. Dessa forma, é possível prever que eles foram competidores fortes pelo N do solo quando estavam associados com a *Acacia*.

Os resultados mostram que houve uma mudança na fixação do N na segunda rotação em relação à primeira. Durante os primeiros 30 meses da primeira rotação, aproximadamente 66 e 31 kg de N ha⁻¹ foram fixados nos plantios monoespecíficos de *A. mangium* e no plantio misto (100E:50A), respectivamente (BOUILLET et al., 2008). Os maiores valores de N fixado no 100A durante os primeiros 30 meses da rotação anterior (BOUILLET et al., 2008) do que os encontrados aqui, se devem provavelmente às menores quantidades de N disponível no solo após mais de 60 anos com monocultivos de *Eucalyptus* (LACLAU et al., 2008); obrigando, assim, *A. mangium* a obter mais N a partir da fixação do N atmosférico. Diferenças nas quantidades de N fixado, entretanto, ocorreram entre os plantios mistos (100E:50A vs. 50E:50A) devido ao efeito mais forte da competição do *E. grandis* sobre o crescimento da *A. mangium*, já que estavam com o dobro da densidade de plantas por unidade de área.

As taxas de N fixadas anualmente pela *Acacia* no 100A (~12 kg ha⁻¹ ano⁻¹) e 50E:50A (~15 kg ha⁻¹ ano⁻¹) observados aqui foram, entretanto, menores do que valores de 50-150 kg ha⁻¹ ano⁻¹ reportados para outras AFN do gênero *Acacia*, *Albizia*, *Leucaena* e *Casuarinas* em condições ótimas de crescimento (BINKLEY; GIARDINA, 1997). Esses resultados ressaltam, assim, a necessidade da boa adaptação da AFN às condições do sítio para promover a maximização do crescimento e da fixação e, conseqüentemente, da facilitação. Além disso, a queda brusca da fixação de N₂ pela *Acacia* durante os três primeiros anos após uma rotação de >7 anos sugere o efeito benéfico da competição interespecífica do *Eucalyptus* para promover a constante fixação do N na *Acacia*, já que a competição intraespecífica no 100A para promover a fixação foi restrita aos períodos de maior crescimento (verão).

2.4.3 Competição, facilitação e outros aspectos

O maior crescimento e consumo de N pelos *Eucalyptus* associados com a *Acacia* do que no monocultivo poderia levar a superestimação dos valores de %Ndfa. Estudo recente indicou que uma melhor estimativa da %Ndfa é feita quando a planta referencia cresce ao lado das plantas que estão fixando por causa da modificação da assinatura do ^{15}N no solo em virtude da transferência do N fixado, com efeito sobre as assinaturas de ^{15}N nas duas plantas (CARLSSON e HUSS-DANEL, 2013). Outro estudo também indicou que uma melhor estimativa da %Ndfa seria feita quando a planta referencia cresce ao lado das plantas fixadoras, sendo as parcelas isoladas por trincheiras (PARROTTA et al., 1996). Os resultados desse estudo, entretanto, sugerem que as estimativas da %Ndfa pela *Acacia* devem ser mais realísticas utilizando o *Eucalyptus* em monocultivo como planta referencia para a fixação do que o *Eucalyptus* associado com a *Acacia*. A maior absorção de N pelos *E. grandis* poderia ser associada à alta exploração do sistema radicular do *E. grandis* nas primeiras camadas de solo quando associado com a *A. mangium* (LACLAU et al., 2013).

A vantagem competitiva da *Acacia* promovida pela fixação do N_2 sobre o *Eucalyptus* não são observadas quando as plantações mistas são estabelecidas em condições sub ótimas para o crescimento da *Acacia* ótimas para o crescimento do *Eucalyptus* (BOUILLET et al., 2008, 2013; LACLAU et al., 2013). Eucaliptos prejudicaram o desenvolvimento das acácias antes dos 24 meses, com quedas constantes de diâmetro médio entre 22 até 41 meses após o plantio, e a altura média principalmente após 31 meses em relação ao 100A (Figura 4). Na região de estudo houve limitações climáticas para o desenvolvimento da *Acacia mangium*, como baixas temperaturas (com temperaturas mínimas de 5-7 °C entre junho e setembro/2012) e precipitações (com precipitação acumulada de 99 mm de junho e setembro/2012) (Figura 1). Condições ótimas de crescimento da *A. mangium* são regiões de clima úmido (com precipitação acima de 2000 mm) e com temperatura alta e estável (CATIE, 1992; ROSSI et al., 2003).

O princípio da exclusão competitiva de Gause (GAUSE, 1934) sugere que duas espécies só podem coexistir no habitat se ocuparem nichos diferentes e suficientes para seu crescimento. Leguminosas demandam mais fotoassimilados quando estão fixando N_2 (PATE, 1996) e a menor quantidade de radiação fotossinteticamente ativa disponível para *Acacia* no 50E:50A pode ter ocorrido, haja vista que *Eucalyptus* possuíam altura média 7 m superior do que *Acacia*, aos 3 anos após plantio. Durante o segundo e terceiro ano da rotação anterior desse experimento foi observada uma redução de $\approx 75\%$ na absorção de radiação fotossinteticamente (APAR) ativa pela *Acacia* 50E:50A em relação ao 100A; sendo que essas

diferenças tenderem a se manter até o final da rotação (LE MAIRE et al., 2013). Dessa forma, é esperado que a redução da quantidade de luz disponível e a redução do consumo de água pela *Acacia* no plantio misto em comparação ao 100A (DEUS JUNIOR, 2014) pode ter limitado a fotossíntese e a produção de fotoassimilados necessárias para o crescimento e para as trocas de carboidratos por nutrientes com organismos simbiotes (PATE, 1996).

O sombreamento moderado (18-20%) aumentou as taxas de redução do acetileno nos nódulos formados em plantas de *Glycine max*, entretanto, as taxas de redução do acetileno e o crescimento foram diminuídas com o sombreamento severo, acima de 80% (TRANG; GIDDENS, 1980; WAHUA; MILLER, 1978). O sombreamento pelo *Eucalyptus*, entretanto, pode ter levado a mudanças na composição química das folhas da *Acacia* (RICHARDS et al., 2010). Estudos encontraram maiores concentrações de proteínas nas folhas de leguminosas que estavam sombreadas (LIN et al., 2001), o que pode ser relacionado as mais altas concentrações de N nas folhas da *Acacia* no plantio misto do que no 100A (Figura 5). Concentrações mais altas de proteínas podem sugerir um ajuste fisiológico da *Acacia* em condições de sombreamento para promover uma ciclagem bioquímica mais eficiente (PATE, 1996). Outros estudos deveriam mensurar as concentrações de proteínas nas folhas da *Acacia* que ocupam o sub-bosque dos *Eucalyptus* assim como a serapilheira foliar. Maiores concentrações de compostos facilmente decomponíveis, como proteínas, nas folhas da *Acacia* poderiam acelerar a ciclagem de nutrientes nas plantações florestais mistas (KNOPS et al., 2002; RICHARDS et al., 2010).

Uma competição forte pelo P, no entanto, deve ser pouco provável nesses plantios, já que foram feitas adubações fosfatadas durante o plantio das duas rotações e outros estudos na mesma área mostraram que, de uma maneira geral, o plantio misto 50E:50A apresentou melhor funcionalidade dos microrganismos do solo e dos teores de P e N disponíveis do que o monocultivo de *Eucalyptus* (BINI et al., 2013); embora tenha sido mostrada para ocorrer em plantios mistos de *E. saligna* e *Falcataria molucana* crescendo em solos sem deficiências de N, devido ao maior crescimento dos *Eucalyptus* que absorveram mais P do solo e limitaram a absorção de P da leguminosa (BOYDEN et al., 2005).

2.5 Conclusões

Esse estudo indicou que existe uma forte variação sazonal do %Ndfa pela *Acacia mangium* quando ela está monocultivo; tendo a fixação do N₂ um papel importante (%Ndfa de 40%) no período de maior crescimento das plantas (verão). Em contraste, ao longo do ano, *Acacia* obteve pelo menos 30% do seu N a partir da fixação do N₂ atmosférico quando estava

associada com o *Eucalyptus*. Esse estudo sugere o importante papel da mistura de espécies fixadoras e não fixadoras de N₂ em promover a fixação do N₂, e que menos N pode ser fixado em monocultivos de *Acacia* após uma curta rotação florestal (6 anos) devido a maior disponibilidade de N no solo.

Embora o crescimento da *Acacia* tenha sido limitado desde 24 meses após o plantio, as árvores de *Eucalyptus* puderam aproveitar do N disponível no solo e de uma competição menor no plantio misto do que no monocultivo e atingir 24% mais biomassa por planta aos 39 anos após o plantio.

Referências

- ADAMS, M.A.; ATTWILL, P.M. Role of *Acacia* spp. in nutrient balance and cycling in regenerating *Eucalyptus regnans* F. Muell. forests. II* Field studies of acetylene reduction. **Australian Journal of Botany**, Victoria, v. 32, p. 217-223, 1984.
- BALIEIRO, F.C.; ALVES, B.J.R.; PEREIRA, M.G.; FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; CAMPELLO, E.F.C. Biological nitrogen fixation and nutrient release from litter of the Guachapele leguminous tree under pure and mixed plantation with *Eucalyptus*. **Cerne**, Lavras, v. 14, p. 185-193, 2008.
- BARRON, A.R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J.P.; WRIGHT, S.J.; KRAEPIEL, A.M.L.; HEDIN, L.O. Molybdenum limitation of symbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geoscience**, London, v. 2, p. 42-45, 2009.
- BARRON, A.R.; PURVES, D.W.; HEDIN, L.O. Facultative nitrogen fixation by canopy legumes in a lowland tropical forest. **Oecologia**, London, v. 165, p. 511-520, 2011.
- BATTERMAN, S.A.; HEDIN, L.O.; VAN BREUGEL, M.; RANSIJN, J.; CRAVEN, D.J.; HALL, J.S. Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession. **Nature**, London, v. 502, p. 224-227, 2013a.
- BATTERMAN, S.A.; WURZBURGER, N.; HEDIN, L.O. Nitrogen and phosphorus interact to control tropical symbiotic N₂ fixation: a test in *Inga punctata*. **Journal of Ecology**, London, v. 101, p. 1400-1408, 2013b.
- BEER, J. Litter production and nutrient cycling in coffee (*Coffea arabica*) or cacao (*Theobroma cacao*) plantations with shade trees. **Agroforestry Systems**, Missouri, v. 7, p. 103-114, 1988.
- BINI D.; SANTOSA C.A.; BOUILLET J-P. ; GONÇALVES J.L.M.; CARDOSO E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 57-66, 2013.
- BINKLEY, D. Nodule biomass and acetylene reduction rates of Red alder and Sitka alder on Vancouver Island, B.C. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 11, p. 281-286, 1981.

BINKLEY, D.; GIARDINA, C. 1997. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. In: NAMBIAR, E.K.S., BROWN, A.G. (Ed.). **Management of Soil, Nutrients and Water in Tropical Plantation Forests**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, n. 43, 1997. p. 297–337.

BINKLEY, D.; SENOCK, R.; BIRD, S.; COLE, T.G. Twenty years of stand development in pure and mixed stands of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Facaltaria moluccana*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 182, p. 93–102, 2003.

BLASER, W.J.; SHANUNGU, G.K.; EDWARDS, P.J.; VENTERINK, H.O. Woody encroachment reduces nutrient limitation and promotes soil carbon sequestration. **Ecology and Evolution**, London, v. 4, p. 1423–1438, 2014.

BOYDEN, S.; BINKLEY, D.; SENOCK, R. Competition and facilitation between *Eucalyptus* and nitrogen-fixing *falcataria* in relation to soil fertility. **Ecology**, Tempe, v. 86, p. 992–1001, 2005.

BORING, L.R.; SWANK, W.T. Symbiotic nitrogen fixation in regeneration Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) stands. **Forest Science**, Lawrence, v. 30, p. 528–537, 1984.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; MOREIRA, R.M.; TRIVELIN, P.C.O.; JOURDAN, C.; SILVA, E.; PICCOLO, M.C.; TSAI, S.; GALIANA, A. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil2: Nitrogen accumulation in the stands and biological N₂ fixation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3918–3930, 2008.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; VOIGTLAENDER, M.; GAVA, J.; LEITE, F.P.; HAKAMADA, R.; MARESCHAL, L.; MABIALA, A.; TARDY, F.; LEVILLAIN, J.; DELEPORTE, P.; EPRON, D.; NOUVELLON, Y. *Eucalyptus* and *Acacia* tree growth over entire rotation in single- and mixed-species plantations across five sites in Brazil and Congo. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 89–101, 2013.

CARLSSON, G.; HUSS-DANEL, K. Does nitrogen transfer between plants confound ¹⁵N-based quantifications of N₂ fixation? **Plant and Soil**, The Hague, v. 374, p. 345–358.

CATIE. **Mangium (Acacia mangium Willd) Especie de Árbol de Uso Múltiple em América Central**. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 1992. 56p. (Colección de Guías Silviculturales, 5).

CHALK, M. Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 17, p. 389–410, 1985.

CRAMER, M.D.; CHIMPHANGO, S.B.M.; VAN CAUTER, A.; WALDRAM, M.S.; BOND, W.J. Grass competition induces N₂ fixation in some species of African *Acacia*. **Journal of Ecology**, Londres, v. 95, p. 1123–1133, 2007.

DIAGNE, N.; THIOULOUSE, J.; SANGUIN, H.; PRIN, Y.; KRASOVA-WADE, T.; SYLLA, S.; GALIANA, A.; BAUDOUIN, E.; NEYRA, M.; SVISTOONOFF, S.; LEBRUN, M.; DUPONNOIS, R. Ectomycorrhizal diversity enhances growth and nitrogen fixation of *Acacia mangium* seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 57, p. 468–476, 2013.

DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. **Fertilizer Research**, The Hague, v. 42, p. 215–230, 1995.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solo. Brasília, 1999. 412p.

FAO, 2010. **Global Forest Resources Assessment**. URL <http://www.fao.org/forestry/fra/fra2010/en/>. Acesso em 7 mar. 2013.

FISHER, R.F.; BINKLEY, D. 2000. **Ecology and management of forest soils**. 3rd.ed. John Wiley, New York, 2000. p. 489.

FRIED, M.; MIDDELBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, The Hague, v. 47, p. 713–715, 1977.

FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; COWIE, A.L.; VANCLAY, J.K. Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: A review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, p. 211–230, 2006.

FORRESTER, D.I.; SCHORTEMAYER, M.; STOCK, W.D.; BAUHUS, J.; KHANNA, P.K.; COWIE, A.L. Assessing nitrogen fixation in mixed- and single-species plantations of *Eucalyptus globulus* and *Acacia mearnsii*. **Tree Physiology**, Oxford, v. 27, p. 1319–1328, 2007.

FORRESTER, D.I.; PARES, A.; O'HARA, C.; KHANNA, P.K.; BAUHUS, J. Soil organic carbon is increased in mixed-species plantations of *Eucalyptus* and nitrogen-fixing *Acacia*. **Ecosystems**, New York, v. 16, p. 123–132, 2013.

FORRESTER, D.I. The spatial and temporal dynamics of species interactions in mixed-species forests: From pattern to process. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 312, p. 282–292, 2014.

GUTSCHICK V.P. Evolved strategies in nitrogen acquisition by plants. **The American Naturalist**, Chicago, v. 118, p. 607–637, 1981.

HAGAN, D.L.; JOSE, S. Interspecific competition enhances nitrogen fixation in an actinorhizal shrub. **Plant Ecology**, Perth, v. 212, p. 63–68, 2011.

HARTWIG, U.A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Amsterdam, v. 1, p. 92–120, 1998.

HOULTON, B.Z.; WANG, Y-P.; VITOUSEK, P.M.; FIELD, C.B. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. **Nature**, London, v. 454, p. 327–330, 2008.

ISAAC, M.E.; HARMAND, J.-M.; LESUEUR, D.; LELON, J. Tree age and soil phosphorus conditions influence N₂-fixation rates and soil N dynamics in natural populations of *Acacia senegal*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 261, p. 582–588, 2011.

JENSEN, E.S. Grain yield, symbiotic N₂ fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-barley intercrops. **Plant and Soil**, The Hague, v. 182, p. 25–38, 1996.

KOUTIKA, L.-S.; EPRON, D.; BOUILLET, J.-P.; MARESCHAL, L. Changes in N and C concentrations, soil acidity and P availability in tropical mixed acacia and eucalypt plantations on a nutrient-poor Sandy soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 379, p. 205–216, 2014.

KNOPS, J.M.H.; BRADLEY, K.L.; WEDIN, D.A. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. **Ecology Letter**, Oxford, v. 5, p. 454–466, 2002.

LACLAU, J.-P.; BOUILLET, J.-P.; GONÇALVES, J.L.M.; SILVA, E.V.; JOURDAN, C.; CUNHA, M.C.S.; MOREIRA, R.M.; SAINT-ANDRÉ, L.; MAQUÈRE, V.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil. Growth dynamics and aboveground net primary production. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3905–3917, 2008.

LACLAU, J., RANGER, J., GONÇALVES, J.L.M., MAQUERE, V., KRUSCHE, A., M'BOU, A., NOUVELLON, Y., SAINT-ANDRÉ, L., BOUILLET, J.-P., PICCOLO, M.C., DELEPORTE, P. Biogeochemical cycles of nutrients in tropical *Eucalyptus* plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 259, p. 1771–1785, 2010.

LACLAU, J.-P.; NOUVELLON, Y.; REINE, C.; GONÇALVES, J.L.M.; KRUSHE, A.V.; JOURDAN, C.; LE MAIRE, G.; BOUILLET, J.-P. Mixing *Eucalyptus* and *Acacia* trees leads to fine root over-yielding and vertical segregation between species. **Oecologia**, London, v. 172, p. 903–913, 2013.

LE MAIRE, G.; NOUVELLON, Y.; CHRISTINA, M.; PONZONI, F.J.; GONÇALVES, J.L.M.; BOUILLET, J.-P.; LACLAU, J.-P. Tree and stand light use efficiencies over a full rotation of single- and mixed-species *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 288, p. 31–42, 2013.

LIN, C.H.; MCGRAW, M.L.; GEROGE, M.F.; GARRETT, H.E. Nutritive quality and morphological development under partial shade of some forage species with agroforestry potential. **Agroforestry Systems**, Missouri, v. 53, p. 269–281, 2001.

MANHÃES, C.M.C.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; SILVA-MOÇO, M.K.; GAMA-RODRIGUES, A.C. Meso- and macrofauna in the soil and litter of leguminous trees in a degraded pasture in Brazil. **Agroforestry Systems**, Missouri, v. 87, p. 993–1004, 2013.

MENGE, D.N.L.; HEDIN, L.O. Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120 000-year chronosequence in New Zealand. **Ecology**, Ithaca, v. 90, p. 2190–2201, 2009.

MENGE, D.N.L.; LEVIN, S.A.; HEDIN, L.O. Facultative versus obligate nitrogen fixation strategies and their ecosystem consequences. **The American Naturalist**, Chicago, v. 147, p. 465–477, 2009.

MILLARD, P.; GRELET, G-A. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. **Tree Physiology**, Oxford, v. 30, p. 1083-1095, 2010.

NOUVELLON, Y.; LACLAU, J.P.; EPRON, D.; LE MAIRE, G.; BONNEFOND, J.M.; GONÇALVES, J.L.M.; BOUILLET, J.P. Carbon allocations throughout the development of monospecific and mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in Brazil. **Tree Physiology**, Oxford, v. 32, p. 680-695, 2012.

PARROTTA, J.A.; BAKER, D.D.; FRIED, M. Changes in dinitrogen fixation in maturing stands of *Casuarina equisetifolia* and *Leucaena leucocephala*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, p. 1684–1691, 1996.

PATE, J.S. Photoassimilate portioning and consumption in nitrogen-fixing crop legumes. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A.A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relationships**. New York, USA: Marcel Dekker, 1996. p. 467-477.

PIOTTO, D. A meta-analysis comparing tree growth in monocultures and mixed plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 781–786, 2008.

POSTGATE, J. **Nitrogen Fixation**. 3rd Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 115p.

RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; PEIXOTO, R.S.; PINHEIRO, Y.A.S.; PICCOLO, M.C.; CHAER, G.M.; ROSADO, A.S. Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 66, p. 146-153, 2013.

RICHARDS, A.E.; FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; SCHERER-LORENZEN, M. The influence of mixed tree plantations on the nutrition of individual species: a review. **Tree Physiology**, Oxford, v. 30, p. 1192–1208, 2010.

ROSSI, L.M.B.; AZEVEDO, C.P.; SOUZA, C.R. *Acacia mangium*. Manuals: Embrapa Amazônia Ocidental, 2003. 29p.

SCHUBERT, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. **Annual Reviews of Plant Physiology**, California, v. 37, p. 539–574, 1986.

SUTHERLAND, J.M.; SPRENT, J.I. Nitrogen fixation by legumes trees, In: SUBBA RAO, N.S.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C. (Ed.). **Symbioses of nitrogen-fixing trees**. New York: International science publisher, 1993. 259p.

TRANG, K.M.; GIDDENS, J. Shading and temperature as environmental factors affecting growth, nodulation, and symbiotic N₂ fixation by soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 72, p. 305-308, 1980.

VITOUSEK, P.M.; CASSMAN, K.; CLEVELAND, C.; CREWS, T.; FIELD, C.B.; GRIMM, N.B.; HOWARTH, R.W.; MARINO, R.; MARTINELLI, L.; RASTETTER, E.B.; SPRENT, J.I. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 57/58, p. 1–45, 2002.

VOIGTLAENDER, M.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; PICCOLO, M.C.; MOREIRA, M.Z.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J.; BOUILLET, J-P. Introducing *Acacia mangium* trees in *Eucalyptus grandis* plantations: consequences for soil organic matter stocks and nitrogen mineralization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 352, p. 99–111, 2012.

WALSH, K.B. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 27, p. 637–655, 1995.

WAHUA, T.A.T.; MILLER, D.A. Effects of shading on the N₂-fixation, yield, and plant composition of field-grown soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 70, p. 387–392, 1978.

WATT, M.S.; CLINTON, P.W.; WHITEHEAD, D.; RICHARDSON, B.; MASON, E.G.; LECKIE, A.C. Above-ground biomass accumulation and nitrogen fixation of broom (*Cytisus scoparius* L.) growing with juvenile *Pinus radiata* on a dryland site. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.184, p. 93–104, 2003.

WURZBURGER, N.; MINIAT, C.F. Drought enhances symbiotic dinitrogen fixation and competitive ability of a temperate forest tree. **Oecologia**, London, v. 174, p. 1117–1126, 2014.

3 TRANSFERÊNCIA DE NITROGÊNIO EM CURTO PRAZO E ABAIXO DO SOLO A PARTIR DE *Acacia mangium* PARA *Eucalyptus grandis* EM UMA FLORESTA TROPICAL PLANTADA

Resumo

A transferência de nitrogênio em curto prazo e abaixo do solo a partir de árvores fixadoras de nitrogênio para árvores vizinhas não foi investigada em campo. Um estudo com aplicação de ^{15}N foi conduzido em uma plantação mista de *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis* no pico da área foliar do povoamento, aos 26 meses após o plantio. $^{15}\text{N-NO}_3$ foi injetado dentro do fuste de uma árvore dominante de *Acacia* em 3 blocos. Folhas jovens, raízes finas e rizosfera a partir das duas espécies foram amostradas durante 2 meses em várias distancias a partir da *Acacia* marcada, bem como a madeira, a casca, os galhos e folhas de toda a copa, aos 60 dias após a aplicação do ^{15}N . A maior parte das amostras de folhas, raízes finas e rizosfera de ambas as espécies foram enriquecidas com ^{15}N a partir dos 5 dias seguinte a aplicação do ^{15}N . Enquanto os valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram maiores a 0,75 m do que a 2,25 m nas raízes finas da *Acacia*, eles foram similares nas duas distancias nas raízes finas e rizosfera do *Eucalyptus*. Madeira e casca dos *Eucalyptus* amostrados até 6,2 m de distancia a partir da *Acacia* marcada estavam enriquecidas com ^{15}N . Esse estudo destacou em campo a existência de uma transferência de N em curto prazo e abaixo do solo a partir de árvores de *Acacia* para *Eucalyptus* vizinhos. Esse processo de facilitação poderia prover quantidades significativas de nitrogênio requeridas por árvores vizinhas das árvores fixadoras de N em florestas mistas.

Palavras-chave: ^{15}N ; Injeção via fuste; Facilitação por nitrogênio; Exsudados; Redes de micorrizas em comum; Árvores fixadoras de nitrogênio; *Acacia*; *Eucalyptus*

Abstract

The short-term belowground transfer of nitrogen from nitrogen-fixing trees to companion trees has never been investigated in the field. A ^{15}N pulse-labelling study was conducted in mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* at the peak of leaf area, 26 months after planting. $^{15}\text{N-NO}_3$ was injected into the stem of one big *Acacia* tree in three plots. Young leaves, fine roots and rhizosphere from the two species were sampled over 2 months at various distances from the labelled tree, as well as wood, bark, branches and total foliage, 60 days after labelling. Most of leaves, fine roots and rhizosphere samples of both species were ^{15}N enriched from 5 days after labelling onwards. While $\delta^{15}\text{N}$ values were higher at 0.75 m than at 2.25 m in *Acacia* roots, they were similar at the two distances in *Eucalyptus* roots and in the rhizospheres. Wood and bark of *Eucalyptus* trees sampled at 6.2 m from the labelled *Acacia* trees were enriched with ^{15}N . Our study highlighted a short-term belowground N transfer from *Acacia* to *Eucalyptus* trees in the field. This facilitation process may provides significant amounts of the nitrogen requirements of neighbors of N-fixing trees in mixed-species forests.

Keywords: ^{15}N ; Stem injection; Nitrogen facilitation; Exudates; Common mycorrhizal network; Nitrogen fixing trees; *Acacia*; *Eucalyptus*

3.1 Introdução

Recentes estudos mostraram que a associação de árvores fixadoras de nitrogênio (AFN) com espécies não fixadoras de nitrogênio (não-AFN) pode ser benéfico para a produção de biomassa (PIOTTO, 2008; FORRESTER, 2014), o sequestro de carbono no solo

(FORRESTER et al., 2013; BLASER et al., 2014), a fauna do solo e a diversidade de microrganismos do solo (BINI et al., 2013; MANHÃES et al., 2013; RACHID et al., 2013), e a disponibilidade de nutrientes no solo (VOIGTLAENDER et al., 2012; KOUTIKA et al., 2014; BLASER et al., 2014). Nos ecossistemas florestais tropicais, até 90% do nitrogênio (N) das AFN deriva da fixação simbiótica (PARROTTA et al., 1996; BINKLEY; GIARDINA, 1997). Esta entrada de N está relacionada ao aumento do status de N das não-AFN em florestas estabelecidas sobre áreas degradadas (NICHOLS; CARPENTER, 2006), sistemas agroflorestais (DAUNDIN; SIERRA, 2008) e plantações florestais mistas (BINKLEY et al., 2003; RICHARDS et al., 2010), e florestas tropicais (BATTERMAN et al., 2013).

É comumente assumido que a transferência de N a partir de AFN para não-AFN ocorre principalmente após a decomposição no solo da serapilheira e resíduos culturais derivados de AFN (MAFONGOYA et al., 1998; MUNROE e ISAAC, 2014). Entretanto, estudos mostraram que a transferência direta de N abaixo do solo, sem a transformação da fonte de N (MUNROE e ISAAC, 2014), pode também prover quantidades substanciais de N para não-AFN. Compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como o amônio, nitrato e aminoácidos (WACQUANT et al., 1989; PAYNEL et al., 2001, 2003), exsudados pelas leguminosas poderiam ser rapidamente absorvidos pelas plantas vizinhas (JALONEN et al., 2009; MUNROE et al., 2014) se a absorção ocorre antes da absorção e mineralização pelos microrganismos do solo (CLIQUET et al., 1997; LIPSON; JONES et al., 2004). A transferência direta de N pode também ocorrer por meio de redes de micorrizas em comum (CMN) (HE et al., 2004, 2009; KÄKHÖLÄ et al., 2012; FELLBAUM et al., 2014).

A transferência de N abaixo do solo e em curto prazo (i.e. em poucos dias ou semanas) tem sido observada a partir de AFN para gramíneas ou culturas agrícolas. A percentagem de N da gramínea *Dicanthium aristatum* derivado da transferência (%Ndft) a partir de mudas da AFN *Gliricidia sepium* com 6 semanas de idade, foi estimada em um estudo em casa de vegetação durante 8 semanas (JALONEN et al., 2009). Percentuais de 2,5-1,5% e 0,5-2% foram encontrados para a transferência de N a partir de exsudados radiculares e via CMN, respectivamente. %Ndft de *Triticum turgidum durum* crescendo em vasos com mudas de *Acacia Senegal* foi de até 14% após 21 dias de contato entre os sistemas radiculares das duas espécies (ISAAC et al., 2012). Já Catchpoole e Blair (1990), estimaram que 4 a 8% do N de *Leucaena leucocephala* foi transferido para a gramínea *Panicum maximum* em 6 e 12 semanas, respectivamente. Já durante 4 semanas de experimento em vasos, Rao e Giller (1993) encontraram taxas de 3-4% de transferência de N a partir de *Leucaena diversifolia* com 3 meses de idade para a gramínea *Cenchrus ciliaries*.

Embora a transferência de N abaixo do solo e em curto prazo a partir de AFN para gramíneas ou culturas agrícolas tenham sido bem documentada, em nosso entendimento (e.g. a partir da revisão de Chalk et al., 2014), não existem estudos em campo com a estimativa da transferência de N abaixo do solo em curto prazo entre árvores AFN e não-AFN. A significância desse processo de facilitação em florestas mistas é ainda questionado em virtude da escassez de dados experimentais (CHALK et al., 2014). Durante 1 mês de um experimento em vaso, a percentagem de N em mudas *Eucalyptus maculata* com 6 meses de idade derivado da transferência a partir de *Casuarina cunninghamia* via uma espécie de *Pisolithus* variou de 1 para 9% dependendo da taxa de nodulação da *C. cunninghamia* (HE et al., 2004). Esta percentagem variou entre 4 e 30% quando as mudas estavam com 12 meses de idade (HE et al., 2005). Estudos de campo sugeriram que essa transferência de N abaixo do solo poderia ocorrer a partir de *Inga edulis* para *Theobroma cacao* (NYGREN e LEBLANC, 2009; 2014) e a partir de *Acacia* sp. para *Eucalyptus* sp. (HOOGMOED et al., 2014), mas as quantidades e a velocidade dessa transferência de N não foram estimadas.

O objetivo do presente estudo foi saber se a transferência de N abaixo do solo e em curto prazo está ocorrendo entre AFN e não-AFN em uma plantação florestal mista com *Eucalyptus grandis* Hill ex Maid. e *Acacia mangium* Wild. Essas espécies de rápido crescimento são largamente plantadas nas regiões tropicais (FAO, 2010), e as plantações florestais mistas de *Eucalyptus* and *Acacia* podem ser uma alternativa para as monoculturas de *Eucalyptus* (FORRESTER et al., 2013). Uma resposta inicial dos *Eucalyptus* à adubação nitrogenada é comumente observada na região sudeste do Brasil (GONÇALVES et al., 2008). A associação com as *A. mangium* pode levar a facilitação através da fixação do N e a transferência do N para árvores de *Eucalyptus* (BOUILLET et al., 2013). Árvores de *Eucalyptus* são habilitadas para desenvolver rapidamente extensivo sistema radicular (O'GRADY et al., 2005; LACLAU et al., 2013) permitindo o acesso rápido aos nutrientes e água do solo em regiões distantes (BOUILLET et al., 2002; SUDMEYER; SIMONS, 2008). Esse experimento foi desenhado para acessar a possível transferência de N em curto prazo e abaixo do solo a partir da *Acacia* para *Eucalyptus* vizinhos até 6,2 m de distância de árvores de *Acacia* marcadas com ^{15}N via tronco. Em vários intervalos de tempo durante 60 dias, foram mensurados as taxas de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ em folhas recém expandidas, raízes finas e rizosfera (i.e. o solo aderido às raízes, HINSINGER et al., 2003) de ambas as espécies. No fim de 60 dias de experimento, as árvores amostradas foram cortadas e as análises de ^{15}N foram realizadas para os compartimentos acima do solo de ambas as espécies. Foi hipotetizado que (1) a transferência de N em curto prazo e abaixo do solo pode ocorrer entre *Acacia* e *Eucalyptus*, e

(2) a transferência de N poderia não ser restrita as árvores de *Eucalyptus* imediatamente vizinhas as árvores de *A. mangium*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Descrição do sítio

O estudo foi conduzido na estação experimental de Itatinga da Universidade de São Paulo (23°80'20"S e 48°83'80"W) com 863 m de altitude. Os solos foram classificados como Latossolos Vermelho-Amarelo Distrófico, de acordo com critérios de classificação da EMBRAPA (1999). Foi observada alta uniformidade textural até 1 m de profundidade com 13% de argila na camada A1 e entre 20 e 25% entre 1 e 6 m de profundidade. A camada de solo entre 0-10 cm exibiu $CTC < 2 \text{ cmolc kg}^{-1}$ de solo e concentração média de N de $0,6 \text{ g kg}^{-1}$ (VOIGTLAENDER et al. 2012). Durante o período de estudo, a temperatura média do ar foi 20,4 °C e a precipitação acumulada foi 209,9 mm. Rápidas mudanças no conteúdo de água e temperatura foram observados na camadas de 0-15 cm de solo (Figura 1).

3.2.2 Desenho experimental

O experimento foi conduzido em um teste de campo plantado em maio de 2003 comparando monoculturas e plantações mistas de *A. mangium* e *E. grandis*. Uma descrição detalhada de toda área experimental pode ser encontrada em Laclau et al. (2008). Somente os fustes foram cortados em maio de 2009 e os resíduos culturais foram uniformemente distribuídos dentro de cada parcela. Mudanças de *A. mangium* e *E. grandis* foram replantados em novembro de 2009 respeitando os mesmo tratamentos anteriores. Nutrientes (P, K, Ca, Mg e micronutrientes) foram não limitantes para o crescimento das árvores de *Eucalyptus*, exceto para o N que não foi aplicado. Foram aplicados em coveta lateral a 20 cm de distancia da muda 40, 9, 3, 6, 3 e 1 g planta⁻¹ de P, K, B, Fe, Zn e Mn, respectivamente. Uma fertilização complementar foi realizada com 115 kg de K ha⁻¹ aos 6 meses após o plantio. Nosso estudo foi conduzido em um dos tratamentos onde as duas espécies foram plantadas alternativamente a cada 1,5 m nas linhas de plantio com 3,0 m na entrelinha, correspondendo a uma densidade de 2222 árvores ha⁻¹.

Figura 1 - Precipitação, e variação da temperatura e do conteúdo de água no solo a 15 cm de profundidade durante 60 dias de estudo. A precipitação foi mensurada em uma área aberta a aproximadamente 100 m de distancia do experimento. A temperatura e o conteúdo de água no solo foram monitorados no primeiro bloco do experimento no tratamento onde a *Acacia mangium* e o *Eucalyptus grandis* foram plantados alternadamente a cada 3 m na linha de plantio, com 3 m de distancia entre as linha. O conteúdo de água no solo foi mensurado a cada 30 minutos com 3 sondas CS616, e a temperatura do solo com 4 termopares de cobre-constantan, e os valores foram mostrados como médias diárias. A 5 dias após a marcação da *Acacia*, a precipitação ocorreu após a coleta das amostras. Os triângulos invertidos indicam as datas de amostragem

3.2.3 Aplicação do ^{15}N nas árvores de *Acacia*

Em cada um de três blocos, foi injetada uma solução enriquecida com ^{15}N no fuste de uma árvore de acácia no dia 5 de março de 2012. Acácias apresentaram somente um fuste e estavam entre as 10% maiores árvores da espécie no tratamento (altura média= 7,4 m, diâmetro a 1,3 m= 8,4 cm). Foi perfurado o fuste de cada acácia com uma broca (diâmetro= 6 mm; comprimento= 20 mm) na altura de 1 m acima do solo. Água destilada foi aplicada durante a perfuração para prevenir danos aos vasos do xilema. Imediatamente após a remoção da broca foi inserido um tubo de polietileno (diâmetro= 6 mm) conectado a uma garrafa com 100 ml de água destilada (Figura 2). Em seguida, a garrafa foi conectada a uma segunda garrafa contendo 0,9 g de N como nitrato de potássio (98 atom% $^{15}\text{N}\text{-NO}_3$) diluído em 400 ml água destilada. Os 500 ml de solução foi absorvido entre 12 e 36 horas dependendo das acácias. O uso das duas garrafas preveniu o risco de contaminação da serapilheira e do solo pelo ^{15}N no momento de inserir o tubo no fuste das acácias. A contaminação com ^{15}N foi

também prevenida com uso de massa mineral não tóxica (Terostat ®) sobre a casca ao redor do tubo para evitar a saída da solução, e cobertura do solo com uma lona plástica ao redor da acácia marcada. A perda da solução foi checada pela manutenção de papel toalha logo abaixo do ponto de inserção do tubo no fuste da acácia. O orifício foi fechado com Terostat após a completa absorção da solução. Poucas folhas senescentes de acácia foram depositadas durante o experimento e foram removidas da área experimental com no máximo 24 h após serem depositadas.

Figura 2 - Marcação com ^{15}N via o fuste da *Acacia mangium* (bloco 1) aos 26 meses de idade. A garrafa abaixo continha 100 ml de água destilada antes dela ser conectada com a segunda garrafa acima contendo 0,9 g of N (99 atom% NO_3^- - ^{15}N) diluído em 400 ml de água destilada

3.2.4 Amostragens

Em cada bloco foram usados andaimes para coletar as folhas recém-expandidas (denominadas folhas jovens) a partir do terço superior das copas da acácia marcada com ^{15}N e 3 pares de eucaliptos (6 eucaliptos por bloco) distanciados a 1,5, 3,3 e 6,2 m da acácia marcada (Figura 3). As médias das alturas e diâmetros a 1,3 m dos eucaliptos amostrados a 1,5, 3,3 e 6,2 m foram 12,6 m e 10,3 cm, 12,6 m e 10,5 cm, e 12,4 m e 9,4 cm, respectivamente. Aos 5, 11, 17, 24, 29, 45 e 60 dias após a marcação com ^{15}N , foram amostrados três folhas por acácia e cinco por eucalipto, coletados em diferentes direções geográficas. Nas mesmas datas foram coletados com um tubo de PVC (diâmetro= 5 cm; comprimento= 10 cm) em cada bloco três amostras de solo a 0,75 m e 2,25 m ao redor da

acácia marcada (Figura 3). Essas amostras foram misturadas para cada distancia e data. Aos 60 dias após a marcação com ^{15}N foram amostrados e misturados quatro amostras suplementares de solo, coletadas entre 3,8 e 5,3 m a partir da acácia marcada (Figura 3). As amostras de solo foram transportadas para o laboratório para separar as raízes finas (diâmetro < 3 mm) que apresentaram claras diferenças entre as espécies. Raízes finas de *E. grandis* tem alto proporção de ramificação e são mais escuras do que as raízes fina das *A. mangium* (SILVA et al., 2009; LACLAU et al., 2013). A rizosfera foi coletadas em seguida nas mesmas raízes amostradas, usando luvas de látex. O valores do $\delta^{15}\text{N}$ das folhas jovens, raízes finas e rizosfera de ambas as espécies foram obtidos aplicando o mesmo protocolo antes da marcação, exceto para as folhas jovens de eucalipto que foram misturados por distancia (3 eucaliptos foram amostrados por bloco).

Figura 3 – Lay out da parcela experimental e amostragens. Folhas recém-expandidas no terço superior da copa, raízes finas e rizosfera da *Acacia mangium* e do *Eucalyptus grandis* foram amostrados em várias datas após a marcação da *Acacia* com ^{15}N . Dentro de 6,2 m de raio a partir da *Acacia* marcada, 2, 4 e 10 *Eucalyptus* foram localizados a 1,5 m, 3,3 m e 4,5 m e 6,2 m, respectivamente. A área entre 0 e 1,5 m a partir da *Acacia* marcada com ^{15}N , 1,5 m e 3 m e 3 m e 6,2 m tinham 7,1 m², 21,2 m² e 96,4 m², respectivamente.

No final do experimento, as acácias marcadas e um dos eucaliptos em cada par foram cortados em cada um dos blocos (3 acácias e 9 eucaliptos no total). As concentrações de N (%) e os valores de ^{15}N das folhas, galhos vivos, madeira e casca foram estimados para cada espécie. Uma descrição detalhada da metodologia pode ser encontrada em Bouillet et al.

(2008). Os valores de ^{15}N dos compartimentos das duas espécies (Tabela 1) foram obtidos sobre uma acácia e um eucalipto por bloco, com o mínimo 20 m de distancia da acácia marcada.

3.2.5 Preparo das amostras e análises isotópicas

Raízes finas foram lavadas em água corrente. Todos os materiais de planta foram secos em estufa a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ até peso constante e, casca, madeira e galhos foram moídos em moinho Willy (0,8 mm de malha) e, folhas, raízes finas e rizosfera foram moídas em almofariz de porcelana. Os valores de ^{15}N (atom%) e as concentrações (%) de N foram determinados com um espectrômetro de massas (modelo Hydra 20-20) acoplado a um analisador elementar automático (ANCA-GSL, SERCON Co., Crewe, UK) usando 10 mg de material de planta seco e 15 mg de solo (BARRIE; PROSSER, 1996). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de uma dada amostra foram expressos como a eq. 1. A precisão das análises isotópicas foi 0,001 atom% de ^{15}N .

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{amostra}}(\text{‰}) = \left(\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{amostra}} - (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar}}} \right) \times 1000 \quad (1)$$

3.2.6 Cálculos da transferência de N

A transferência de N foi calculada por meio de balanço de massas e pelo %Nd_{fa}.

Balanço de massas

A proporção do ^{15}N injetado no fuste da *Acacia* (i.e. 0,882 g de ^{15}N) que foi transferido para as folhas, galhos, madeira e casca dos das árvores de *Eucalyptus* amostrados no final do período de estudo foi estimado conforme eq. 2.

$$P_{\text{compartimento}} (\%) = (N_{\text{conteúdo}} * (^{15}\text{N atom\%}_{60 \text{ dias}} - ^{15}\text{N atom\%}_{0 \text{ dias}}) / 0,882) * 100 \quad (2)$$

Onde, para um dado compartimento de uma árvore de *Eucalyptus*, $N_{\text{conteúdo}}$ refere-se ao conteúdo de N aos 60 dias após a marcação da *Acacia*, $^{15}\text{N atom\%}_{60 \text{ dias}}$ refere-se aos valores de $^{15}\text{N atom\%}$ aos 60 dias após a marcação da *Acacia*, e $^{15}\text{N atom\%}_{0 \text{ dias}}$ refere-se aos valores de $^{15}\text{N atom\%}$ antes da marcação da *Acacia*.

A proporção de ^{15}N injetado na *Acacia* que foi transferido para os compartimentos acima do solo de um dado *Eucalyptus* foi estimada pela eq. 3.

$$P_{\text{parte aérea}} (\%) = P_{\text{folhagem}} (\%) + P_{\text{galhos}} (\%) + P_{\text{madeira}} (\%) + P_{\text{casca}} (\%) \quad (3)$$

A proporção de ^{15}N transferido para as folhas, galhos, madeira e casca das árvores de *Eucalyptus* dentro de 6,2 m de raio a partir da *Acacia* marcada foi calculado considerando que 2, 4 e 10 eucaliptos foram localizados a 1,5 m, 3,3 m e 4,5-6,2 m, respectivamente (Figura 3), conforme eq. 4.

$$P_{\text{parte aérea}_{(0-6,2 \text{ m})}} (\%) = 2 P_{\text{parte aérea}_{1,5 \text{ m}}} (\%) + 4 P_{\text{parte aérea}_{3,3 \text{ m}}} (\%) + 10 P_{\text{parte aérea}_{6,2 \text{ m}}} (\%) \quad (4)$$

Onde, $P_{\text{parte aérea}_{1,5 \text{ m}}} (\%)$, $P_{\text{parte aérea}_{3,3 \text{ m}}} (\%)$, $P_{\text{parte aérea}_{6,2 \text{ m}}} (\%)$ foram os valores de $P_{\text{parte aérea}} (\%)$ para as árvores de *Eucalyptus* amostradas a 1,5 m, 3,3 m e 6,2 m a partir da árvore de *Acacia* marcada, respectivamente.

A proporção de ^{15}N injetado na *Acacia* que foi transferido para as raízes finas do *Eucalyptus* dentro de 6,2 m de raio a partir da árvore de *Acacia* marcada foi calculada conforme eq. 5.

$$P_{\text{raízes}_{(0-6,2 \text{ m})}} (\%) = 7,1 P_{\text{raízes}_{0,75 \text{ m}}} (\%) + 21,2 P_{\text{raízes}_{2,25 \text{ m}}} (\%) + 96,4 P_{\text{raízes}_{3,8-5,3 \text{ m}}} (\%) \quad (5)$$

Com adistância “i” a partir da árvore de *Acacia* marcada calculada como:

$$P_{\text{raízes}_i} (\%) = (\text{FR}_{\text{N conteúdo}} * (^{15}\text{N atom\%}_{60 \text{ days}} - ^{15}\text{N atom\%}_{0 \text{ day}}) / 0,882) * 100 \quad (6)$$

Onde, $\text{FR}_{\text{N conteúdo}}$ foi o conteúdo de N por m^2 dentro das raízes finas do *Eucalyptus* na distancia “i” a partir da árvore de *Acacia* marcada em cada parcela. Esses valores foram estimados pela multiplicação das concentrações médias de N, mensurados nas raízes finas do *Eucalyptus* que foram coletados aos 60 dias após a marcação, pela densidade de biomassa de raízes finas de $178,5 \text{ g m}^{-2}$ estimados por Laclau et al. (2013) para 2 m de profundidade de solo nas mesmas parcelas e sítio com a mesma proporção de árvores de *Eucalyptus* e *Acacia*. Foi considerado uma área de $7,1 \text{ m}^2$ entre 0 e 1,5 m, $21,2 \text{ m}^2$ entre 1,5 m e 3 m, e $96,4 \text{ m}^2$ entre 3 m e 6,2 m para as amostras de raízes finas de eucalipto coletados a 0,75 m, 2,25 m, e 3,8-5,3 m, respectivamente (Figura 3). $^{15}\text{N atom\%}_{60 \text{ days}}$ refere-se ao $^{15}\text{N atom\%}$ das raízes finas coletadas aos 60 dias após a marcação da *Acacia*, e $^{15}\text{N atom\%}_{0 \text{ dias}}$ refere-se ao $^{15}\text{N atom\%}$ da raízes finas coletada antes da aplicação do ^{15}N na *Acacia*.

A proporção do ^{15}N injetado que foi transferido para os *Eucalyptus* dentro de um raio de 6,2 m a partir da *Acacia* marcada foi estimada conforme eq. 7:

$$P_{\text{eucalipto}_{(0-6,2 \text{ m})}} (\%) = P_{\text{parte aérea}_{(0-6,2 \text{ m})}} (\%) + P_{\text{raízes}_{(0-6,2 \text{ m})}} (\%) \quad (7)$$

A equação 2 poderia ser rigorosamente válida somente quando é considerado nenhuma variação no conteúdo de N dos *Eucalyptus* entre o momento de aplicação do ^{15}N na *Acacia* e o corte das árvores de *Eucalyptus*. Ao contrário, P% poderia ser subestimado. Nesse estudo,

foi assumido que a variação no conteúdo de N nas árvores de *Eucalyptus* durante o período de 60 dias não mudou na mesma ordem de magnitude do P%.

N derivado a partir da transferência

A proporção de N do *Eucalyptus* derivado a partir da transferência (%Nd_{fa}) a partir da *Acacia* foi estimada para cada período de amostragem durante 60 dias usando a eq. 8 (JALONEN et al. 2009):

$$\%Nd_{ft}(t) = \left(\frac{\delta^{15}N_{Euc}(0) - \delta^{15}N_{Euc}(t)}{\delta^{15}N_{Euc}(0) - \delta^{15}N_{Ac}(t)} \right) \times 100 \quad (8)$$

Onde:

- $\delta^{15}N_{Euc}$ se referiu ao valor de $\delta^{15}N$ nas raízes finas do *Eucalyptus* amostradas a 0,75 m ou 2,25 m a partir da *Acacia* marcada com ^{15}N
- $\delta^{15}N_{Ac}$ se referiu ao valor de $\delta^{15}N$ nas raízes finas da *Acacia* amostradas a 0,75 m ou 2,25 m a partir da *Acacia* marcada com ^{15}N
- $\delta^{15}N_{Euc}(0)$ e $\delta^{15}N_{Euc}(t)$ correspondeu aos valores de $\delta^{15}N$ das raízes finas de *Eucalyptus* antes da aplicação do ^{15}N na *Acacia* e em cada data de coleta após a aplicação do ^{15}N , respectivamente.
- $\delta^{15}N_{Ac}(t)$ correspondeu aos valores de $\delta^{15}N$ das raízes finas da *Acacia* em cada data de coleta após a aplicação do ^{15}N

Os valores médios de %Nd_{fa} foram calculados para cada data de amostragem (duas distâncias x três blocos). Os valores médios de %Nd_{fa} durante 60 dias de estudo foram calculados como a média de %Nd_{fa} entre as datas de amostragem (n=7).

3.2.7 Análises estatísticas

Para cada data de coleta, espécie e distância (0,75 m e 2,25 m, e 3,8-5,3 m aos 60 dias), o enriquecimento em ^{15}N nas plantas e na rizosfera foi testado contra os valores de ^{15}N antes da marcação usando teste T unilateral (análise 1). Para cada espécie e data de coleta, uma análise de variância com fator duplo foi usada para testar as diferenças devido as distâncias (0,75 m e 2,25 m, e 3,8-5,3 m aos 60 dias) e blocos sobre os valores de $\delta^{15}N$ dos compartimentos das plantas e da rizosfera (análise 2). Um modelo linear misto (análise 3) foi usado para testar sobre os valores de $\delta^{15}N$ das raízes finas das *Acacias* e a rizosfera, e para raízes finas dos *Eucalyptus*, rizosfera e folhas jovens, os efeitos da distância (0,75 m e 2,25 m) e dos blocos como efeitos fixos e datas de coleta como efeitos aleatórios. O melhor

modelo usando AIC - “Akaike information criterion” foi selecionado. Adicionalmente, para cada data de coleta, o aumento na concentração de N nas folhas jovens das acácias marcadas e nas raízes finas das acácias após a aplicação do ^{15}N foi testado contra as concentrações iniciais de N usando teste T pareado unilateral (análise 4). A procedimento GLM do SAS 9.3 foi usado (SAS Institute, Cary, NC, USA) para os modelos de efeito fixos. O pacote estatístico ASReml (GILMOUR et al., 2005) foi usado para o modelo linear misto. Homogeneidade das variâncias foram testadas pelo teste de Levene, e a normalidade da distribuição dos erros foi testado com o teste de Shapiro-Wilks. Os valores foram transformados em log quando as variâncias foram não homogêneas. O teste de Bonferroni foi usado para comparações dos modelos de efeito fixo. O teste de Wald foi usado para os modelos de efeito misto (KENWARD; ROGER, 1997). O nível de significância usado foi 0,05.

3.3 Resultados

3.3.1 $\delta^{15}\text{N}$ nas árvores de *Acacia*

Foi observado um aumento rápido e significativo (análise 1) do $\delta^{15}\text{N}$ das folhas jovens da acácia marcada ($p < 0.001$) com valores médios $> 650 \text{ ‰}$ a partir de 5 dias após a marcação via fuste (Figura 4). Uma marcada variabilidade do $\delta^{15}\text{N}$ das folhas jovens foi encontrada entre acácias e entre datas após 11 dias. Raízes finas de *Acacia* exibiram sempre maiores valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ do que a abundância natural a 0,75 e 2,25 m da acácia marcada (Figura 5a) com significantes diferenças (análise 1) aos cinco dias ($p \leq 0.039$) e duas datas de coleta ($p \leq 0.045$) a 0.75 m e 2.25 m, respectivamente. Raízes finas de *Acacia* tiveram globalmente maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ (análise 3) a 0,75 m do que a 2,25 m a partir da acácia marcada ($p < 0.001$), com significantes diferenças entre a duas distancias (análise 2), a 11 ($p = 0.022$), 24 ($p = 0.002$), e 45 dias ($p = 0.023$) (Figura 5a). Aos 60 dias, raízes finas de *Acacia* exibiram menores valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ do que a abundância natural a 3,8 e 5,3 m (Figura 5a). No fim do experimento, todos os compartimentos da *Acacia* foram altamente enriquecidos (ver tabela 3.1 no Anexo B).

3.3.2 $\delta^{15}\text{N}$ na rizosfera

Após a marcação da *Acacia*, a rizosfera de ambas as espécies exibiram valores de $\delta^{15}\text{N}$ sempre maiores do que a abundância natural independente da distancia da acácia marcada, com diferenças significantes (análise 1) em 10 e 11 casos sobre 14, para *Acacia* ($p \leq 0.047$) e *Eucalyptus* ($p \leq 0.048$), respectivamente (Figuras 5c e 5d). O enriquecimento com ^{15}N

da rizosfera não mudou significativamente entre as distancias, independente da distancia ou das datas de coleta (análises 2 e 3). O curso dos valores $\delta^{15}\text{N}$ da rizosfera foi comparável entre as duas espécies, e mostraram um rápido aumento inicial e eles foram marcados pela diminuição a partir de 5 para 24 dias. Durante o período de estudo, a rizosfera do *Eucalyptus* exibiu valores de ^{15}N um pouco menores do que na da *Acacia* com valores médios de 20,4‰ e 26,8‰, respectivamente.

Figura 4 - Mudanças nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas recém-expandidas da *Acacia mangium* após a marcação com ^{15}N . Valores do background são indicados na data de marcação (dia 0). Barras verticais indicam o erro padrão entre os blocos (n=3). A uma dada data de coleta, * indica diferenças significativas em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ do background (P<0,05)

3.3.3 $\delta^{15}\text{N}$ nas árvores de *Eucalyptus*

Raízes finas de *Eucalyptus* foram significativamente enriquecidas com ^{15}N (análise 1) a 0,75 m e 2,25 m desde os 5 dias ($p \leq 0,033$) (Figura 5b). Aos 60 dias, raízes finas de *Eucalyptus* foram significativamente enriquecidas com ^{15}N a 3,8 e 5,3 m ($p < 0,001$). Durante o período de estudo, as mudanças nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas raízes finas de *Eucalyptus* foram não significativamente diferentes entre 0,75 w 2,25 m (análises 2 e 3). Aos 60 dias, as raízes finas de *Eucalyptus* exibiram valores de $\delta^{15}\text{N}$, não significativamente diferentes, de 50‰, 55‰ and 33‰ a 0,75m, 2,25m e 3,8-5,3m, respectivamente.

Folhas jovens de *Eucalyptus* exibiram em 18 casos sobre 21, valores de $\delta^{15}\text{N}$ maiores do que antes da marcação (Figura 6). Diferenças significativas (análise 1) foram observadas

aos 5 dias para *Eucalyptus* a 1,5 m ($p=0.019$), e aos 45 e 60 dias para ambos *Eucalyptus* a 3,3 m ($p\leq 0,005$) e 6,2m ($p\leq 0,046$). Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas jovens de *Eucalyptus* não diferiram significativamente entre distancias (análises 2 e 3). Entretanto, os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ foram 2,95‰, 2,55‰ and 2,39‰, aos 1,5 m, 3,3 m e 6,2 m, respectivamente. Consistentemente, os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas jovens de *Eucalyptus* diminuíram a partir de 1,5 m para 6,2 m em quatro sobre 7 datas de coleta.

Figura 5 - Mudanças durante o período de 60 dias nos valores $\delta^{15}\text{N}$ em raízes finas (a,b) e rizosfera (c,d) da *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis* coletados a 0,75 m e 2,25 m a partir da *A. mangium* marcada com ^{15}N . Valores do background são indicados na data de marcação (dia 0). Barras verticais indicam o erro padrão entre os blocos ($n=3$). A uma dada data de coleta, * indica diferenças significativas em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ do background ($P<0.05$). Aos 24 dias, diferenças significantes nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ na rizosfera da *A. mangium* foram encontradas somente a 2,25 m (Figura 5d). A uma dada data de coleta, letras diferentes indicam diferenças significantes entre distancias ($P<0,05$)

Aos 60 dias após a aplicação do ^{15}N na *Acacia*, a madeira ($p\leq 0.041$) e a casca ($p\leq 0.041$) dos *Eucalyptus* foram significativamente enriquecidos com ^{15}N (análise 1) sem diferenças significantes (análise 2) nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre as distancias (Tabela 1). Galhos

e as folhas de toda a copa (total-folhas) dos *Eucalyptus* foram não significativamente enriquecidos com ^{15}N . Entretanto, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das folhas foi significativamente maior (análise 2) a 1,5 m do que a 3,3 m e 6,2 m ($p=0,012$).

Figura 6 - Mudanças durante 60 dias de experimento nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas recém-expandidas de pares *E. grandis* localizados a 1,5 m, 3,3 m e 6,2 m a partir da *A. mangium* marcada com ^{15}N . Valores do background são indicados na data de marcação (dia 0). Barras verticais indicam o erro padrão entre os blocos ($n=3$). A uma dada data de coleta, * indica diferenças significativas em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ do background ($P<0,05$)

3.3.4 Transferência de nitrogênio

O percentual de ^{15}N injetado em um árvore de *Acacia* que foi transferido em dois meses para árvores de *Eucalyptus* localizadas dentro de um raio de 6,2 m a partir da *Acacia* marcada foi estimado em $3,33 \pm 1,24\%$ (2,25%, 0,85%, 0,16%, 0,04% e 0,03% para raízes finas, madeira, casca, folhagem e galhos, respectivamente).

O %Ndfa variou dependendo das datas com menores e maiores valores de 15,8% e 78,2%, respectivamente (Figura 7). Durante os 60 dias de experimento, o valor médio de %Ndfa foi 43,2%.

Figura 7 – Proporção de N derivado da transferência (%) nas raízes finas de *E. grandis* calculados com $\delta^{15}\text{N}$ (‰) das raízes finas da *A. mangium*, como uma função dos dias após a marcação com ^{15}N na *Acacia*. Barras verticais indicam o erro padrão entre distâncias (0,75 m e 2,25 m a partir da *Acacia* marcada) e blocos (n=6)

3.4 Discussão

3.4.1 Uma metodologia adequada para a marcação com ^{15}N de árvores doadoras

O objetivo da marcação com ^{15}N é para seguir o destino do ^{15}N sem modificar o status de N das espécies alvo (HE et al., 2006). Aqui, injetou-se 0,9g $^{15}\text{N-NO}_3^-$ dentro do fuste de árvores dominantes de *Acacia*, o qual representa 0,85%, 0,74% e 0,94% do N total da copa (estimado a partir de amostragens destrutivas de folhas e galhos, 2 meses após a marcação: ver Tabela 3.2 no em Anexo B). Esses percentuais foram perto da concentração de 1% de N na copa, proposto por Swanston e Myrold (1998). A baixa quantidade de N injetado não aumentou significativamente a concentração de N das folhas e raízes finas das árvores de *Acacia* marcadas, ao longo do período de estudo (ver Tabela 3.3 no em Anexo B). No entanto, os altos valores de ^{15}N na rizosfera aos 5 dias após a rotulagem, poderiam resultar de um aumento inicial de N via exsudatos radiculares, consistentes com sutil enriquecimento do solo após aplicação foliar do ^{15}N em plantas de *Medicago sativa* e *Trifolium subterraneum* (GARDENER et al., 2012). O aumento na exsudação de N devido a injúrias feitas em árvores também não poderia ser descartado (HALE e MORE, 1979). Nesse experimento, as trocas de nitrato enriquecido em ^{15}N entre seivas do xilema e do floema também poderiam ocorrer após

a injeção do ^{15}N no fuste (PATE et al, 1998; PEUKE et al, 2013), o que explicaria o rápido aumento do ^{15}N na rizosfera.

O método de injeção via fuste permitiu a marcação rápida das folhas de *Acacia*. A mesma técnica foi aplicada para marcar árvores de *Picea sitchensis* com 20 anos de idade (NAIR et al., 2014). Os valores médios de ^{15}N dentro de acículas foi 4850 ‰, 4,5 meses após a injeção. Em nosso experimento, observou-se um alto enriquecimento com ^{15}N nas folhas jovens da *Acacia*, desde 5 dias após a marcação (Figura 4), que sugere um rápido transporte de $^{15}\text{N-NO}_3^-$ do ponto de injeção para a folhagem por fluxo de massa (MILLARD et al, 2006; AUGUSTO et al., 2011). No entanto, o aumento da ^{15}N dentro das folhas de *Acacia* até 17 dias após a marcação sugere que outros processos foram envolvidos na acumulação de ^{15}N nas folhas. Uma redução do nitrato injetado no fuste (BLACK et al., 2002; MILLER; CRAMER, 2005), conduzindo à produção de aminoácidos enriquecido com ^{15}N (PFAUTSCH et al., 2009), e transportado pela seiva do xilema para as folhas poderia explicar porque as concentrações de ^{15}N continuaram a aumentar depois que o rápido fluxo de massa do $^{15}\text{N-NO}_3^-$ inicialmente injetado. O número limitado de folhas amostradas e um efeito de diluição, dependendo do tamanho das árvores de *Acacia* (SWANSTON; MYROLD, 1998) pode explicar a variabilidade elevada do ^{15}N nas folhas jovens da *Acacia* entre os blocos.

3.4.2 Evidência da transferência em curto prazo e abaixo do solo

Os resultados indicam que o N transferido abaixo do solo para árvores de *Eucalyptus* foi detectado nas raízes finas e em folhas jovens desde os 5 dias após a injeção do ^{15}N no fuste de árvores de *Acacia* (hipótese 1). A ausência de precipitação entre o dia da injeção do ^{15}N e a amostragem de raízes finas e folhas jovens aos 5 dias após a injeção, mostra que este padrão não pode ser explicado por uma absorção de compostos ricos em ^{15}N dissolvidos na água que escorre pelo fuste (stemflow) ou pela precipitação interna (throughfall) (Apêndice C) nas árvores de *Acacia*. Pequenas quantidades de ^{15}N foram encontradas nas soluções do stemflow e do throughfall a partir da *Acacia* nessa experiência (dados não mostrados), e sugere que estas rotas contribuem pouco para a transferência de N em curto prazo a partir de *Acacia* para árvores de *Eucalyptus*. Também não foram encontradas evidências de transferência de ^{15}N na forma de amônia a partir das folhas da *Acacia* (Apêndice D).

Rotas diretas e indiretas podem explicar a transferência N observada em curto prazo e abaixo do solo entre árvores de *A. mangium* e *E. grandis* (JALONEN et al., 2009; MUNROE et al., 2014). Transferência direta de N pode ocorrer quando as plantas estão diretamente conectados através de redes de micorrízicos em comum (CMN) (por exemplo, em INGLEBY

et al., 2007). Esta transferência foi observada em casa de vegetação entre AFN e não-AFN (HE et al., 2004, 2005), e em campo entre *Pinus sabiniana* e *Quercus douglasii* (HE et al., 2006), e a partir de árvores para mudas de *Pseudotsuga menziessi* (TESTE et al., 2009). No presente experimento, a transferência de N entre *Acacia* e *Eucalyptus* via CMN pode-se esperar uma vez que tanto as raízes de *A. mangium* quanto as de *E. grandis* podem ser colonizadas por ectomicorrizas, tais como *Pisolithus* sp. e *Escleroderma* sp. (FOUNOUNE et al., 2002; DUPONNOIS; PLENCHETTE, 2003; DUCOUSSO et al., 2012). As raízes de *Acacia* e *Eucalyptus* no presente experimento foram colonizadas por micorrizas arbusculares (AM) na camada de 0-10 cm (BINI, 2012), mas, principalmente, por ectomicorrizas (EM) entre 0-800 cm de profundidade de solo (PEREIRA, 2014).

Exsudação de compostos nitrogenados poderia ser uma importante via indireta para a transferência de N a partir da *Acacia* para o *Eucalyptus*. Exsudados contendo N, principalmente, como amônio, aminoácidos e ureídeos, pode atingir até 70% do N total de leguminosas anuais, e rapidamente essa fonte de N pode ser incorporada pelas plantas vizinhas (WICHERN et al., 2008; FUSTEC et al., 2010). Em nosso experimento, a captura pelo *Eucalyptus* do N exsudado pela *Acacia* poderia ser esperada. Um enriquecimento significativo com ^{15}N na rizosfera das duas espécies foi observada na nossa experiência, desde 5 dias após a aplicação. Valores de ^{15}N foram da mesma magnitude entre as rizosferas da *Acacia* e do *Eucalyptus* (Figuras 5c, 5d), apesar do enriquecimento com ^{15}N ser muito maior nas raízes finas de *Acacia* em relação as raízes finas do *Eucalyptus* (Figuras 5a, 5b). Esse padrão pode estar relacionado com o profundo entrelaçamento das raízes das duas espécies, como observado durante a separação delas no laboratório, e pode assim promover as rápidas trocas de N entre as rizosferas.

Entradas de N no solo derivado da exsudação diminuem drasticamente nos primeiros milímetros a partir das raízes finas de plantas (MERBACH et al., 1999; SCHENCK zu SCHWEINSBERG-MICKAN et al., 2010). A capacidade das raízes finas do *Eucalyptus* de absorver rapidamente grandes quantidades de N liberados nas proximidades das raízes finas da *Acacia* poderia, portanto, contribuir para explicar o entrelaçamento denso de raízes das duas espécies na camada superior do solo. Os valores similares de ^{15}N na rizosfera a 0,75 m e 2,25 m a partir das árvores de *Acacia* marcadas, apesar de um maior enriquecimento com ^{15}N nas raízes finas da *Acacia* a 0,75 m do que a 2,25 m, poderia refletir na elevada absorção de N pelas raízes de *Eucalyptus*, durante os primeiros anos após o plantio (LACLAU et al., 2010). Séries temporais da química da solução do solo mostraram claramente uma absorção muito rápida de nutrientes pelas raízes finas de *Eucalyptus* nas camadas superiores de solo

(LACLAU et al, 2004, 2010; MARESCHAL et al, 2013), o qual poderia evitar o acúmulo de ^{15}N na rizosfera. O enriquecimento com ^{15}N similar da rizosfera nas duas distâncias a partir das árvores de *Acacia* marcadas em períodos de pouca chuva e baixa umidade do solo (por exemplo, 24-29 dias), bem como em períodos de elevada pluviosidade e alta umidade do solo (por exemplo, 11-17 dias), sugerem que as quantidades de N liberados pelas raízes da *Acacia* lixiviados abaixo da camada de 0-10 cm foram baixas em relação à absorção pelas árvores vizinhas.

Foi estimado com uma abordagem de balanço de massa que aproximadamente 3% da quantidade de ^{15}N injetado no fuste de cada árvore de *Acacia* marcada foi transferido em 2 meses para as árvores de *Eucalyptus* vizinhos dentro de um raio de 6,2 m. Essa maneira de cálculo provavelmente subestimou a quantidade de ^{15}N transferido porque existe uma transferência de ^{15}N para raízes finas abaixo de 2 m de profundidade, raízes de tamanho médio, raízes grossas, e tocos, os quais não foram levados em conta. No entanto, esta transferência de ^{15}N rapidamente detectável aqui, poderia ser consistente com uma transferência de N significativa em curto prazo e abaixo do solo para árvores de *Eucalyptus*. Esse processo de facilitação poderia ser ilustrado pelos valores médios de %Nd_{fa} de 43% para o período de estudo. Entretanto, essa estimativa foi provavelmente superestimada com valores médios de %Nd_{fa} de 78% aos 24 dias, e algumas estimativas individuais de 100%. Grandes incertezas sobre a fonte de ^{15}N (atom%) do N da *Acacia* transferido para os *Eucalyptus* (por meio das raízes, exsudados, hifas de micorrizas, entre outros) impediu que estimativas confiáveis do %Nd_{fa} fossem feitas nesse estudo. Valores de %Nd_{ft} em experimentos em casa de vegetação geralmente variam entre 1 e 15% (CHALK et al 2014). No entanto, até 32% do N derivado da transferência foi relatada em mudas de *E. maculata* associados com *Casuarina cunninghamia* em experimento com vasos (He et al., 2005). O presente estudo foi conduzido com árvores de 2 anos de idade, que podem apresentar diferenças marcantes em relação da mudas jovens, como observado para *E. maculata* associado com *C. cunninghamia*, os qual exibiu valores de %Nd_{ft} duas vezes mais alta quando estavam com 12 meses do que aos 6 meses de idade (HE et al., 2004, 2005).

3.4.3 Transferência de N em curto prazo a longas distancias a partir das árvores de *Acacia*

As fontes de N transferido em curto prazo e abaixo do solo, a partir de *Acacia* para *Eucalyptus* estavam localizadas a uma curta distância do fuste das árvores de *Acacia* marcadas. Raízes finas da *Acacia* estavam enriquecidas com ^{15}N tanto a 0,75 m quanto a 2,25

m, com valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ de 178 ‰ e 41 ‰, respectivamente. Em contrapartida, raízes finas da *Acacia* apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ próximos a 4 ‰ a 3,8-5,3 m de distancia, aos 60 dias após a marcação (Figura 4a); mostrando que o desenvolvimento horizontal das raízes finas da *Acacia* provavelmente foi restrito aos primeiros metros do fuste da *Acacia*.

Foi observado o enriquecimento com ^{15}N em alguns compartimentos das árvores de *Eucalyptus* mesmo a 6,2 m de distancia das árvores de *Acacia* marcadas (Tabela 1 e Figura 6), o qual mostra que a transferência de N em curto prazo não se restringiu às árvores de *Eucalyptus* localizadas ao redor das árvores de *Acacia* marcadas (hipótese 2). A capacidade das árvores de *Eucalyptus* com 2 anos de idade de capturar o N liberado pelas raízes da *Acacia* a uma distância de 5-6 m seria consistente com o rápido crescimento das raízes do *E. grandis* mostrado por Christina et al. (2011). Transferência rápida de N dentro das raízes finas do *Eucalyptus* foi ilustrado por valores de $\delta^{15}\text{N}$ a 3,8-5,3 m muito próximos aos encontrados a 0,75 m e 2,25 m de distancia a partir da *Acacia* marcada (Figura 5b).

3.5 Conclusões

Foi demonstrada, pela primeira vez em condições de campo, a transferência de N em curto prazo e abaixo do solo a partir de Árvores Fixadoras de N para Árvores não fixadoras de N em companhia. A transferência de N em curto prazo e abaixo do solo foi observada nas árvores de *Eucalyptus* vizinhas dentro de um raio de 6,2 m a partir das árvores de *Acacia*, desde os 5 dias após o início da experiência. Esse estudo sugere que este processo de facilitação poderia promover a nutrição em N de não-AFN crescendo em solos tropicais inférteis quando as raízes finas de AFN e não-AFN estão entrelaçadas ou diretamente conectadas por meio de redes de micorrizas em comum. Essa metodologia poderia ser usada para aumentar a compreensão desse processo de facilitação em florestas tropicais mistas em condições ecológicas contrastes.

Referências

- AUGUSTO, L.; ZELLER, B.; MIDWOOD, A.J.; SWANSTON, C.; DAMBRINE, E.; SCHNEIDER, A.; BOSCH, A. Two-year dynamics of foliage labelling in 8-year-old *Pinus pinaster* trees with ^{15}N , ^{26}Mg and ^{42}Ca - Simulation of Ca transport in xylem using an upscaling approach. **Annals of Forest Science**, Nancy, v. 68, p. 169-178, 2011.
- BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass Spectrometry of Soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-46.

BATTERMAN, S.A.; HEDIN, L.O.; VAN BREUGEL, M.; RANSIJN, J.; CRAVEN, D.J.; HALL, J.S. Key role of symbiotic dinitrogen fixation in tropical forest secondary succession. **Nature**, London, v. 502, p. 224–227, 2013.

BINI, D. **Atributos microbianos e químicos do solo e da serapilheira em plantios puros e mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***. 2013. 105p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BINI, D.; SANTOSA, C.A.; BOUILLET, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; CARDOSO, E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations : Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 57–66, 2013.

BINKLEY, D.; GIARDINA, C. 1997. Nitrogen fixation in tropical forest plantations. In: Nambiar, E.K.S., Brown, A.G. (Eds.), **Management of Soil, Nutrients and Water in Tropical Plantation Forests**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research, n. 43, 1997. p. 297–337.

BINKLEY, D.; SENOCK, R.; BIRD, S.; COLE, T.G. Twenty years of stand development in pure and mixed stands of *Eucalyptus saligna* and nitrogen-fixing *Facaltaria moluccana*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 182, p. 93-102, 2003.

BLACK, B.L.; FUCHIGAMI, L.H.; COLEMAN, G.D. Partitioning of nitrate assimilation among leaves, stems and roots of poplar. **Tree Physiology**, Oxford, v. 22, p. 717-724, 2002.

BLASER, W.J.; SHANUNGU, G.K.; EDWARDS, P.J.; VENTERINK, H.O. Woody encroachment reduces nutrient limitation and promotes soil carbon sequestration. **Ecology and Evolution**, London, v 4, p. 1423-1438, 2014.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; ARNAUD, M.; THONGO M'BOU, A.; SAINT-ANDRE, L.; JOURDAN, C. Changes with age in the spatial distribution of roots of a *Eucalyptus* clone in the Congo. Impact on water and nutrient uptake ability. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 171, p. 43–57, 2002.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; VOIGTLAENDER, M.; GAVA, J.L.; LEITE, F.P.; HAKAMADA, R.; MARESCHAL, L.; MABIALA, A.; TARDY, F.; LEVILLAIN, J.; DELEPORTE, P.; EPRON, D.; NOUVELLON, Y. *Eucalyptus* and *Acacia* tree growth over entire rotation in single- and mixed-species plantations across five sites in Brazil and Congo. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 89-101, 2013.

BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; MOREIRA, M.Z.; TRIVELIN, P.C.O.; JOURDAN, C.; SILVA, E.V.; PICCOLO, M.C.; TSAI, S.M.; GALIANA, A. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil 2. Nitrogen accumulation in the stands and biological N₂ fixation. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3918–3930, 2008.

CATCHPOOLE, D.W.; BLAIR, G.J. Forage tree legumes. II. Investigation of nitrogen transfer to an associated grass using a split-plot technique. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 41, p. 531-537, 1990.

CHALK, P.M.; PEOPLES, M.B.; MCNEILL, A.M.; BODDEY, R.M.; UNKOVICH, M.J.; GARDENER, M.J.; SILVA, C.F.; CHEN, D. Methodologies for estimating nitrogen transfer between legumes and companion species in agro-ecosystems: A review of ^{15}N -enriched techniques. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 73, p. 10-21, 2014.

CHRISTINA, M.; LACLAU, J.-P.; GONCALVES, J.L.M.; JOURDAN, C.; NOUVELLON, Y.; BOUILLET, J.-P. Almost symmetrical vertical growth rates above and below ground in one of the world's most productive forests. **Ecosphere**, Ithaca, v. 2, n. 27, 2011.
<http://dx.doi.org/10.1890/ES10-00158.1>

CLIQUET, J.-B.; MURRAY, P.J.; BOUCAUD, J. Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* on the uptake of amino nitrogen by *Lolium perenne*. **New Phytologist**, London, v. 137, p. 345-349, 1997.

DAUNDIN, D.; SIERRA, J. Spatial and temporal variation of below-ground N transfer from a leguminous tree to an associated grass in an agroforestry system. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 126, p. 275-280, 2008.

DUCOUSSO, M.; DUPONNOIS, R.; THOEN, D.; PRIN, Y. Diversity of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* in Africa and Madagascar. **International Journal of Forestry Research**, Nasr city, v. 2012, p. 1-10, 2012.

DUPONNOIS, R.; PLENCHETTE, C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. **Mycorrhiza**, New York, v. 13, p. 85-91, 2003.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solo**. Brasília, 1999. 412p.

FAO, 2010. **Global Forest Resources Assessment**. Disponível em: URL <http://www.fao.org/forestry/fra/fra2010/en/>. Acesso em: 7 mar. 2013.

FELLBAUM, C.R.; MENSAH, J.A.; CLOOS, A.J.; STRAHAN, G.E.; PFEFFER, P.E.; KIERS, E.T.; BUCKING, H. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. **New Phytologist**, London, v. 203, p. 646-656, 2014.

FORRESTER, D.I.; PARES, A.; O'HARA, C.; KHANNA, P.K.; BAUHUS, J. Soil organic carbon is increased in mixed-species plantations of *Eucalyptus* and nitrogen-fixing *Acacia*. **Ecosystems**, Heidelberg, v. 16, p. 123-132, 2013.

FORRESTER, D.I. The spatial and temporal dynamics of species interactions in mixed-species forests: From pattern to process. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 312, p. 282-292, 2014.

FOUNOUNE, H.; DUPONNOIS, R.; BÂ, A.M. Ectomycorrhization of *Acacia mangium*, Willd. and *Acacia holosericea*, A. Cunn. ex G. Don in Senegal. Impact on plant growth, populations of indigenous symbiotic microorganisms and plant parasitic nematodes. **Journal of Arid Environments**, Amsterdam, v. 50, p. 325-332, 2002.

FUSTEC, J.; LESUFFLEUR, F.; MAHIEU, S.; CLIQUET, J.-B. Nitrogen rhizodeposition of legumes. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, p. 57-66, 2010.

- GARDENER, M.; PEOPLES, M.; CONDON, J.; LI, G.; CONYERS, M.; DEAR, B. Evaluating the importance of a potential source of error when applying shoot ^{15}N labelling techniques to legumes to quantify the below-ground transfer of nitrogen to other species. In: Yunusa, I. In: AUSTRALIAN AGRONOMY CONFERENCE 16., 2012. Armidale, NSW. **Proceedings...** Oct. 2012, Armidale, NSW. p. 14-18.
- GILMOUR, A.R.; GOGEL, B.J.; CULLIS, B.R.; WELHAM, S.J.; THOMPSON, R. **ASReml user guide release 2.0**. VSN International Hemel Hempstead HP1 1ES, 2005. 311p.
- GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L.; LACLAU, J-P.; BOUILLET, J-P.; RANGER, J. Assessing the effects of early management on long-term site productivity of fast-growing eucalypt plantations: the Brazilian experience. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, Grahamstown, v. 70, p. 105–118, 2008.
- GYLFADÓTTIR, T.; HELGADÓTTIR, Á.; HØGH-JENSEN, H. Consequences of including adapted white clover in northern European grassland: transfer and deposition of nitrogen. **Plant and Soil**, The Hague, v. 297, p. 93-104, 2007.
- HALE, M.G. MORE, L.D., 1979. Factors influencing root exudation II- 1970-1978. **Advanced in Agronomy**, v. 31, p. 93-120. Academic Press INC. New York.
- HE, X.; CRITCHLEY, C.; NG, H.; BLEDSOE, C. Reciprocal N ($^{15}\text{NH}_4^+$ or $^{15}\text{NO}_3^-$) transfer between non- N_2 -fixing *Eucalyptus maculata* and N_2 -fixing *Casuarina cunninghamiana* linked by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. **New Phytologist**, London, v. 163, p. 629–640, 2004.
- HE, X.; CRITCHLEY, C.; NG, H.; BLEDSOE, C. Nodulated N_2 -fixing *Casuarina cunninghamiana* is the sink for net N transfer from non- N_2 -fixing *Eucalyptus maculata* via an ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. using $^{15}\text{NH}_4^+$ or $^{15}\text{NO}_3^-$ supplied as ammonium nitrate. **New Phytologist**, London, v. 167, p. 897–912, 2005.
- HE, X.; BLEDSOE, C.; ZASOSKI, R.J.; SOUTHWORTH, D.; HORWATH, W.R. Rapid nitrogen transfer from ectomycorrhizal pines to adjacent ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal plants in a California oak woodland. **New Phytologist**, London, v. 170, p. 143–51, 2006.
- HE, X.; XU, M.; QIU, G.Y.; ZHOU, J. Use of ^{15}N stable isotope to quantify nitrogen transfer between mycorrhizal plants. **Journal of Plant Ecology**, Oxford, v. 2, p. 107–118, 2009.
- HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; JAILLARD, B.; TANG, C. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. **Plant and Soil**, The Hague, v. 248, p. 43–59, 2003.
- INGLEBY, K.; WILSON, J.; MUNRO, R.C.; CAVERS, S. Mycorrhizas in agroforestry: spread and sharing of arbuscular mycorrhizal fungi between trees and crops: complementary use of molecular and microscopic approaches. **Plant and Soil**, The Hague, v. 294, p. 125–136, 2007.
- ISSAC, M.E.; HINSINGER, P.; HARMAND, J.M. Nitrogen and phosphorus economy of a legume tree-cereal intercropping system under controlled conditions. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 434, p. 71–78, 2012.

- JOHNSON, J.E.; BERRY, J.A. The influence of leaf-atmosphere $\text{NH}_3(\text{g})$ exchange on the isotopic composition of nitrogen in plants and the atmosphere. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 36, p. 1783-1801, 2013.
- JALONEN, R.; NYGREN, P.; SIERRA, J. Transfer of nitrogen from a tropical legume tree to an associated fodder grass via root exudation and common mycelial networks. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 32, p. 1366–1376, 2009.
- JAMONT, M.; PIVA, G.; FUSTEC, J. Sharing N resources in the early growth of rapeseed intercropped with faba bean: does N transfer matter? **Plant and Soil**, The Hague, v. 371, p. 641-653, 2013.
- JONES, D.L.; HODGE, A.; KUZUYAKOV, Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. **New Phytologist**, London, v. 163, p. 459–480, 2004.
- KENWARD, M.G.; ROGER, J.H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, Malden, v. 53, p. 983-997, 1997.
- KOUTIKA, L.-S.; EPRON, D.; BOUILLET, J.-P.; MARESCHAL, L. Changes in N and C concentrations, soil acidity and P availability in tropical mixed acacia and eucalypt plantations on a nutrient-poor Sandy soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 379, p. 205-216, 2014.
- LACLAU, J.-P.; TOUTAIN, F.; THONGO M'BOU, A.; ARNAUD, M.; JOFFRE, R.; RANGER, J. The function of the superficial root mat in the biogeochemical cycles of nutrient in congolese eucalyptus plantations. **Annals of Botany**, Oxford, v. 93, p. 249-261, 2004.
- LACLAU, J.-P.; BOUILLET, J.-P.; GONÇALVES, J.L.M.; SILVA, E.V.; JOURDAN, C.; CUNHA, M.C.S.; MOREIRA, R.M.; SAINT-ANDRE, L.; MAQUERE, V.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J. Mixed-species plantations of *Acacia mangium* and *Eucalyptus grandis* in Brazil. 1 Growth dynamics and aboveground net primary production. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 3905–3917, 2008.
- LACLAU, J.-P.; RANGER, J.; GONÇALVES, J.L.M.; MAQUERE, V.; KRUSCHE, A.V.; M'BOU, A.T.; NOUVELLON, Y.; SAINT-ANDRE, L.; BOUILLET, J.-P.; PICCOLO, M.C.; DELEPORT, P. Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 259, p. 1771–1785, 2010.
- LACLAU, J.-P.; NOUVELLON, Y.; REINE, C.; GONÇALVES, J.L.M.; KRUSCHE, A.V.; JOURDAN, C.; LE MAIRE, G.; BOUILLET, J.-P. Mixing *Eucalyptus* and *Acacia* trees leads to fine root over-yielding and vertical segregation between species. **Oecologia**, London, v. 172, p. 903-913, 2013.
- LIPSON, D.; NÄSHOLM, T. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. **Oecologia**, London, v. 128, p. 305–316, 2001.
- MAFONGOYA, P.L.; GILLER, K.E.; PALM, C.A. Decomposition and nitrogen release patterns of tree prunings and litter. **Agroforestry Systems**, Missouri, v. 38, p. 77–97, 1998.
- MANHÃES, C.M.C.; GAMA-RODRIGUES, E.F.; SILVA-MOÇO, M.K.; GAMA-RODRIGUES, A.C. Meso- and macrofauna in the soil and litter of leguminous trees in a degraded pasture in Brazil. **Agroforestry Systems**, Missouri, v. 87, p. 993-1004, 2013.

MARESCHAL, L.; LACLAU, J-P.; NZILA, J.D.D.; VERSINI, A.; KOUTIKA, L.S.; MAZOUIMBOU, J.C.; DELEPORTE, P.; BOUILLET, J-P.; RANGER J. Nutrient leaching and deep drainage under Eucalyptus plantations managed in short rotations after afforestation of an African savanna: two 7-year time series. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 307, p. 242-254, 2013.

MERBACH, W.; MIRUS, E.; KNOF, G.; REMUS, R.; RUPPEL, S.; RUSSOW, R.; GRANSEE, A.; SCHULZE, J. Release of carbon and nitrogen compounds by plant roots and their possible ecological importance. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Monchhagen, v.162, p. 373-383, 1999.

MILLARD, P.; WENDLER, R.; GRASSI, G.; GRELET, G.A.; TAGLIAVINI, M. Translocation of nitrogen in the phloem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. **Tree Physiology**, Oxford, v. 26, p. 527–536, 2006.

MILLER, A.; CRAMER, M. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 274, p. 1-36, 2005.

MUNROE, J.W.; ISAAC, M.E. N₂-fixing trees and the transfer of fixed-N for sustainable agroforestry: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 34, p. 417-427, 2014.

NAIR, R.; WEATHERALL, A.; PERKS, M.; MENCUCCINI, M. Stem injection of 15N–NH₄NO₃ into mature Sitka spruce (*Picea sitchensis*). **Tree Physiology**, Oxford, v. 34, p. 1130–1140, 2014.

NICHOLS, J.D.; CARPENTER, F.L. Interplanting *Inga edulis* yields nitrogen benefits to *Terminalia Amazonia*. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, p. 344-351, 2006.

O'GRADY, A.P.; WORLEDGE, D.; BATTAGLIA, M. Temporal and spatial changes in fine root distributions in a young *Eucalyptus globulus* stand in southern Tasmania. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 214, p. 373-383, 2005.

PARROTTA, J.A.; BAKER, D.D.; FRIED, M. Changes in dinitrogen fixation in maturing stands of *Casuarina equisetifolia* and *Leucaena leucocephala*. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 26, p. 1684–1691, 1996.

PATE, J.; SHEDLEY, E.; ARTHUR, D.; ADAMS, M. Spatial and temporal variations in phloem sap composition of plantation-grown *Eucalyptus globulus*. **Oecologia**, London, v. 117, p. 312-322, 1998.

PEREIRA, A.P.A. **Influência da profundidade do solo e do manejo de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* na estrutura das comunidades microbianas do solo**. 2014. 102p. Dissertação (Mestrado Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

PFAUTSCH, S.; GESSLER, A.; ADAMS, M.A.; RENNENBERG, H. Using amino-nitrogen pools and fluxes to identify contributions of understory *Acacia* spp. to overstory *Eucalyptus regnans* and stand nitrogen uptake in temperate Australia. **New Phytologist**, London, v.183, p. 1097–1113, 2009.

PAYNEL, F.; MURRAY, P.J.; CLIQUET, J. Root exudates: a pathway for short-term N transfer from clover and ryegrass. **Plant and Soil**, The Hague, v.229, p. 235–243, 2001.

PAYNEL, F.; CLIQUET, T. J. N transfer from white clover to perennial ryegrass, via exudation of nitrogenous compounds. **Agronomie**, Paris, v.23, p. 503-510, 2003.

PEUKE, A.D.; GESSLER, A.; TCHERKEZ, G. Experimental evidence for diel $\delta^{15}\text{N}$ -patterns in different tissues, xylem and phloem saps of castor bean (*Ricinus communis* L). **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 36, p. 2219-2228, 2013.

PIOTTO, D. A meta-analysis comparing tree growth in monocultures and mixed plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, p. 781–786, 2008.

RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; PEIXOTO, R.S.; PINHEIRO, Y.A.S.; PICCOLO, M.C.; CHAER, G.M.; ROSADO, A.S. Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 66, p. 146-153, 2013.

RAO, A.V.; GILLER, E.G. Nitrogen fixation and its transfer from *Leucaena* to grass using ^{15}N . **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 61, p. 221-227, 1993.

RASMUSSEN, J.; ERIKSEN, J.; JENSEN, E.S.; ESBENSEN, K.H.; HØGH-JENSEN, H. In situ carbon and nitrogen dynamics in ryegrass–clover mixtures: Transfers, deposition and leaching. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 804-815, 2007.

RASMUSSEN, J.; GYLFADÓTTIR, T.; LOGES, R.; ERIKSEN, J.; HELGADÓTTIR, A. Spatial and temporal variation in N transfer in grass-white clover mixtures at three Northern European field sites. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 57, p. 654-662, 2013.

RICHARDS, A.E.; FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; SCHERER-LORENZEN, M. The influence of mixed tree plantations on the nutrition of individual species: a review. **Tree Physiology**, Oxford, v.30, p. 1192-1208, 2010.

SCHENCK, Z.U.; SCHWEINSBERG-MICKAN, M.; JOERGENSEN, R.G.; MÜLLER, T. Fate of ^{13}C - and ^{15}N -labelled rhizodeposition of *Lolium perenne* as function of the distance to the root surface. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 42, p. 910–918, 2010.

SILVA, E.V.; GONÇALVES, J.L.M.; COELHO, S.R.F.; MOREIRA, R.M.; MELLO, S.L.M.; BOUILLET, J-P.; JOURDAN, C.; LACLAU, J-P. Dynamics of fine root distribution after establishment of monospecific and mixed-species plantations of *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 325, p. 305–318, 2009.

STADDON, P.L.; RAMSEY, C.B.; OSTLE, N.; INESON, P.; FITTER, A.H. Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of ^{14}C . **Science**, Washington, v. 300, p. 1138–1140, 2003.

SUDMEYER, R.A.; SIMONS, J.A. *Eucalyptus globulus* agroforestry on deep sands on the southeast coast of Western Australia: The promise and the reality. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 127, p. 73-84, 2008.

SWANSTON, C.W.; MYROLD, D.D. Evaluation of the stem injection technique and subsequent ^{15}N partitioning in red alder crowns. **Plant and Soil**, The Hague, v. 198, p. 63-69, 1998.

TESTE, F.P.; SIMARD, S.W.; DURALL, D.M. Role of mycorrhizal networks and tree proximity in ectomycorrhizal colonization of planted seedlings. **Fungal Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 21-30, 2009.

TESTE, F.P.; VENEKLAAS, E.J.; DIXON, K.W.; LAMBERS, H. Is nitrogen transfer among plants enhanced by contrasting nutrient-acquisition strategies? **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 38, p. 50-60, 2015.

VOIGTLAENDER, M.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; PICCOLO, M.C.; MOREIRA, M.Z.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J.; BOUILLET, J-P. Introducing *Acacia mangium* trees in *Eucalyptus grandis* plantations: consequences for soil organic matter stocks and nitrogen mineralization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 352, p. 99–111, 2012.

WACQUANT, J.P.; OUKNIDER, M.; JACQUARD, P. Evidence for a periodic excretion of N by roots of grass-legume associations. **Plant and Soil**, The Hague, v. 116, p. 57–68, 1989.

WICHERN, F.; EBERHARDT, E.; MAYER, J.; JOERGENSEN, R.G.; MÜLLER, T. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.40, p. 30-48, 2008.

4 RASTREAMENTO DO NITROGÊNIO LIBERADO DE RESÍDUOS DE COLHEITA DE PLANTAÇÕES MONOESPECÍFICAS DE *Eucalyptus grandis* E *Acacia mangium* PELO USO DE TÉCNICAS ISOTÓPICAS

Resumo

Resíduos que permanecem após o corte do povoamento – principalmente folhas, galhos e casca – podem representar um importante pool de N em solos tropicais inférteis, em relação às demandas de nutrientes de espécies como *Eucalyptus sp.* que são altas durante o primeiro ano após o plantio. Entretanto, ainda é um desafio acessar o destino do nitrogênio (N) liberado no ecossistema pela decomposição desses resíduos. N pode ser incorporado nas frações da serapilheira, na matéria orgânica do solo e biomassa microbiana; é mineralizado, lixiviado ou absorvido pelas árvores da rotação seguinte. Uma técnica adaptada é rastrear no tempo o destino do N liberado de resíduos enriquecidos com ^{15}N por técnicas de diluição isotópica. O objetivo desse estudo é quantificar o destino do N liberado a partir de resíduos (folhas, galhos e casca) deixado após o corte de povoamentos mono específicos de *E. grandis* e *A. mangium* e sua contribuição para sustentar o crescimento das árvores e os estoques de N no solo durante os primeiros 24 meses após o plantio de *Eucalyptus*. Nesse capítulo será apresentada a metodologia utilizada e os resultados preliminares. O experimento com substituição dos resíduos foi estabelecido após o corte de povoamentos mono específicos de *A. mangium* (T1) *E. grandis* (T2). Após o plantio do clone híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla* nas parcelas envolvendo cada tratamento, nove plantas por tratamento foram isoladas por meio de trincheiras e, em um $\frac{1}{4}$ da área útil de cada planta, houve a substituição dos resíduos da colheita por resíduos enriquecidos com ^{15}N . Amostras de resíduos de colheita e serapilheira, solo e folhas jovens foram feitas periodicamente para análises de N total e ^{15}N . Os resultados preliminares indicam o efeito diferenciado do tipo de resíduo sobre a dinâmica do N no solo. Foi observado que os resíduos de *A. mangium* podem aumentar em 2-3 vezes mais as entradas de N no sistema em relação aos resíduos de *E. grandis*. Resíduos de *Acacia* contribuíram mais rapidamente para o estoque de N no solo (antes dos 3 meses) do que resíduos de *Eucalyptus* (antes dos 7 meses). O ^{15}N foi detectado nas folhas jovens das plantas de *Eucalyptus* aos 3 meses e aos 7 meses após o plantio quando elas foram estabelecidas sobre resíduos de colheita de *A. mangium* e *E. grandis*, respectivamente. O estudo sugere que os resíduos de colheita tem um papel importante sobre a manutenção dos estoques de N no solo e na nutrição das árvores desde os primeiros meses de crescimento das plantas.

Palavras-chave: Plantações florestais; Resíduos de colheita; Transferência de nitrogênio; Leguminosas; ^{15}N ; Rotação florestal

Abstract

The residues remaining after stand harvesting - mainly leaves, branches and bark - can represent an important pool of nitrogen (N) to face the nutrient demand of fast growing species as *Eucalyptus sp.* established in N-deficient soils; especially in the firsts years after planting when the N demand is high. It is a challenge to assess the destination of the N released within the ecosystem during the decomposition of these residues. N can be incorporated into litter fractions, soil organic matter, and microbial biomass, mineralized, leached or taken up by the trees of the next stand rotation. An adapted technique is to trace the destination of ^{15}N -N released from ^{15}N enriched residues. The aim of this study was to quantify the various routes of the N released from harvest residues of monospecific stand of *E. grandis* and *A. mangium*, and its contribution to sustain *Eucalyptus* tree growth and soil N stocks during the first 24 months after planting of *Eucalyptus* stands. This chapter presents the methodology and preliminary results. The experiment with replacement of residues was

established after the harvester of monospecific stands of *A. mangium* (T1) and *E. grandis* (T2). After planting hybrid clones of *E. grandis* x *E. urophylla*, nine plants per treatment were isolated by trenches, and in ¼ of the useful area of each plant was the replacement of original residues by residues ¹⁵N-enriched. Samples of residues and litter, soil and young leaves of *Eucalyptus* were made periodically to total N and ¹⁵N analysis. The preliminary results indicate the differential effect of treatment on the dynamics of N in the top soil. It was observed that the residues of *A. mangium* increased 2-3 times the N inputs in the system when compared to residues of *E. grandis*. *Acacia* residues contributed rapidly to the N stock in the top soil (before 3 months) than *Eucalyptus* residues (before 7 months). The ¹⁵N was detected in the young leaves of *Eucalyptus* plants at 3 months and 7 months after planting when they were established on *A. mangium* and *E. grandis* harvester residues, respectively. This study suggests that the harvester residues have an important role on the maintenance of N stocks in soil and nutrition of trees since the first months after planting.

Keywords: Forest plantations; Harvester residues; Nitrogen transfer; Legumes; ¹⁵N; Forest rotation

4.1 Introdução

Plantações florestais tropicais (PFT) podem ser estabelecidas em solos tropicais inférteis anteriormente ocupados por agrossistemas como de fato tem ocorrido no Brasil (GONÇALVES et al., 2013) e outros países (ITTO, 2009). Entretanto, a deficiência nutricional, sobretudo, nitrogênio (N) e fósforo (P), é um dos principais fatores limitantes ao crescimento das árvores nessas PFT (BORMANN; GORDON, 1989; GONÇALVES et al., 2008). O N vem sendo aplicado nos plantios florestais para mitigar as quantidades exportadas pela colheita e promover o rápido crescimento das plantas, principalmente nos primeiros dois anos após plantio, quando ocorre o fechamento das copas (GONÇALVES et al., 2008, 2013; NANBIAR; HARWOOD, 2014).

Durante os ciclos de cultivo das PFT, grandes quantidades de N são adicionadas ao solo após a queda da serapilheira e de resíduos de colheita (e.g. folhas, galhos e casca) (GONÇALVES et al., 2008; LACLAU et al., 2010; NANBIAR; HARWOOD, 2014; VERSINI et al., 2013). A velocidade de liberação do N a partir da matéria orgânica recém-adicionada em ambientes tropicais varia de acordo com fatores climáticos (e.g. temperatura, umidade, precipitação) e em função da qualidade do material (e.g. teores de N, relação C/N, teores de lignina e polifenóis, entre outros) (BARLOW et al., 2007; CUSACK et al., 2009). O efeito da decomposição dos resíduos de monoculturas na produção da rotação seguinte foi estudado em particular na rede Cifor “Site Management and productivity in tropical plantation forests” (LACLAU et al., 2010; NANBIAR et al., 2008). A partir dos estudos dessa rede foi observado que a manutenção dos resíduos de colheita minimiza os danos ao balanço de nutrientes no solo após a exportação dos nutrientes pela colheita das árvores, favorecendo a

produtividade e a sustentabilidade de plantações ao longo de sucessivas rotações (GONÇALVES et al., 2004, 2008, 2013; NAMBIAR; HARWOOD, 2014; LACLAU et al., 2010).

Nas últimas décadas tem se intensificado os estudos envolvendo rotações culturais como uma maneira eficiente de reduzir o uso de N e P via fertilizante (CREWS; PEOPLES, 2004). Essa técnica é particularmente interessante nos trópicos devido ao clima, favorável aos processos biológicos que controlam a decomposição da matéria orgânica e disponibilização de nutrientes. A possibilidade de intercalar árvores associadas a bactérias diazotróficas (e.g. como dos gêneros *Acacia* e *Casuarina*) e *Eucalyptus*, em rotações florestais curtas poderia gerar efeitos positivos aos plantios florestais (e.g. melhoria da qualidade do solo e da disponibilidade de nutrientes, manutenção da produtividade e anular a aplicação de fertilizantes nitrogenados, diminuição dos riscos fotossanitários e com ervas daninhas) (CREWS; PEOPLES, 2004; LIEBMAN; DYCK, 1993; PARK et al., 2010). Plantações de *Eucalyptus*, principalmente *E. pellita*, tem sido estabelecidas após uma ou duas rotações de *A. mangium* em Sumatra, Indonésia. Os resultados mostraram o potencial de resposta de crescimento em vários dos sítios, sendo a produtividade afetada por outros fatores, principalmente a ocorrência de cancro por *Botryosphaeria* (HARWOOD; NAMBIAR, 2014).

Empresas florestais e produtores rurais, poderiam se beneficiar com a melhoria na qualidade do solo promovida por rotações florestais com leguminosas, entre elas, a elevação das quantidades de N e P disponível no solo (BINI et al., 2013; RACHID et al., 2013; VOIGTLAENDER et al., 2012). Após uma rotação florestal (~7 anos) com *Acacia mangium* houve aumento de 175 a 500 kg ha⁻¹ na quantidade de N no sistema em relação a plantios monoespecíficos de *Eucalyptus grandis*, variando de acordo com o tipo de solo e condições climáticas (VOIGTLAENDER, 2012). Além disso, quantidades de N disponível no solo (como nitrato e amônio) foram em média duas vezes maiores nos plantios monoespecíficos de *A. mangium* do que *E. grandis* (VOIGTLAENDER et al., 2012; VOIGTLAENDER, 2012).

Entretanto, ainda é um desafio entender melhor o destino do N liberado no ecossistema a partir da decomposição das folhas, dos galhos e das cascas que são resíduos comumente deixados após o corte dos povoamentos florestais, com poucas referências na partição do N da serapilheira ou resíduos, no solo e nas árvores de eucalipto (VERSSINI et al., 2013). Uma técnica adaptada é rastrear no tempo o destino do N/¹⁵N liberado de resíduos muito enriquecidos com ¹⁵N (ZELLER et al., 2000; VERSINI et al., 2013). Através dessa técnica, é possível detectar a transferência de N entre componentes, seguir a dinâmica temporal em uma escala intra e inter componentes, bem como avaliar a absorção de N pelas

árvores ao longo dos meses após o plantio. Além disto, a marcação com ^{15}N permite determinar o balanço de massa do N derivado dos resíduos no sistema solo-planta, e futuramente, poderá auxiliar na formulação de estratégias de manejo de fertilizantes mais sustentáveis (VERSINI et al., 2013).

Existem poucas referências na partição do N da serapilheira ou resíduos no solo e nas árvores, com grandes diferenças entre espécies e condições ambientais (ZELLER et al., 2000; SWANSTON; MYROLD, 1997; VERSINI et al., 2013). Zeller et al. (2000) monitorou durante 3 anos o caminho do N derivado da serapilheira enriquecida com ^{15}N em uma floresta de *Fagus sylvatica* L. com aproximadamente 50 anos de idade na França (temperatura média anual 6 °C, precipitação 1300 mm por ano). Embora os autores tenham observado um enriquecimento com ^{15}N nas raízes e folhas desde 6 meses após a adição da serapilheira enriquecida com ^{15}N sobre o solo, apenas 3% do N da serapilheira foram encontrados na biomassa de árvores de *F. sylvatica* após 3 anos. Em plantações de *Eucalyptus* em Kondi (República do Congo; temperatura média anual 25 °C, precipitação 1350 mm por ano), Versini et al. (2013) estimou que o N liberado a partir da decomposição de resíduos de colheita marcados com ^{15}N (folhas, galhos e casca) poderia contribuir com aproximadamente 40% do conteúdo de N de novas árvores de *Eucalyptus* com dois anos de idade.

Não foram encontrados estudos feitos no Brasil para quantificar a contribuição do N derivado a partir de resíduos de colheita de *Eucalyptus* ou *Acacia* na manutenção dos estoques de N na matéria orgânica do solo e no crescimento das árvores de uma rotação seguinte. Essas espécies de rápido crescimento são largamente plantadas nas regiões tropicais (FAO, 2010). A introdução da *A. mangium* pode levar a facilitação através da fixação do N e a transferência do N derivado da serapilheira e dos resíduos de colheita para árvores de *Eucalyptus*. Ao determinar as quantidades de N recuperado pelas árvores que foi derivado dos resíduos de colheita da rotação anterior, seria possível adicionar novos critérios para recomendação de fertilizações em florestas estabelecidas com manutenção de resíduos de colheita, e, dessa forma, um uso mais eficiente dos fertilizantes.

Nesse capítulo foi descrito a metodologia utilizada nesta pesquisa, além de resultados preliminares. O aperfeiçoamento das técnicas de diluição isotópica do ^{15}N nas PFT para o estudo do ciclo do N permitirá a melhor compreensão do papel dos resíduos de colheita em condições edáficas e climáticas contrastantes. O estudo tem como objetivo rastrear durante os dois primeiros anos após o plantio de clone de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*, o destino do N derivado da decomposição de resíduos de colheita (folhas, galhos e cascas) da

rotação anterior com *Eucalyptus grandis* ou *Acacia mangium* (8 anos de rotação), e a contribuição desse N na formação da matéria orgânica do solo e na nutrição das árvores. A hipótese geral do estudo é que os resíduos com altas quantidades de N a partir da *Acacia* podem alterar para melhor a dinâmica do N e contribuir nutricionalmente mais os novos *Eucalyptus* do que resíduos com baixos teores de N proviêntes da rotação anterior do *Eucalyptus*.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Área de estudo

O estudo é conduzido em área de reforma (após 8 anos de rotação) de plantios puros de *A. mangium* e *E. grandis*, na companhia Suzano Papel e Celulose, na região de Bofete-SP (coordenadas 23° 06' S e 48° 15' W). A temperatura média anual é 21,4 °C, e os valores médios anuais de precipitação e umidade do ar são de 1420 mm e 71 %, respectivamente. A região apresenta dois meses do ano com precipitação menor que 30 mm. Os solos da área foram classificados como Latossolos, com conteúdo de argila de 11,8%, 16,8% e 19,3%, respectivamente, nas camadas de 0-5 cm, 50-100 cm e 200-300 cm. O pH é baixo (4,5) na camada de 0-5 cm e capacidade de troca catiônica (CTC) varia de 0,40 a 0,11 (cmol_c kg⁻¹ de solo) entre a camada 0-5 cm e 200-300 cm, respectivamente. Outros detalhes das condições da área de estudo são apresentados por Bouillet et al., (2013).

4.2.2 O experimento

O experimento anterior foi instalado em delineamento em blocos casualizados com dois tratamentos (6 x 4 plantas por parcela + bordadura dupla; com 4 blocos) que envolveram plantios anteriores de *A. mangium* (T1) ou *E. grandis*(T2) no espaçamento 3x2 m (densidade= 1666 plantas ha⁻¹) (Figura 1). Após o corte das árvores em abril/2013 houve a distribuição homogenia de colheita principalmente folhas, galhos e cascas, sobre a serapilheira dentro de cada tratamento. A biomassa de folhas, galhos e casca foi estimada por equações alométricas (procedimento descrito em BOUILLET et al. 2013) estabelecidas após a derrubada de 10 árvores distribuídas em classes de área basal (Tabela 1).

Três meses após o corte das árvores, um novo plantio com clone de híbrido de *Eucalypts grandis* e *E. urophylla*foi realizado com a mesma densidade de plantas da rotação anterior. Para o plantio foi realizado a abertura manual de covas (30 cm profundidade; 30 cm de comprimento e largura) e incorporados ao solo 44, 10, 2 e 1 g cova⁻¹ de, respectivamente, superfosfato triplo (42% P₂O₅ + 10% Ca), cloreto de potássio (60% K₂O), Borax (36% B₂O₃)

e sulfeto de zinco (20% ZnSO_4). Nenhuma adubação nitrogenada foi aplicada nos tratamentos durante a rotação anterior ou na nova rotação. Uma semana após a adubação foi realizado o plantio das mudas e duas irrigações (~ 2 litros de água por planta) nos primeiros 30 dias. O controle da matocompetição vem sendo realizado sempre que necessário através de capina manual. As brotações principalmente derivadas das cepas dos *E. grandis* foram cortadas manualmente aos 4 meses após o plantio.

Figura 1 - Rotação anterior com *Acacia mangium* (T1-esquerda) e *Eucalyptus grandis* (T2-direita) aos 8 anos de idade na Fazenda Entre Rios (Suzano Papel e Celulose)

Tabela 1 - Estimação da biomassa de resíduos da rotação anterior com *Acacia mangium* (T1) e *Eucalyptus grandis* (T2), proporção de resíduos nas subparcelas e teores médios de N total e ^{15}N átomos % nos resíduos enriquecidos com ^{15}N usados no experimento

Tratamentos		Resíduos		
T1	Folha	Galho vivo	Casca	
Biomassa (kg ha ⁻¹)	12042 ± 376	12371 ± 593	13077 ± 413	
Biomassa (kg 1,5 m ⁻²)	1,81 ± 0,05	1,86 ± 0,08	1,96 ± 0,06	
N (%)	2,63 ± 0,36	0,74 ± 0,10	1,00 ± 0,09	
¹⁵ N (átomos %)	0,71 ± 0,09	0,88 ± 0,13	0,62 ± 0,03	
T2				
Biomassa (kg ha ⁻¹)	4652 ± 330	5936 ± 387	15139 ± 947	
Biomassa (kg 1,5 m ⁻²)	0,70 ± 0,04	0,89 ± 0,05	2,27 ± 0,14	
N (%)	2,16 ± 0,03	0,37 ± 0,06	0,39 ± 0,04	
¹⁵ N (átomos %)	1,47 ± 0,04	1,49 ± 0,14	1,32 ± 0,12	

Em cada tratamento (T1 e T2) foram delimitados para o estudo 9 parcelas com uma planta cada, sendo 3 parcelas por bloco, em 3 blocos. As plantas nessas parcelas foram isoladas das demais até 1 m de profundidade através de lona de plástica com 2 mm de espessura, após abertura de trincheira na área de 6 m² (Figuras 2 e 3). Em cada parcela, foi delimitada uma subparcela (quarto de voronoi de 1,5 m² da área útil) onde houve à substituição dos resíduos da colheita por resíduos enriquecidos com ¹⁵N (Tabela 1, Figura 3). Nessas parcelas, os resíduos foram dispostos na seguinte ordem: casca, sobre a serapilheira, seguidos por galhos vivos e folhas. Os resíduos com ¹⁵N foram obtidos pelo mesmo procedimento adotado no capítulo 3. Árvores adultas de *A. mangium* (N=3) e *E. grandis* (N=6) foram marcadas com, respectivamente, 0,5 e 0,9 g de ¹⁵N como sulfato de amônio (99,9 átomos % de ¹⁵N). Entre 3 e 4 meses após a marcação, as árvores foram derrubadas e a biomassa total de folhas, galhos e casca foram armazenados e no caso das folhas foram secos em estufa de circulação de ar forçada a 65 °C. A determinação dos teores de N e ¹⁵N atm% nos resíduos foi realizada em amostras obtidas da seguinte forma: folhas jovens (coletadas nos últimos 20 cm dos galhos), folhas velhas (o restante das folhas dos galhos); galhos vivos (todos os galhos até 2 cm de diâmetro); casca (cascas coletadas até a altura de 4 cm de diâmetro do fuste).

Figura 2 - Esquema de isolamento das parcelas e substituição de resíduos de colheita por resíduos enriquecidos com ¹⁵N. Cada tratamento é composto por nove repetições (3 por bloco) onde houve o isolamento das árvores. Cada parcela continha um total de 80 árvores e bordadura dupla

Em cada tratamento, três parcelas (1 por bloco) com substituição dos resíduos foram escolhidas para a instalação de placas de polietileno (LACLAU et al., 2010) usadas nas coletas de água (Figura 5). As placas foram instaladas em duas profundidades: abaixo da serapilheira e a 15 cm de profundidade.

Figura 3 - Trincheiras e lonas utilizadas no isolamento das árvores das parcelas onde ocorreu a substituição dos resíduos

Figura 4 - Subparcelas onde os resíduos de colheita de *A. mangium* e *E. grandis* substituídos por resíduos enriquecidos com ^{15}N

Figura 5 - Instalação de placas de polietileno usadas no aferimento do N e ^{15}N na água a 15 cm de profundidade, sendo as placas instaladas em três parcelas por tratamento (uma por bloco)

4.2.3 Avaliações

Amostragens antes de substituição dos resíduos (T0)

Essas coletas foram realizadas entre 1-3 meses antes da colheita das árvores para caracterizar inicialmente os tratamentos e servirão para futuras comparações com os resultados obtidos após a aplicação dos resíduos enriquecidos com ^{15}N .

Em cada tratamento, seis amostras compostas de serapilheira foram obtidas a partir de 54 pontos de coleta igualmente distribuídos em três blocos (Figura 6). As coletas foram realizadas com um gabarito circular com 30 cm de diâmetro. Em cada bloco, seis árvores foram escolhidas como referência para as coletas de serapilheira. Em cada árvore dois pontos de coleta formaram uma repetição, por exemplo, pontos A-B, C-D ou E-F (Figura 6) que foram sistematicamente distribuídos. Foram coletadas seis amostras de solo por tratamento e por camada (0-2,5; 2,5-5,0; 5,0-7,5; 7,5-10 e 10-15 cm), distribuídas em três blocos (Figura 6). Os pontos de coleta foram escolhidos aleatoriamente onde cada ponto tinha como referência uma árvore. Em cada profundidade de coleta de solo foi coletado amostras para determinação da densidade do solo (Figura 6) com uso de um anel de PVC com diâmetro igual a 5 cm. Foram coletadas três amostras compostas (uma por bloco), cada uma formada por nove amostras simples, na camada de 0-5 cm de profundidade para avaliação da biomassa microbiana. Cada ponto de coleta estava localizado próximo a uma árvore usada como referência, sendo o primeiro ponto a 50 cm de distância da base da árvore e os demais a 1 e 1,5 m no sentido da linha e entrelinha (VOIGTLAENDER et al., 2012). O coletor foi um anel de metal com diâmetro e altura de 5 cm. O solo para avaliação da biomassa microbiana foi armazenado em isopor e gelo, sendo levadas ao laboratório no mesmo dia da coleta onde foram guardadas em geladeira até o momento das análises (máximo de três dias após a coleta).

Amostragens após a substituição dos resíduos

As avaliações foram realizadas aos 3, 7, 14 meses, e serão realizadas aos 24 meses após a instalação do experimento. As avaliações até 14 meses foram concentradas em três parcelas por tratamento (uma parcela por bloco).

Folhas recém-expandidas foram amostradas (3, 7 e 14 meses) para detectar ^{15}N proveniente dos resíduos e inferir qualitativamente no tempo sobre a contribuição desses resíduos para a nutrição das plantas. Foram amostradas por tratamento, 3-5 folhas recém-expandidas de cada um dos nove eucaliptos, e amostras compostas foram formadas a cada 3 plantas (uma por bloco). Uma amostra controle por tratamento a partir de 30 plantas (10

plantas por bloco) vem sendo coletada na mesma época a partir de 30 plantas aleatoriamente distribuídas dentro de cada tratamento.

Figura 6 - Local de coleta de serapilheira e solo, separação das camadas de serapilheira, profundidades de solo amostrado e coletor circular de 0,3 m de diâmetro

Aos 3, 7 e 14 meses foram coletados em cada subparcela (Figura 2), resíduos enriquecidos com ^{15}N + a serapilheira e as diferentes profundidades de solo imediatamente abaixo (Figura 6). Foram amostrados, por tratamento seis pontos (dois por bloco). Esses pontos foram sistematicamente distribuídos a cada coleta como, por exemplo, nas coletas 3 meses (setembro/2013), onde os pontos A-B, C-D e E-F (Figura 6) foram amostrados respectivamente nos blocos 1, 2 e 3. Os resíduos + a serapilheira foram primeiramente separados nas frações folhas, galhos e cascas. Posteriormente, as frações de difícil identificação foram separadas pela diferença de tamanho (passagem por peneiras de 4 mm) em: serapilheira grossa (fração Oa > 4 mm) e fina (fração Oe < 4 mm) (VERSINI et al., 2013). Durante a separação da fração Oa foi detectado a presença de pequenos torrões de solo e grande quantidade de areia na fração Oe. Essas amostras de terras foram cuidadosamente separadas e guardadas. Amostras de solo coletadas em cada profundidade (0-2,5, 2,5-5,0, 5,0-7,5, 7,5-10 e 10-15 cm) foram homogeneizadas no campo e uma amostra de aproximadamente 0,5 kg por camada e tratamento foi guardada.

Aos 3, 7 e 14 meses foram coletados três amostras compostas por tratamento (uma por bloco) na camada de 0-5 cm de profundidade para avaliação da biomassa microbiana. Cada amostra composta foi formada por duas amostras simples coletadas ao lado dos pontos de coleta de solo e resíduos + serapilheira. Os procedimentos de coleta e armazenamento foram iguais ao da coleta antes da aplicação dos resíduos.

As quantidades de água nos tambores foram mensurados aos 2,3, 7 e 14 meses após o plantio, e uma amostra de aproximadamente 250 mL de cada tambor foi armazenada em potes plásticos e congelada.

A biomassa das árvores foi realizada aos 14 meses, sendo amostrada em cada tratamento a biomassa de três árvores (uma por bloco) dentro de parcelas com substituição dos resíduos (no caso a mesma parcela usada para as coletas) e, outras seis fora das parcelas, de acordo com a distribuição em classes área basal. Em cada árvore, foram amostradas todas as frações da biomassa aérea (folhas, galhos vivos e mortos, fuste e casca). Raízes finas (< 2 mm) médias (2-10 mm) e grossas (>10 mm) foram amostradas a partir de 4 plantas (três com resíduos marcados e uma sem). Foram coletadas todas as raízes médias e grossas numa área de 1 m² (50 cm para cada lado da planta) e 50 cm de profundidade. Raízes finas foram amostradas em duas profundidades (0-20; 20-50 cm) com um cilindro metálico de 10 cm de diâmetro. Foram seis pontos de coleta por planta, para representar a área logo abaixo dos resíduos (Figura 6).

4.2.4 Preparo das amostras e análises de laboratório

Todas as amostras vegetais foram secas em estufa a 65 °C até peso constante, pesadas e moídas em moinho Willey (frações mais grossas) ou almofariz (folhas jovens e raízes finas); com a limpeza entre amostras efetuada com jato de ar comprimido e álcool etílico. Após a pesagem das amostras de resíduos + serapilheira, uma amostra foi moída e armazenada em potes estanques de acrílico de 0,03 L. Amostras de solo foram passadas em peneira com 2 mm de malha e removido ao máximo o material vegetal presente, sendo as amostras vegetais provenientes do solo, guardadas. Após o peneiramento do solo, as amostras foram secas ao ar, e posteriormente uma parte homogeneia delas foi mazerada em almofariz e armazenadas em potes estanques de acrílico de 0,03 L.

A biomassa microbiana foi estudada pela técnica de fumigação-extração (VANCE et al., 1987). Amostras de 40 g de solo fresco foram fumigadas ou não com clorofórmio sem etanol (100 mL), e incubadas no escuro e a temperatura ambiente durante 24h. Posteriormente, foi adicionada 160 mL de solução extratora (K₂SO₄ 0,5M) e as amostras

agitadas por 30 minutos (200 rpm). Após a decantação, o líquido sobrenadante foi passado em filtro de papel. O extrato contendo N solúvel foi congelado. As análises isotópicas de ^{15}N e da concentração de N serão realizadas após a evaporação (65 °C) dos extratos (VERSINI et al., 2013). O N na biomassa microbiana será quantificado a partir das diferenças entre amostras fumigadas e não fumigadas (VERSINI et al., 2013).

Amostras de água serão analisadas para as concentrações de nitrato e amônio, bem como a concentração de N total (%) e análises isotópicas de ^{15}N . A metodologia para essas análises a partir de amostras líquidas é descrita no APÊNDICE C.

As amostras vegetais e de solo até sete meses foram analisadas para N total (%) e ^{15}N no laboratório de isótopos estáveis no CENA-USP como descrito nos capítulos 2 e 3. Demais amostras coletadas aos 14 meses (resíduos + serapilheira, solo, biomassa, água), foram devidamente guardadas para posteriores análises. O teor de cinzas ainda será determinado em todas as amostras de serapilheira e resíduos até 14 meses, conforme descrito em Versini et al. (2013).

4.2.5 Cálculos e análise estatística

A biomassa das árvores aos 14 meses foi estimada através de equações alométricas com ajuste da função exponencial $y = a + x^b$, onde y, é a biomassa de folhas, galhos, casca, madeira (em kg planta⁻¹); a e b, são parâmetros do modelo; x, é o diâmetro na altura do peito (1,30 m). Essas informações são apresentadas na Tabela 4.1 no Anexo C.

A partir das amostras coletadas a cada data, os valores de ^{15}N (atom%) encontrados nas análises no espectrômetro foram convertidos para $\delta\%$ de acordo com a eq. 1:

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{amostra}}(\%) = \left(\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{compartimento}} - (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar}}} \right) \times 1000 \quad (1)$$

Onde: ^{15}N é o valor em átomos % observados na amostra e no ar (0,3663); $^{14}\text{N} = 100 - ^{15}\text{N}$ (atom%).

O conteúdo de N em cada compartimento (i.e. resíduos, frações da serapilheira e camadas de solo) foi usado para calcular o conteúdo de ^{15}N em excesso nos mesmos compartimentos, conforme a eq. 2:

$$^{15}\text{N} \text{ (mg m}^{-2} \text{ excesso)} = 1000 * \text{NC}_{\text{conteúdo}} * (^{15}\text{N}_{\text{compartimento}} - ^{15}\text{N}_{\text{ar}} / 100) \quad (2)$$

Onde: $\text{NC}_{\text{conteúdo}}$ é o conteúdo de N (g m⁻²) em cada compartimento; $^{15}\text{N}_{\text{compartimento}}$ é valor de ^{15}N em átomos % no compartimento; $^{15}\text{N}_{\text{ar}}$ é o valor de ^{15}N em átomos % no ar (0,3663 átomos%).

A proporção do N em cada compartimento recuperado a partir dos resíduos inicialmente adicionados foi calculada por meio do ^{15}N em excesso (eq. 3), conforme eq. 4:

$$\%N_{\text{recuperado}} = {}^{15}N_{\text{compartimento}} / {}^{15}N_{\text{resíduos}} * 100 \quad (4)$$

Onde: ${}^{15}N_{\text{compartimento}}$ é a quantidade de ${}^{15}N$ (mg m^{-2}) em excesso em cada compartimento em cada data de coleta; ${}^{15}N_{\text{resíduos}}$ é a quantidade de ${}^{15}N$ (mg m^{-2}) em excesso nos resíduos (folhas, galhos e casca) adicionados no tempo zero. .

A contruição do N derivado dos resíduos para os estoques de N no solo nos primeiros 7 meses foi estimado para cada tratamento conforme eq. 5 (VERSINI et al., 2013):

$$N_{\text{contribuição}} = \%N_{\text{recuperado}} * NR_{\text{conteúdo}} / NC_{\text{conteúdo}}(5)$$

Onde: $N_{\text{contribuição}}$ é a proporção de N (%) numa dada camada de solo derivado a partir dos resíduos inicialmente adicionados; $\% N_{\text{recuperado}}$ é a proporção de ${}^{15}N$ recuperado numa dada camada de solo (eq. 4); $NR_{\text{conteúdo}}$ é conteúdo de N (g m^{-2}) nos resídos adicionados no tempo zero; $NC_{\text{conteúdo}}$ é o conteúdo de N (g m^{-2}) numa dada camada de solo após a adição dos resíduos.

Diferenças nas alturas e diâmetros das plantas nos dois tratamentos aos 14 meses foram testadas por análise de variância com fator duplo (2 tratamentos x 3 blocos). Dentro de cada tratamento, foi realizada uma análise de variância com fator duplo (3 datas x 5 profundidades) para verificar as diferenças nos valores de ${}^{15}N$ ($\delta\%$), concentrações de N (%) e conteúdos de N (g m^{-2}). Em cada data de amostragem, as diferenças entre tratamentos para o conteúdo de ${}^{15}N$ nas frações Og e Of da serapilheira foram testadas pelo teste T de Student. A contribuição do N dos resíduos de cada espécie para sustentar os estoques totais de N nos primeiros 15 cm de profundidade foi testada pelo teste T de Student. Os valores médios foram comparados com teste LSD (Fisher LSD Method). Os valores foram transformados em log quando as variâncias foram não homogêneas. O software utilizado foi SigmaPlot 11.0 (Systat Software, 2008).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Nitrogênio nos resíduos e nas frações da serapilheira

Resíduos de *Acacia* aumentaram em aproximadamente 3 vezes a quantidade de N no sistema (tempo “zero”, Figura 7) em comparação aos resíduos de *Eucalyptus*, e quantidades em média duas vezes maiores foram mantidas ao longo do tempo. O conteúdo de N nos resíduos das duas espécies (folhas, galhos e casca) foi diminuindo com o passar do tempo, enquanto ele foi aumentando nas frações Og e Of da serapilheira. O conteúdo de N diminuiu mais rapidamente com o tempo na fração folhas das duas espécies, como um reflexo das maiores perdas de massa (VERSINI et al., 2013). Embora tenha havido perda de massa em

todos os resíduos adicionados no tempo zero em ambos os tratamentos, houve um incremento nas massas da fração Og e Of da serapilheira, que foram derivadas da serapilheira pré-existente nas parcelas. Devido a isso, as quantidades de N foram aumentadas aos 7 meses para no tratamento com resíduos de *Acacia* e aos 3 e 7 meses no tratamento com resíduos de *Eucalyptus*.

Figura 7 – Conteúdo de N ($\text{g matéria seca m}^{-2}$) nos resíduos (folha, galho e casca) e na camada Og (> 4 mm) e Of (< 4 mm) da serapilheira provenientes de rotação anterior com *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*. Os resíduos foram adicionados no tempo “zero” na mesma semana que ocorreu o plantio de clone de híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. Valores médios seguidos de desvio padrão, sendo N=3 para o tempo “zero” e N=6 para as coletas aos 3 e 7 meses após o plantio

Resíduos e serapilheira de *Acacia* (Figura 8A) apresentaram concentrações de N (%) em média 1,7 vezes maiores do que resíduos e serapilheira de *Eucalyptus* (Figura 8B). Nas duas espécies, galhos e casca tiveram as menores concentrações de N em relação às folhas, sendo também observada pouca variação nas concentrações de N com o passar do tempo. Houve uma elevação das concentrações de N nas folhas após a adição dos resíduos (tempo zero), como resultado de resíduos recém-adicionados que ainda não entraram em processo de decomposição. 3 meses após a adição das folhas no campo, houve uma sutil queda nas concentrações de N, com posterior aumento aos 7 meses. Essas variações poderiam estar relacionadas aos movimentos de saída e entrada de compostos nitrogenados associados à ação de microorganismos como fungos (BACHEGA, 2012; CHEEVER et al., 2013). As concentrações de N associadas às frações Og e Of da serapilheira mostram depender das folhas, haja vista a alta proporção de folhas nessas duas frações.

Resíduos de *Eucalyptus* (Figura 8D) estavam, em média, duas vezes mais enriquecidos com ^{15}N (‰) do que resíduos de *Acacia* (Figura 8C) quando foram aplicados no tempo zero.

Essas diferenças iniciais se devem as maiores quantidades de ^{15}N usadas para obtenção de resíduos de *Eucalyptus* (Tabela 1; Apendice G). Entretanto, as quantidade de ^{15}N (mg m^{-2}) em excesso (eq. 3) nos resíduos de colheita adicionados no tempo “0” foram similares entre os tratamentos, como efeito das maiores quantidades de N nos resíduos de *Acacia*.

Figura 8 – Concentração de N (%) e $\delta^{15}\text{N}$ (‰) nos resíduos (folha, galho e casca) e na camada Og (>4mm) e Of (< 4 mm) da serapilheira provenientes de rotação anterior com *Acacia mangium* (A e C) e *Eucalyptus grandis* (B e D). Valores de controle foram obtidos a partir da serapilheira original da área antes do plantio. Os resíduos foram adicionados no tempo “zero” na mesma semana que ocorreu o plantio de clone de híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. Barra verticais indicam o desvio padrão, sendo N=3 para controle e tempo “zero” e N=6 para as coletas aos 3 e 7 meses após o plantio

Aos 3 meses após a aplicação dos resíduos, ambas frações Og e Of da serapilheira foram mais enriquecidas com ^{15}N no tratamento com resíduos de *Acacia* ($\delta^{15}\text{N}$ = 222 ‰ e 122‰, respectivamente) (Figura 8C), do que com resíduos de *Eucalyptus* ($\delta^{15}\text{N}$ = 185‰ e 49‰, respectivamente) (Figura 8D). O oposto foi observado aos 7 meses, sendo maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$ no tratamento com *Eucalyptus* (Og=788‰ e Of=366‰) do que com *Acacia* (Og=333‰ e Of=192‰). As quantidade de ^{15}N em excesso foram diferentes significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos apenas para a fração Og da serapilheira aos

3 meses após a aplicação de resíduos. Esses padrões, entretanto, indicam que existe uma migração do ^{15}N inicialmente maior (até 3 meses) a partir principalmente das folhas da *Acacia* para as camadas fragmentadas da serapilheira (Og e Of), do que a partir de resíduos do *Eucalyptus*, o qual ocorreu a um prazo mais longo dentro de 7 meses.

A quantidade de ^{15}N (mg^{15}N em excesso) diminuiu mais rapidamente nas folhas de *Acacia* do que nas folhas de *Eucalyptus*. Como pode ser observado na figura 9, aproximadamente 30% do ^{15}N -N inicialmente contido nos resíduos foi recuperado pelas folhas de *Acacia* aos 3 meses após o plantio, ao passo que 43% foi recuperado pelas folhas de *Eucalyptus*. Folhas representam uma porção importante dos resíduos adicionados após o corte das árvores, e constituíram 54% e 57% do N dos resíduos de *Acacia* e *Eucalyptus*, respectivamente (Figura 9).

As proporções do N a partir das frações galho e casca diferiram os tratamentos, e representaram, respectivamente, 29% e 17% do N dos resíduos da *Acacia* e 14% e 29% do N dos resíduos do *Eucalyptus*. Nos dois tratamentos, aproximadamente 76% do N derivado dos resíduos foi recuperado nas folhas (T1= 19%; T2=22%), galhos (T1=10%; T2= 19%), casca (T1=17%; T2= 22%), nas frações Og (T1=6%; T2= 4%) e Of (T1=1%; T2=1%) da serapilheira aos 7 meses após o plantio. Entretanto, aos 3 meses após o plantio uma queda acentuada no valor total de N recuperado em relação aos 7 meses, foi observada no tratamento com *Acacia*, com 63% de N recuperado. Essa queda foi relacionada à menor recuperação do N na fração galhos aos 3 meses do que aos 7 meses, a qual também ocorreu no tratamento com resíduos de *Eucalyptus*, embora numa menor intensidade. Esse valor mais baixo de recuperação do N na fração galhos aos 3 meses pode ser associado ao efeito da mistura de galhos dos resíduos enriquecidos com ^{15}N com a fração galhos da serapilheira remanescente (que estavam com valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$), a qual diluiu as quantidades de ^{15}N e, assim, reduziram em aproximadamente 10-15% o valor total de N recuperado no tratamento com resíduos de *Acacia*.

Figura 9 – Percentual de N recuperado nas folhas, galhos, casca, camadas Og (> 4 mm) e Of (< 4 mm) da serapilheira e por 5 camadas de solo até 15 cm de profundidade, aos 3 e 7 meses após o plantio com clone de híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*, a partir de resíduos de colheita (folhas, galhos e casca) adicionados no tempo “0”, provenientes de rotação anterior com *Acacia mangium* (T1) e *Eucalyptus grandis* (T2). O % de N recuperado foi calculado conforme eq. 4 do Material e Métodos

4.3.2 Nitrogênio no solo

A densidade do solo não foi diferente entre os tratamentos ($p > 0,05$). De maneira geral, houve aumento da densidade do solo com a profundidade, passando de $1,28 \text{ g cm}^{-3}$ (0-2,5 cm) para $1,53 \text{ g cm}^{-3}$ (10-15 cm) nos solos com plantio anterior com *Acacia mangium*, e de $1,40 \text{ g cm}^{-3}$ (0-2,5 cm) para $1,48 \text{ g cm}^{-3}$ (10-15 cm) com *Eucalyptus grandis*.

As concentrações médias de N nos primeiros 15 cm de profundidade de solo foram maiores ($p < 0,05$) no solo com resíduos de *Acacia* (0,048%) (Figura 10 C) do que no solo com

resíduos de *Eucalyptus* (0,044%) (Figura 10 D). Devido a alta variabilidade nas concentrações, não foram verificadas, entretanto, diferenças nas concentrações médias de N em função da profundidade de solo ou em relação às datas de coleta. Entretanto, nas figuras 10D e 10F é possível verificar uma efeito importante dos resíduos de colheita de *Eucalyptus* para elevar as concentrações e as quantidades de N nos primeiros 2,5 cm de profundidade de solo.

As quantidades de N em cada camada de solo foram dependentes da massa de solo, sendo observado nos dois tratamentos que as maiores quantidades de N ($p < 0,05$) ocorreram na camada 10-15 cm de profundidade em relação às demais; e sem diferenças ($p > 0,05$) entre as datas de coleta para uma dada profundidade e para cada tratamento (Figura 10E, 10F).

As mudanças no $\delta^{15}\text{N}$ (‰) observados nas camadas de solo em função do tempo após a adição de resíduos da rotação anterior com *A. mangium* ou *E. grandis* revelam importante diferenças entre os tratamentos (Figura 10 e 11). Aos 3 meses após a adição dos resíduos de *Acacia*, valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram maiores ($p < 0,05$) do que o controle em todas as camadas de solo, sem apresentar diferenças ($p > 0,05$) no $\delta^{15}\text{N}$, contudo, entre camadas (Figura 10A); como também pode ser observado para as quantidades de ^{15}N em excesso (Figura 11). Em contraste, valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram maiores do que o controle apenas entre 0-5 cm de profundidade ($p < 0,05$) após 3 meses da aplicação dos resíduos de *E. grandis*, e uma queda brusca ocorreu, principalmente, abaixo de 5 cm de profundidade, sendo, inclusive, indiferente ($p > 0,05$) do controle (Figura 10B), e menores do que as quantidades de ^{15}N observadas no tratamento com resíduos de *Acacia*. Isso indica que a migração do N derivado dos resíduos ocorre de maneira mais rápida no solo quando resíduos de *Acacia* são usados em comparação aos resíduos de *Eucalyptus*.

Resíduos de *Acacia* foram importantes para manter constantes as quantidades de ^{15}N -N nas camadas de solo até 15 cm de profundidade durante os primeiros 7 meses após o plantio (Figura 11). Em contraste, somente aos 7 meses após a aplicação dos resíduos de *Eucalyptus*, foi possível observar valores mais elevados ($p < 0,05$) de $\delta^{15}\text{N}$ em todas as camadas de solo até 15 cm de profundidade (Figura 10B). Aos 7 meses, entretanto, as quantidades de ^{15}N -N nas camadas de solo abaixo de resíduos de *Eucalyptus* foram mais altas do que aquelas observadas nas camadas de solo abaixo de resíduos de *Acacia*.

Figura 10 - $\delta^{15}\text{N}$ (‰), concentração de N (%) e conteúdo de N ($\text{g camada de solo}^{-1}$) em 5 camadas de solo até 15 cm de profundidade em função do tempo após a adição de resíduos de rotação anterior com *Acacia mangium* (A, C e E) e *Eucalyptus grandis* (B, D e F), e aos 3 e 7 meses após o plantio de clone de híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. O controle se refere a amostras de solo coletadas antes da adição dos resíduos enriquecidos com ^{15}N . Barras horizontais indicam o desvio padrão ($N=3$ para controle, $N=6$ para 3 e 7 meses). Letras diferentes numa mesma curva indicam diferenças estatísticas ($p<0,05$) nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre as camadas de solo; e o asterisco indica diferenças ($p<0,05$) dentro de cada camada de solo com os valores observados no controle (antes da aplicação dos resíduos enriquecidos com ^{15}N).

Figura 11 – Quantidade de ¹⁵N em excesso em 5 camadas de solo até 15 cm e profundidade antes da aplicação de resíduos enriquecidos com ¹⁵N (controle) em tratamentos com manutenção de resíduos de colheita da rotação anterior com *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*, e aos 3 e 7 meses após o plantio de clone de híbrido de *E. grandis* x *E. urophylla*. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças ($p < 0,05$) pelo teste T entre os tratamentos numa dada camada de solo e para um mesmo período de coleta; letras minúsculas diferentes indicam diferenças ($p < 0,05$) pelo teste T entre as datas de coletas numa dada camada de solo e para o mesmo tratamento

O conteúdo de N no solo aumentou com o tempo nos dois tratamentos na camada de 0-15 cm de profundidade, embora, sem diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 12A e B). Apesar disso, ao descontar as quantidades de N acumuladas na camada de 0-15 cm de profundidade aos 3 e 7 meses as quantidades observadas no controle, foi possível perceber que: 1) após uma rotação de *Acacia* e *Eucalyptus*, com manutenção dos resíduos de colheita sobre solo, houve adição 130 kg ha⁻¹ e 80 kg ha⁻¹ de N nos primeiros 15 cm de solo,

repectivamente, até 7 meses após o plantio de novo povoamento de *Eucalyptus*; 2) aos 3 meses após o plantio, havia em média, aproximadamente 40 kg ha⁻¹ a mais de N no solo após uma rotação com *Acacia* em relação a uma rotação de *Eucalyptus*. A contribuição do N dos resíduos da *Acacia* para sustentar os estoques de N nos primeiros 15 cm de solo foi igual entre 3 e 7 meses após o plantio (Figura 12A), e foi maior ($p<0,05$) do que a contribuição dos resíduos de *Eucalyptus* até 7 meses após o plantio (Figura 12B). Em acordo com os achados anteriores, a mais forte contribuição do N derivado dos resíduos do *Eucalyptus* para os estoques de N no solo ocorreu, sobretudo, aos 7 meses após o plantio.

4.3.3 Nitrogênio e crescimento das árvores

As concentrações de N (%) nas folhas recém-expandidas de *Eucalyptus* não foram afetadas ($p>0,05$) pelos tratamentos tanto aos 3 quanto aos 7 meses após o plantio (Figura 13).

Aos 3 meses após o plantio, folhas recém-expandidas de *Eucalyptus* apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) significativamente maiores ($p<0,05$) quando estavam sob influencia de resíduos enriquecidos com ^{15}N de *Acacia* do que sob a influencia de resíduos de *Eucalyptus* (Figura 13). Valores de $\delta^{15}\text{N}$ acima do controle ($p<0,05$) observado nas folhas aos 3 meses após o plantio mostram que *Eucalyptus* absorveram uma parte do N liberado dos resíduos da *Acacia* como mostrado nas figuras 10, 11 e 12. Valores de $\delta^{15}\text{N}$ não estatisticamente diferentes ($p>0,05$) em relação ao controle indicam que as plantas aproveitaram pouco do ^{15}N derivado dos resíduos de *Eucalyptus*. Em contraste, aos 7 meses, os valores de $\delta^{15}\text{N}$ foram maiores que o controle ($p<0,05$) nas folhas de *Eucalyptus* sob a influencia de ambos resíduos da rotação anterior com *Acacia* e *Eucalyptus*. Dessa forma, é possível observar que as plantas estão respondendo as quantidades de N disponibilizadas no solo que foi mais rápida com resíduos de *Acacia* (desde 3 meses) do que com resíduos de *Eucalyptus* (até 7 meses). Futuras análises serão importantes para verificar a contribuição desses resíduos para sustentar a produção de todos os compartimentos da planta.

Figura 13 – Concentração de N (%) e $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em folhas recém-expandidas de clone de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* em função do tempo após o plantio em parcelas com rotação anterior de *Acacia mangium* (T1) e *E. grandis* (T2). Amostra controle foram feitas aos 3 e 7 meses a partir de 30 plantas por tratamento fora das parcelas com aplicação de resíduos. Barras verticais indicam o desvio padrão (N=6). Letras diferentes numa mesma data indicam diferenças ($p<0,05$) dos valores $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas recém-expandidas em função do tratamento pelo teste T; o asterisco indica diferenças ($p<0,05$) observadas valores $\delta^{15}\text{N}$ em cada tratamento e data em relação ao controle, usando teste T unilateral

Aos 14 meses após o plantio, pequenas diferenças no crescimento em altura e diâmetro das árvores de *Eucalyptus* foram observadas entre os tratamentos (Figura 14A), entretanto, sem diferenças estatísticas. O valor máximo e mínimo para da altura foi 8,4 m e 2,5 m e 7,8 m e 1,8 m para as plantas crescendo com manutenção de resíduos de *Acacia* e *Eucalyptus*, respectivamente. Aos 14 meses a mortalidade das árvores foi inferior a 3%, independente do tratamento, e houve aproximadamente 5% de replantio no primeiro mês.

Aos 14 meses foram ajustadas equações alométricas para posteriormente estimar a biomassa de folhas, galhos, casca e madeira das plantas nas parcelas e por hectare. A figura 14 B mostra a distribuição da biomassa desses compartimentos em cada um dos tratamentos. A biomassa por hectare foi similar ($p>0,05$) entre os tratamentos e a biomassa foi maior para madeira, seguidas de folhas, galhos e casca.

Figura 14 - Altura e diâmetro a 1,3 m (A) e biomassa de folhas, galhos, casca e madeira (B) dos *Eucalyptus* aos 14 meses após o plantio em função do tratamento testado (T1 – Rotação anterior com *Acacia mangium*; 2 - Rotação anterior com *Eucalyptus grandis*). As barras verticais indicam o desvio padrão na figura A ($n=240$) e na figura B ($n=27$). Não foram observados diferenças estatísticas ($p>0,05$) pelo teste T no crescimento e biomassa entre os tratamentos

Além disso, uma distribuição similar das proporções de folhas, galhos, casca e madeira por árvore (Figura 4.1 no Anexo C) foram observadas para cada tratamento. A biomassa média de todos os compartimentos (menos raízes finas) das árvores nas parcelas com substituição de resíduos, também foi semelhante entre os tratamentos (Figura 4.3 no Anexo C). A densidade de raízes finas das árvores também foi semelhante entre os tratamentos e, em média, as árvores mantiveram 86% das raízes finas nos primeiros 15 cm de solo e 14% na camada de 15-50 cm de profundidade (Figura 4.4 no Anexo C).

4.4 Considerações finais

Os resultados, ainda que preliminares, já fornecem informações importantes sobre o efeito dos resíduos na manutenção dos estoques de N no solo e na nutrição das árvores. Resíduos de *Acacia* contribuíram mais rapidamente e com maior intensidade para sustentar os estoques de N na camada superficial de solo (0-15 cm de profundidade). Foi detectado ^{15}N nas folhas recém-expandidas desde os 3 meses após o plantio do *Eucalyptus* no tratamento que envolveu resíduos de colheita de *Acacia*, indicando mais rápida absorção do ^{15}N derivado dos resíduos. Esse N absorvido pode ter resultados da lixiviação de N em formas inorgânicas ou orgânicas (moléculas de baixo peso molecular, e.g. aminoácidos, peptídeos) a partir, principalmente, das folhas, como foi observado por Versini et al. (2013) em estudo similar usando somente resíduos de *Eucalyptus*. Estudos anteriores mostraram que formas orgânicas e inorgânicas de N podem ser absorvidas pelos *Eucalyptus* (WARREN, 2006). Essa rápida absorção de N pelos *Eucalyptus* antes mesmo dos 3 meses de idade poderia, dessa forma, prevenir uma perda inicial de N derivado dos resíduos da *Acacia*.

Versini et al. (2013) observou que houve um aumento dos fluxos de N dissolvido na solução do solo até 50 cm de profundidade antes dos 5 meses após plantio de *Eucalyptus* com manutenção resíduos (folhas, galhos e casca) de colheita da rotação anterior com mesma espécie; sendo que o pico de enriquecimento com ^{15}N a 50 cm de profundidade foi observado aos 10 meses. Os autores mostraram que o N dissolvido lixiviado a partir dos resíduos tem uma contribuição ativa na nutrição dos *Eucalyptus* durante o primeiro ano. Aqui, foi mostrado que o N derivado dos resíduos do *Eucalyptus* foi parcialmente alocado nos primeiros 5 cm de profundidade de solo até o terceiro mês, não sendo encontrada diferenças nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre folhas recém-expandidas coletadas aos 3 meses e o controle. Isto indica que, os resíduos da rotação anterior com *Eucalyptus* contribuíram pouco para a nutrição direta das árvores da rotação seguinte; entretanto, foi encontrado que o N dos resíduos de *Eucalyptus* contribuíram mais diretamente para a nutrição da rotação seguinte até 7 meses de idade.

Análises de N e ^{15}N nos compartimentos da biomassa das plantas aos 14 meses, além da biomassa microbiana, das frações da matéria orgânica do solo e das amostras de água lixiviada no solo, serão importantes para entender melhor o caminho do N após a decomposição dos resíduos de colheita *Acacia* e *Eucalyptus*. Análises das quantidades de N e ^{15}N presentes na água interceptada logo abaixo da serapilheira e a 15 cm de profundidade poderão revelar se houveram perdas potenciais de N. Além disso, Versini et al. (2013) verificou que o transporte de matéria orgânica particulada foi importante para manter os estoques de N nos primeiros 15 cm de solo. O monitoramento do N e ^{15}N nas frações da

matéria orgânica em idades mais avançadas desse estudo será importante para diferenciar os estoque de N no solo e os fluxos de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ entre as frações em função dos tratamentos testados. Novas análises aos 24 meses poderão, dessa forma, ser úteis para diferenciar os tratamentos e propor estratégias para o manejo, devido ao início de uma competição mais forte pelos recursos de crescimento, com potencial impacto dos resíduos de *Acacia* que possuem maiores quantidades de N do que resíduos de *Eucalyptus*.

Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. Anual estatístico da ABRAF 2013 ano base 2012. Brasília. 148p.
- BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L. Fertilização e correção do solo para o plantio de eucalipto. In: BARROS, N.F.; NOVAIS, R.F. (Ed.). **Relação solo-eucalipto**. Folha de Viçosa, Viçosa, MG. 1990. p.127-186.
- BACHEGA, L.R. **Efeito das espécies na decomposição da serapilheira e na transferência de N entre folhas em plantios mistos de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium***. 2012. 107p. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) -Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- BARLOW, J.; GARDNER, T.A.; FERREIRA, L.V.; PERES, C.A. Litter fall and decomposition in primary, secondary and plantation forests in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 247, p. 91–97, 2007.
- BINI D.; SANTOSA C.A.; BOUILLET J-P. ; GONÇALVES J.L.M.; CARDOSO E.J.B.N. *Eucalyptus grandis* and *Acacia mangium* in monoculture and intercropped plantations: Evolution of soil and litter microbial and chemical attributes during early stages of plant development. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 63, p. 57–66, 2013.
- BOUILLET, J-P.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; VOIGTLAENDER, M.; GAVA, J.; LEITE, F.P.; HAKAMADA, R.; MARESCHAL, L.; MABIALA, A.; TARDY, F.; LEVILLAIN, J.; DELEPORTE, P.; EPRON, D.; NOUVELLON, Y. *Eucalyptus* and *Acacia* tree growth over entire rotation in single- and mixed-species plantations across five sites in Brazil and Congo. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 89-101, 2013.
- CREWS, T.E.; PEOPLES, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 279-297, 2004.
- CUSACK, D.F.; CHOU, W.W.; YANG, W.H.; HARMON, M.E.; SILVER, W.L. Controls on long-term root and leaf litter decomposition in neotropical forests. **Global Change Biology**, Oxford, v. 15, p. 1339–1355, 2009.
- FORRESTER, D.I.; BAUHUS, J.; COWIE, A.L.; VANCLAY, J.K. Mixed-species plantations of *Eucalyptus* with nitrogen-fixing trees: A review. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 233, p. 211–230, 2006.

GALLOWAY, J.N. The global nitrogen cycle: changes and consequences. **Environmental Pollution**, London, v. 102, p. 15–24, 1998.

GILBERT, N. Environment: The disappearing nutrient. **Nature**, London, v. 461, p. 716-718, 2009.

GONÇALVES, J.L.M., STAPE, J.L., LACLAU, J-P., SMETHURST, P., GAVA, J.L. Silvicultural effects on the productivity and wood quality of *Eucalyptus* plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 193, p. 45–61, 2004.

GONÇALVES, J.L.M.; STAPE, J.L.; LACLAU, J-P.; BOUILLET, J-P.; RANGER, J. Assessing the effects of early management on long-term site productivity of fast-growing eucalypt plantations: the Brazilian experience. **Southern Forests: a Journal of Forest Science**, Grahamestown, v. 70, p. 105–118, 2008.

GONÇALVES, J.L.M. Fertilização de plantação de eucalipto. In: GONÇALVES, J.L.M.; PULITO, A.P.; ARTHUR JÚNIOR, SILVA, L.D. (Ed.). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SILVICULTURA, 2011. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: PTSM/IPEF/ESALQ/FUPEF, 2011. p. 85-114.

GONÇALVES, J.L.M.; ALVARES, C.A.; FERRAZ, S.F.B.; LIMA, W.P.; HIGAE, A.R.; SILVA, L.D.; ALFENAS, A.C.; STAHLH, J.; BRANCALIONI, P.H.S.; HUBNER, A.; BOUILLET, J.P.; LACLAU, J.P.; NOUVELLON, Y.; EPRON, D., 2012. Joining genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in eucalypt plantations of Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 301, p. 6-27, 2013.

ITTO. **Encouraging Industrial Forest Plantations in the Tropics**. Report of a global study. The International Tropical Timber Organization, Technical Series, n. 33, 2009.

LACLAU, J-P., RANGER, J., GONÇALVES, J.L.M., MAQUERE, V., KRUSCHE, A., M'BOU, A., NOUVELLON, Y., SAINT-ANDRE, L., BOUILLET, J-P, PICCOLO, M.C., DELEPORTE, P. Biogeochemical cycles of nutrients in tropical *Eucalyptus* plantations. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 259, p. 1771–1785, 2010.

NAMBIAR, E.S. Site Management and Productivity in Tropical Plantation Forests. Proceedings of Workshops in Piracicaba (Brazil) 22–26 November 2004 and Bogor (Indonesia) 6–9 November 2006. Bogor, Indonesia, Centre for International Forestry Research. 237 p. 2008.

RACHID, C.T.C.C.; BALIEIRO, F.C.; PEIXOTO, R.S.; PINHEIRO, Y.A.S.; PICCOLO, M.C.; CHAER, G.M.; ROSADO, A.S. Mixed plantations can promote microbial integration and soil nitrate increases with changes in the N cycling genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 66, p. 146-153, 2013.

SYSTAT SOFTWARE, Inc. SigmaPlot for windows, Version 11.0. 2008

SWANSTON, C.W.; MYROLD, D.D. Incorporation of nitrogen from decomposing red alder leaves into plants and soil of a recent clearcut in Oregon. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 27, p. 1496-1502, 1997.

VANCE E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. Microbial biomass measurements in forest soils: The use the chloroform fumigation-inocubation method in strongly acid soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 697-702, 1987.

VERSINI, A.; ZELLER, B.; DERRIEN, D.; MAZOUIMBOU, J-C.; MARESCHAL, L.; SAINT-ANDRE, L.; RANGER, J.; LACLAU, J-P. The role of harvest residues to sustain tree growth and soil nitrogen stocks in a tropical *Eucalyptus* plantation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 376, p. 245–260, 2013.

VOIGTLAENDER, M.; LACLAU, J-P.; GONÇALVES, J.L.M.; PICCOLO, M.C.; MOREIRA, M.Z.; NOUVELLON, Y.; RANGER, J.; BOUILLET, J-P. Introducing *Acacia mangium* trees in *Eucalyptus grandis* plantations: consequences for soil organic matter stocks and nitrogen mineralization. **Plant and Soil**, The Hague, v. 352, p. 99–111, 2012.

WARREN, C.R. Potential organic and inorganic N uptake by six *Eucalyptus* species. **Functional Plant Biology**, Collinwood, v. 33, p. 653–660, 2006.

ZELLER, B.; COLIN-BELGRAND, M.; DAMBRINE, E.; MARTIN, F.; BOTTNER, P. Decomposition of ¹⁵N-labelled beech litter and fate of nitrogen derived from litter in a beech forest. **Oecologia**, London, v. 123, n. 4, p.550–559, 2000.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A. mangium pode atuar como espécie facilitadora para os *Eucalyptus* em solos tropicais inférteis. Nos capítulos 2 e 3 foi mostrado que quando *Acacia* estava associada ao *Eucalyptus*, ela pode fixar N_2 e transferir N muito rapidamente (dias e semanas) por mecanismos que ocorrem abaixo do solo (e.g. exsudados radiculares, turn over de raízes muito finas, com ou sem auxílio de redes de micorrizas em comum). Uma transferência de N a partir de folhas, galhos e casca de *Acacia* depositados sobre o solo ocorre em mais longo prazo (meses e anos). Auxiliada pela fixação biológica do N_2 , *Acacia mangium* enriqueceu de N seus tecidos, os quais puderam aumentar em cerca de 2-3 vezes mais as entradas de N no sistema via resíduos de colheita após uma rotação com monocultivo em comparação ao *Eucalyptus*, como foi mostrado no capítulo 4. Entretanto, a competição com *E. grandis* (principalmente pela água e luz) limitou o crescimento da *A. mangium* após 24 meses nos plantios mistos com mesma densidade de plantas (50% E vs. 50% A). Dessa forma, é possível prever que por causa do menor crescimento da *Acacia* devido às condições climáticas sub-ótimas para o crescimento dela, mas ótimas para o crescimento do *Eucalyptus*, limitará as entradas de N no sistema via deposição da serapilheira.

Foi observado no capítulo 2 que *E. grandis* associado com *A. mangium* produziu mais folhas e mais madeira por unidade de árvore do que em monocultivo. Assim, *A. mangium* poderia ser usada como fonte de N e para proteção do solo, quando os plantios de *Eucalyptus* tem como destino final a produção de extrativos a partir das folhas e/ou madeira em tora. Nesse contexto, as plantações mistas poderiam ser estabelecidas com densidades mais altas da espécie de maior interesse, no caso o *Eucalyptus* e o manejo poderia envolver desbaste das árvores de *Eucalyptus*. No ponto de vista prático sobre a promoção da fixação do N pelas *Acaciae* redução de fertilizações nitrogenadas, os resultados gerados no capítulo 2 sugerem que a alternância de monocultivos (5-7 anos) de *Acacia mangium* e *Eucalyptus* deve ser mais promissora para promover a fixação pela *Acacia*. *Eucalyptus* poderiam beneficiar das maiores quantidades de N no solo após uma rotação com *Acacia* enquanto *Acacia* fixa mais N após uma rotação com *Eucalyptus*.

Os resultados do primeiro ano do estudo mostrado no capítulo 4 indicaram que as plantas de *Eucalyptus* puderam aproveitar do N derivado dos resíduos da *Acacia* desde os 3 meses de idade, enquanto, os resíduos de *Eucalyptus* mostraram para contribuir para a nutrição das árvores até 7 meses de idade. Resíduos de *Acacia* contribuíram mais do que resíduos de *Eucalyptus* para os estoques de N nos primeiros 15 cm de profundidade de solo. Durante os 7 primeiros meses de plantio, as quantidades de N na camada 0-15 cm foram

aumentadas, em pelo menos 50 kg ha⁻¹ após uma rotação com manutenção de resíduos de *Acacia* em comparação com uma rotação com *Eucalyptus*.

No capítulo 3 foi mostrado que uma árvore dominante de *Acacia mangium* pode transferir N abaixo do solo em um curto período de tempo para pelos *Eucalyptus grandis* dentro de um raio de 6,2 m a partir da *Acacia* doadora de N. As quantidades de N não devem ser desprezíveis se considerado o número de árvores de *Acacia* num hectare (que no estudo foram 1111 árvores) e para o total anual de N potencialmente transferido por elas. Embora sejam ainda necessários novos estudos envolvendo a transferência a partir de árvores pequenas e médias de *Acacia*, bem como ao longo do ano, esse estudo pode fornecer resultados práticos. Por exemplo, de que árvores de *Eucalyptus* podem absorver N em grandes distâncias horizontais, e que uma diminuição do número de *Acacia* em relação ao número de *Eucalyptus* poderia não inibir a facilitação pela transferência de N em curto prazo e abaixo do solo, se árvores de *Eucalyptus* estiverem a no mínimo 6 m de distancia de árvores de *Acacia*. Além disso, foi observado que a transferência de N abaixo do solo ocorreu principalmente numa área em torno de 21 m² ao redor da *Acacia* (aos 26 meses de idade), sendo importante para os casos onde árvores de *Acacia mangium* são utilizadas em sistemas agroflorestais.

O melhor conhecimento das interações competitivas e facilitativas envolvendo leguminosas e *Eucalyptus* facilitará a implantação e manejo de novas plantações mistas a fim de aumentar a geração de produtos florestais e os ganhos ambientais, com menor uso de fertilizantes. Sobre um ponto de vista prático, a escolha de espécies em função de sua adaptação as condições edafoclimáticas do sítio é essencial. O crescimento inicial forte das árvores leguminosas promovido pela fixação do N₂ pode trazer benefícios para as plantas de *Eucalyptus* nos primeiros anos de plantio onde a demanda de N do solo é mais forte. O uso final da produção e o retorno financeiro para cada espécie poderá dirigir a estratégia de manejo, de forma a minimizar a competição sobre a espécie de maior interesse. Leguminosas e outras plantas com capacidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de N₂ e micorrizas (ambas as micorrizas arbusculares e ectomicorrizas) exercem um importante papel dentro de ecossistemas naturais e plantações, por exemplo, pela capacidade de melhorar a ciclagem de vários nutrientes e aumentar a biodisponibilidade, principalmente de N, o qual é essencial para o crescimento das plantas em associação, mas tem um custo econômico e ambiental alto. Leguminosas arbóreas poderiam ser introduzidas em plantações florestais com espécies do gênero *Eucalyptus* ou outras, tais como *Tectona grandis*, *Hevea brasiliensis*, *Pinus* para promover a intensificação ecológica e a facilitação sem, entretanto, limitar o crescimento da planta de maior interesse. No presente estudo foi mostrado que a facilitação da

A. mangium sobre o *Eucalyptus* ocorre mesmo que em condições ambientais pouco favoráveis ao crescimento da *A. mangium*. Adicionalmente, é esperada uma intensificação desses processos facilitativos à medida que as espécies facilitadoras estejam mais adaptadas às condições locais. Esse estudo apresenta diversas técnicas adaptadas às condições de campo e de laboratório para o estudo da facilitação em plantações florestais tropicais com inclusão de árvores fixadoras de nitrogênio para, futuramente, auxiliar na compreensão dessa interação ecológica em outras condições ambientais e, assim, definir melhor as práticas de manejo para promover a produção sustentada das plantações florestais tropicais crescendo em solos inférteis.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Fixação não simbiótica mensurados através da atividade de redução do acetileno em 4 compartimentos (folhas, casca, serapilheira e solo) a partir de plantações monoespecíficas e mistas de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*, em Itatinga, SP.

A técnica de redução do acetileno (ARA¹) foi usada para a determinação da atividade da enzima nitrogenase (e fixação do N) em bactérias de vida livre presentes nas folhas, casca, serapilheira e solo. O ensaio foi realizado entre os dias 8 e 12 de janeiro de 2013 (no verão), quando as plantas estavam com aproximadamente 39 meses de idade. Em cada tratamento, foram selecionados de acordo com a distribuição em classes de área basal, 4 plantas por espécie e tratamento. Em cada planta selecionada, foram amostradas folhas e casca, e a camada de serapilheira e solo próximo ao fuste. Foram recuperados 24 folhas por planta, sendo 8 folhas em cada terço da copa, distribuídas geograficamente (norte, sul, leste e oeste). De cada planta, foi removida a casca circundante ao fuste com 5 cm de largura, na altura da base e a 1/8, 3/8, 5/8 e 7/8 da altura total da planta. A camada de serapilheira foi removida com auxílio de um coletor circular (22 cm de diâmetro), sendo dispostos a 10 cm da base de cada planta e geograficamente distribuídos. Nos mesmos pontos de coleta de serapilheira, foi recuperado o solo na profundidade de 0-10 cm com auxílio de um cano de PVC com 5 cm de diâmetro. As amostras foram incubadas em frascos de vidro com 250 ou 1000 ml (dependendo da quantidade de amostra) e hermeticamente fechados. Nos frascos contendo amostras foram removidos 10% do volume e, em seguida injetado o acetileno na mesma proporção (volume:volume) com auxílio de seringa e agulha. As amostradas foram incubadas por aproximadamente 12 horas em temperatura ambiente, as quais variaram entre 21,5 e 25,6 °C. Após o período de incubação, 10% do volume do frasco (100mL) foram removidos e injetadas em frascos de aproximadamente 50 mL previamente lacrados e sob vácuo. Após a incubação, as amostras vegetais foram secas em estufa a 65 °C até peso constante e as amostras de solo foram secas a 105 °C. A concentração de etileno (ppm) formado após a redução do acetileno injetado inicialmente, foi determinada por cromatografia. 1 mL de gás foi injetado no cromatógrafo (Thermo Scientific), equipado com detector de ionização de chama (a 250 °C) e coluna N Poropak (120 °C), Supelco, Bellefonte, Pensilvânia, EUA). A concentração de etileno também foi determinada em frascos sem amostras usadas como controles.

¹SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER E.; R. MARGESIN. 1995. Methods in soil biology. Springer: Berlin, p 425.

Figura 1 – Quantidade de etileno produzido (nmol g⁻¹ h⁻¹) por bactérias de vida livre presentes em folhas, cascas, serapilheira e solo de plantações monoespecíficas de *E. grandis* (100E), *A. mangium* (100A) e plantio misto (50E:50A)

APÊNDICE B - Uma metodologia para detectar em condições controladas a ocorrência de colonização ectomicorrizica em *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*

- I. O estudo foi realizado durante o estágio no exterior e foi conduzido em condições controladas no UMR-LSTM (Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes) localizado em Montpellier, França. Foram utilizadas mais de 20 espécies de ectomicorizas isoladas em diferentes ecossistemas, provenientes de 3 coleções de fungos localizadas no UMR-Eco&Sols, no UMR-LSTM e no INRA-Nancy. As culturas foram mantidas dentro de câmara escura com temperatura de 25 °C e em meio “MNM” remodificado com as seguintes concentrações: KH_2PO_4 , 1 g; MgSO_4 , 0,5 g; tartarato de amônio, 0,5 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mL (a partir de solução mãe a 0,2 % em destilada); citrato de ferro, 0,5 mL (a partir de solução mãe a 1 % em água destilada); cloridrato de tianina, 1 mL (a partir de solução mãe com 0,005 g em 100 mL de água destilada); glucose, 20 g; extrato de levedura, 0,5 g; caseína hidrolisada, 0,23 g; ágar, 20 g; água destilada, 1000 mL. O pH da solução foi ajustada entre as faixas 5,5-5,7, usando KOH ou HCl, e posteriormente o meio foi autoclavado à 120 °C por 20 min.
- II. Sementes de *E. grandis* e *A. mangium* foram esterilizadas com peróxido de hidrogênio 120 vol e germinadas sobre placas de Petri. Para o procedimento de esterilização foram utilizadas por espécie, uma colher de chá, uma pinça, dois béqueres de 120 mL, ~ 80 mL de água destilada (todos autoclavados à 120 °C por 20 min.) e ~ 80 mL de peróxido de hidrogênio 120 vol à temperatura ambiente. A esterilização foi executada dessa forma: 1) as sementes foram depositadas na colher de chá e inseridas no primeiro béquer contendo peróxido de hidrogênio, por 5 min e, em seguida; 2) as sementes foram inseridas no segundo béquer contendo água destilada, por 2 min. Especificamente para as sementes de acácia, foi feita a quebra de dormência antes da esterilização, sendo as sementes inseridas dentro de béquer contendo 100 mL de água fervente (100 °C), por 2 min. Após a esterilização, as sementes foram transferidas para placas de Petri, e sobre elas depositado ~ 25 mL de meio estéril (Água + Ágar – 15g/L, com temperatura entre 40-50 °C).
- III. As sementes foram germinadas em câmara de crescimento com 16 h de luz, 27 °C de temperatura ao dia e 23 °C a noite, 80 % de umidade relativa do ar. A eficiência do procedimento de esterilização foi testada previamente, depositando as sementes em meios de cultura para crescimento de fungos (MNM) e bactérias YMB (Yeast rabbitol broth). Essa técnica foi eficiente para germinar até 1 g (quantidade máxima usada) de sementes em meio estéril. No caso das sementes do *E. grandis*, não é necessário fazer a separação entre sementes e resíduos (porque pode ser demorado devido ao tamanho reduzido das sementes),

sendo encontrado que a proporção de resíduos chegou a ser 80 % do peso total. O peso médio de 50 sementes (sem resíduos) de *A. mangium* é de aproximadamente 0,5 g e de *E. grandis* 0,0083 g, e a taxa de germinação encontrada após 4 dias foi de aproximadamente 76% para *A. mangium* e 81 % para *E. grandis*.

- IV. Sementes de *A. mangium* foram inoculadas com a bactéria AUST 13C (*Bradyrhizobium* sp.) para promover a fixação de nitrogênio. A bactéria foi cultivada em placas de petri com o meio YMB com as seguintes concentrações: Manitol, 10 g; K₂HPO₄, 0,5 g; MgSO₄ 7H₂O, 0,2 g; NaCl, 0,1 g; extrato de levedura, 0,5 g; ágar, 20g; água destilada, 1000 mL. O pH da solução foi ajustado para 6,8 usando HCl, e autoclavada à 120 °C por 20 min. Posteriormente, a bactéria foi replicada em potes contendo 100 mL de YMB líquido. Após 4 dias, as sementes germinadas foram misturadas ao meio com bactéria dentro de placas de Petri, por 5 min.
- V. Tubos de ensaio foram utilizados como locais de crescimento das plantas e organismos. A base do método consiste em tubos de ensaio (comprimento= 25 cm; largura= 2,5 cm) com tampa e papel para germinação de sementes (comprimento= 13 cm; largura= 3 cm). Em uma das extremidades do papel são feitas duas dobras do tipo sanfona e, com auxílio de um cortador, abertos na segunda dobra, dois orifícios com aproximadamente 2 cm de distancia entre eles. Posteriormente, os papéis são depositados no interior dos tubos de ensaio, que são fechados com a tampa e autoclavados à 120 °C por 20 min.
- VI. As mudas recém-germinadas são adicionados nos orifícios feitos no papel de germinação, que continham previamente meio MNM e a espécie de ectomicorriza. A ectomicorriza estava crescendo por aproximadamente 1-2 semanas antes de adicionar as mudas. O meio MNM pode ser substituído por um meio de cultura para plantas, se possível com menores concentrações de N para promover a fixação pela *A. mangium*. A metodologia permitiu boa visualização do sistema radicular de ambas às espécies, e acompanhar a formação dos nódulos nas raízes das acácias e o desenvolvimento das hifas e o contato com as raízes (Figura 1 e 2).
- VII. Foi observado que a formação dos nódulos nas raízes da *A. mangium* ocorreram após 20-30 dias da inoculação. O meio MNM nas concentrações usadas visualmente diminuíram a quantidade de nódulos. Foi encontrado que a micorrização ocorreu entre 45-60 dias. Nesse período é importante conferir ou mesmo substituir o meio de planta. No fim de 60 dias foram feitos micro cortes nas raízes para visualização em microscópio de fluorescência (Figura 3a e 4A). Nesses cortes foram observados a presença de redes de Hartig entre as células do córtex radicular (Figura 3b e 4b).

Figura 1 – Mudanças com aproximadamente 45 dias de *E. grandis* e *A. mangium* e uma espécie de *Pisolithus* sp, com mudas de *A. mangium* inoculadas com *Bradyrhizobium* sp para promover a fixação do N. O meio MNM adicionado ao tubo e os nutrientes estavam em contato com o papel de germinação

Figura 2 – Mudanças com aproximadamente 30 dias de *E. grandis* e *A. mangium* e ectomicorriza *Scleroderma dictyosporum*, com *A. mangium* inoculadas com *Bradyrhizobium* sp para promover a fixação do N. O meio MNM adicionado ao tubo e os nutrientes estavam em contato com o papel de germinação

Figura 3 – Raízes de *A. mangium* inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. para promover a fixação do N, aos 90 dias do início do experimento com adição de *Pisolithus* sp. (a) e imagens com microscopia de fluorescência a partir de cortes transversais de raízes de *A. mangium* (b). São observadas as redes de Hartig em coloração azul ocupando os espaços entre as células do córtex (com tons de vermelho). No exterior do córtex é observado alta ocupação pelas hifas

Figura 4 – Raízes de *E. grandis* aos 90 dias do início do experimento com adição de *Pisolithus* sp. (a) e imagens com microscopia de fluorescência a partir de cortes transversais de raízes de *E. grandis* (b). São indicadas as redes de Hartig ocupando os espaços entre as células do córtex

APÊNDICE C - Metodologia de instalação de coletores da água que escorre pelo tronco e de precipitação interna, e procedimentos de amostragem e análises de laboratório

O escoamento pelo fuste (stemflow - ST) e a precipitação interna (throughfall - TH) foram mensurados em 2 blocos. O ST consistiu numa canaleta criada a partir de mangueira de borracha que foi acoplada (usando um arame e silicone) ao fuste na forma de espiral, sendo o conectada a um tambor de 20 L (Figura 1). O TH consistiu de 4 funis (área= 0,0314 m² por funil) distribuídos em ¼ da área útil da planta, sendo conectados a um tambor de aproximadamente 40 L. Coletas foram realizadas no dia posterior a cada chuva, sendo mensurado o volume de água presente em cada tambor e, retirada uma alíquota de 0,5 L que posteriormente foi congelada até o momento das análises de laboratório. Nas amostras de água foram analisados os teores de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ em analisador por injeção de fluxo (FIA) no laboratório de isótopos estáveis do CENA-USP. Análises de ¹⁵N foram realizadas após extração do N-NH₃ e N-NO₃⁻ pelo método da difusão². O método consiste: Em um vidro hermeticamente fechado, 100 mL da solução contendo N-NH₄⁺ é alcalinizada a pH>10 (com MgO calcinado) para que ocorra a conversão para N-NH₃. A metodologia para determinação do N e ¹⁵N na forma de NO₃⁻ foi de forma semelhante, mas aplicando Liga de Devarda juntamente ao MgO calcinado. A captura do N/¹⁵N da solução foi efetuada através de um coletor (“pastel”= filtro de fibra de vidro + ácido – KH₂SO₄ 2,5 molar – 10 microlitros por filtro, envolvido por uma membrana impermeável a água – PTFE, mas permeável a NH₃ - estado gasoso) que foi adicionado antes de passar por um agitador durante 48 horas (100 rpm). Posteriormente, os filtros foram pesados, e o ¹⁵N analisado no espectrômetro de massas.

² D'ANDRÉA, M.S.C. Técnica de diluição do isótopo ¹⁵N para determinação da amonificação e nitrificação brutas de N em solos cultivados com cana-de-açúcar e braquiária. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014. 109 p.

Figura 1 – Coletores de água que escorre pelo fuste (stemflow-ST) e de precipitação interna (throughfall -TH). Ao longo de 60 dias de avaliação, as concentrações médias de N-NH_4^+ foram $0,21 \text{ mgL}^{-1}$ (ST) e $0,67 \text{ mgL}^{-1}$ (TH); e N-NO_3^- foram $0,17 \text{ mgL}^{-1}$ (ST) e $0,24 \text{ mgL}^{-1}$ (TH). Valores de abundância natural do ^{15}N foram similares para ST e TH, com $-4,5 \delta (\text{‰})$

APÊNDICE D - Metodologia para avaliação da volatilização de amônia pelas folhas em plantações mistas de *Eucalyptus* e *Acacia*

A volatilização de NH_3 foi mensurada em 1 bloco. Foram instalados 8 captadores de amônia (NH_3), sendo 4 no terço médio e 4 no terço superior da copa (Figura 1). Cada captador foi composto por uma espuma (diâmetro= 15 cm) acoplada há uma caixa quadrada de PVC (largura= 14 cm). Cada espuma foi embebida com 30 mL de solução fixadora (Ácido fosfórico 0.5 mols L^{-1} + glicerina 0.05 L L^{-1}) e as coletas foram realizadas semanalmente. Após o contato da NH_3 com a solução fixadora ocorre à conversão de NH_3 em NH_4^+ devido ao meio ácido da solução. A distância entre captadores em cada terço da copa foi de aproximadamente 1,5 m no sentido da entre linha e 1,4 m no sentido da linha de plantio, com 2.0 m de altura entre terços. Foi extraído, a cada coleta, o conteúdo de 4 espumas que representavam cada terço da copa. Para extração, as espumas foram mergulhadas em 500 mL de água destilada em um becker e friccionadas por, aproximadamente 1 minuto para que houvesse um equilíbrio entre as concentrações de NH_4 na espuma e água. O peso final foi mensurado e o líquido congelado até o momento das análises no laboratório. A metodologia para determinação do N e ^{15}N foi apresentada no Apêndice A, sendo determinadas somente as concentrações de N e ^{15}N na forma de NH_4 porque, nesse caso, houve conversão do NH_3 a NH_4^+ devido ao meio ácido do ácido fosfórico.

Figura 1 – Coletores de NH_3 instalados no terço médio (TM) e superior (TS) de árvore de *Acacia mangium*. Ao longo de 60 dias de avaliação, as concentrações médias de N (%) foram 1,2% (TM) e 0,7% (TS) e os valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) foram -18,7‰ (TM) e -21,4‰ (TS)

APÊNDICE E - Concentração de N (% $\pm$ SE) nos compartimentos das plantas e no solo rizosférico durante os 60 dias de experiência numa plantação mista de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* com 2,6 meses de idade (Março-Maio, 2012)

Compartimentos	Concentração de N (%)			
	<i>Acacia mangium</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>		
	Doadora	n	Recebedor	n
Folhas recém-expandidas	3,60 $\pm$ 0,06	25	2,27 $\pm$ 0,02	144
Folhas	2,40 $\pm$ 0,02	3	1,86 $\pm$ 0,03	9
Galhos	0,79 $\pm$ 0,07	3	0,30 $\pm$ 0,04	9
Madeira	0,21 $\pm$ 0,01	3	0,09 $\pm$ 0,00	9
Casca	1,06 $\pm$ 0,03	3	0,25 $\pm$ 0,00	9
Toco + raízes grossas (>1cm)	1,41 $\pm$ 0,31	3	0,22 $\pm$ 0,03	6
Raíz média (0,03-0,1 cm)	0,96 $\pm$ 0,07	3	0,29 $\pm$ 0,03	6
Raíz fina (<0,03 cm)	2,25 $\pm$ 0,04	48	0,77 $\pm$ 0,02	48
Solo rizosférico	0,07 $\pm$ 0,01	41	0,07 $\pm$ 0,01	42
Solo <i>Acacia</i> e <i>Eucalyptus</i>	0,06 $\pm$ 0,01	64		

APÊNDICE F - Valores de abundância natural do $\delta^{15}\text{N}$ (‰) encontrados em compartimentos acima e abaixo do solo de plantações florestais mistas de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* aos 28 meses após o plantio (descrição no capítulo 3, e apêndices C e D). Amostras foram coletadas no mês de março de 2012, com 3 repetições por amostra vegetal e solo, e uma repetição para amostras de água ou de volatilização de NH_3

APÊNDICE G– Aplicação de ^{15}N como sulfato de amônio via o fuste de *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis* e enriquecimento em ^{15}N nos tecidos acima do solo

O ^{15}N foi aplicado com a mesma metodologia utilizada para o estudo sobre a transferência de N em curto prazo (Capítulo 3). No entanto, ao invés de utilizarmos nitrato de potássio foi utilizado sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com 99,98% átomos de ^{15}N . Na tabela 1 são apresentadas as concentrações de N total (%) e as respectivas abundâncias de ^{15}N expressos em $\delta\text{‰}$ em diferentes compartimentos das árvores de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium*, amostradas entre dois (*Eucalyptus*) e quatro meses (*Acacia*) após a aplicação do ^{15}N . Esse estudo foi realizado visando à obtenção de resíduos (folhas, galho e casca) altamente enriquecidos com ^{15}N para estudos posteriores sobre o ciclo do N. Aproximadamente 1 g planta⁻¹ de ^{15}N foi aplicado em seis árvores de *E. grandis* (com aproximadamente 2,5 anos de idade) e 0,5 g planta⁻¹ de ^{15}N foi aplicado em três árvores de *A. mangium* (com aproximadamente 10 anos de idade).

Tabela 1 – N total (%) e $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em diferentes compartimentos da biomassa acima do solo de *Acacia mangium* e *Eucalyptus grandis*, 2-4 meses após a aplicação via fuste de 1 g planta⁻¹ (*Eucalyptus*) e 0,5 g planta⁻¹ (*Acacia*) de sulfato de amônio

Espécie	Compartimento	N (%)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<i>Acacia</i>	Folha joven	3,14±1,35	846±687
	Altura média: 10,4±0,7 m		
	Folha velha	2,12±0,07	1014±871
	Galho fino	0,89±0,37	1748±1132
	Galho grosso	0,60±0,13	1042±879
	Casca	1,00±0,20	696±217
<i>Eucalyptus</i>	Folha joven	2,20±2,12	3078±447
	Altura média: 12,9±0,5 m		
	Folha velha	2,12±0,11	2960±430
	Galho fino	0,51±0,26	2681±1340
	Galho grosso	0,23±0,02	3454±1416
	Casca	0,39±0,10	2618±784

APÊNDICE H - Coletas de folhas recém-expandidas de *Eucalyptus grandis* e *Acacia mangium* em plantios monoespecíficos e misto e, posterior avaliação da enzima atividade da enzima nitrato redutase (RNO_3^-)

Foram amostradas, no período da manhã, em primeiro de outubro de 2012, folhas recém-expandidas a partir do terço superior da copa de cada 4 árvores por espécie e por tratamento (detalhes do experimento no capítulo 2). Em cada árvore, foram coletadas três repetições (com três folhas recém-expandidas cada), a partir de 2 galhos aleatoriamente distribuídos. Após as coletas, as amostras foram armazenadas em caixa de isopor com gelo a fim paralisar a atividade da enzima, sendo posteriormente levada a geladeira ($\pm 4^\circ\text{C}$) até o momento da análise (no máximo 24h de intervalo). As análises da atividade de enzima foram feitas no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas (CENA/USP). O Método de determinação da atividade consiste basicamente na produção de NO_2^- na presença de NO_3^- . Com auxílio de corante sensível ao nitrito, as leituras são realizadas em colorímetro fotoelétrico com filtro vermelho (540 nm), sendo os valores de nitrito obtidos por equação linear simples após a leitura de padrão nitritosem diferentes concentrações (como descrito em HEWITT;SMITH, 1975³; MULDER et al., 1959⁴).

A figura 1 mostra os valores observados para a atividade da enzima nitrato reductase (RNO_3^-) em micromol por grama de matéria seca por hora. Menores valores médios da atividade da enzima observados quando *Acacia* foi associada com *Eucalyptus* indicam que ela está usando pouco do nitrato disponível do solo. o 50A. Esse comportamento estaria indicando uma estratégia das acácias para suprir sua demanda de N devido à alta competição do N do solo com os eucaliptos. A fixação biológica o N_2 gera nitrogênio na forma de NH_3^+ . Dessa forma, uma menor atividade da nitrato redutase indicaria, provavelmente, há maior fixação de N_2 . Para os eucaliptos os valores foram muito próximos entre os tratamentos puros e consorciados, mas um pouco superiores aos valores médios encontrados nas acácias do tratamento puro (100A).

³HEWITT, E.J.; SMITH, T.A. **Plant mineral nutrition**. The English Universities Press. Londres, 1975, 298 p.

⁴MULDER, E.G.; BOXMA, R.; VAN VEEN, W.L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on ni^4 trate reduction in plant tissues. **Plant and Soil**, The Hague, v. 10, p. 335-355, 1959.

Figura 1 - Atividade da enzima nitrato redutase (RNO₃⁻) em folhas recém-expandidas de árvores amostradas em plantações monoespecíficas de *E. grandis* (100E), *A. mangium* (100A) e plantio misto (50E:50A). Barras verticais representam o desvio padrão (N=12)

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 2.1 –Equações de biomassa (g planta⁻¹) usadas para cada tratamento e respectivos parâmetros da equação, coeficientes de ajuste (R-valores) e significância da regressão (P-valor)

Tratamento	Fração	Coeficiente		R ²	P-valor regressão	N
		a	b			
100A	Folha	-146,611	37310,247	0,848	0,001	25
	Galho	-360,629	51742,225	0,800	0,001	25
	Casca	-146,611	37310,247	0,848	0,001	23
	Madeira	-797,482	120158,043	0,975	0,001	24
100E	Folha	122,640	12768,753	0,982	0,001	10
	Galho	-1443,774	19180,415	0,846	0,001	8
	Casca	147,665	16550,293	0,968	0,001	8
	Madeira	635,833	109919,801	0,970	0,001	10
50E:50A – <i>Acacia</i>	Folha	-73,744	28472,996	0,940	0,001	23
	Galho	-378,621	43348,391	0,914	0,001	23
	Casca	-208,050	29070,153	0,788	0,001	22
	Madeira	-636,705	117571,787	0,754	0,001	22
50E:50A – <i>Eucalyptus</i>	Folha	-1486,221	24227,385	0,986	0,001	6
	Galho	-4048,867	41796,221	0,948	0,001	6
	Casca	2165,816	14533,142	0,933	0,001	6
	Madeira	12074,235	82634,818	0,926	0,001	9

Tabela 2.2 - Equações de mineralomassa de N (g planta^{-1}) usadas para cada tratamento e respectivos parâmetros da equação, coeficientes de ajuste (R-valores) e significância da regressão (P-valor)¹

Tratamento	Fração	Coeficiente		R^2	P-valor regressão	N
		a	b			
100A	Folha	-4,450	737,200	0,856	0,001	25
	Galho	-2,506	258,118	0,789	0,001	25
	Casca	-4,629	248,965	0,920	0,001	23
	Madeira	-1,033	221,884	0,960	0,001	24
100E	Folha	9,315	213,851	0,955	0,001	10
	Galho	-0,0939	60,818	0,918	0,001	8
	Casca	-2,280	99,924	0,940	0,001	8
	Madeira	-0,473	158,437	0,978	0,001	10
50E:50A – Acacia	Folha	-3,376	616,678	0,951	0,001	23
	Galho	-0,366	180,193	0,843	0,001	23
	Casca	-1,095	205,351	0,842	0,001	22
	Madeira	0,00968	200,968	0,885	0,001	22
50E:50A – Eucalyptus	Folha	-5,508	388,644	0,977	0,001	6
	Galho	-14,255	152,152	0,980	0,001	6
	Casca	7,380	32,459	0,911	0,001	6
	Madeira	37,502	74,601	0,89	0,001	9

1 Equação: $y=a+bx$; onde: y, é o conteúdo de N em g planta^{-1} ; a e b, parâmetros estimados pela equação; x, é a relação $\text{Dap}^2 \cdot \text{Ht}$, m e m.

ANEXO B

Tabela 3.1 - Variáveis alométricas e valores médios de ^{15}N ($\delta\text{‰} \pm \text{SE}$) nos compartimentos acima e abaixo do solo da *Acacia mangium* e de *Eucalyptus grandis* vizinhos aos 60 dias após a marcação com ^{15}N

	<i>Acacia mangium</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>		
	Doadora	Recebedor		
<u>Alometria</u>		Distancia a partir da <i>A. mangium</i> (m)		
		1,5	3,3	6,2
Diâmetro (cm)	$8,36 \pm 0,40$	$10,25 \pm 0,84$	$10,51 \pm 0,34$	$9,38 \pm 0,68$
Altura (m)	$7,38 \pm 0,50$	$12,60 \pm 0,77$	$12,60 \pm 1,17$	$12,40 \pm 1,18$
<u>Compartimentos</u>		$\delta^{15}\text{N}$ (‰ em exesso)		
Folhas	$2946,03 \pm 1066,13$	$0,35 \pm 0,37$	$-0,29 \pm 0,24$	$-0,34 \pm 0,22$
Galhos	$2364,20 \pm 395,73$	$0,64 \pm 0,64$	$-0,05 \pm 0,78$	$-0,24 \pm 0,45$
Madeira	$2169,22 \pm 495,32$	$4,13 \pm 1,11$	$2,82 \pm 0,87$	$2,74 \pm 0,75$
Casca	$971,27 \pm 66,95$	$4,12 \pm 1,26$	$3,04 \pm 0,86$	$3,17 \pm 0,90$
Toco + raízes grossas (>1cm)	$820,49 \pm 121,22$	$1,61 \pm 0,39$	$0,05 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,90$
Raíz média (0,03-0,1 cm)	$535,57 \pm 234,11$	$4,52 \pm 3,66$	$1,07 \pm 0,00$	$-0,27 \pm 0,21$

Tabela 3.2 - Concentração de nitrogênio (N %) e conteúdo de nitrogênio (g árvore^{-1}) nas folhas e galhos da *Acacia mangium* ^{15}N -marcada após 60 dias de experimento

N-Acacia aos 60 dias após ^{15}N -marcação	Folhas			Galhos		
	Bloco			Bloco		
	1	2	3	1	2	3
Concentração de N (%)	2,37	2,41	2,44	0,65	0,81	0,90
Conteúdo de N (g árvore^{-1})	92,72	93,56	74,33	12,12	27,12	20,62

Tabela 3.3 - Concentração média de nitrogênio (N%) em folhas recém-expandidas e raízes finas da *A. mangium* durante 60 dias de experiência. Valores de desvio padrão são fornecidos. Diferenças não significativas na concentração de N foram observadas entre as datas para ambos os compartimento (análise 4)

Dias após a marcação com ^{15}N	Concentração de N (%)	
	Folhas recém-expandidas ¹	Raízes finas ²
Valores do background	3,41 $\pm$ 0,24	2,33 $\pm$ 0,07
5	3,58 $\pm$ 0,12	2,32 $\pm$ 0,10
11	3,54 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,06
17	3,55 $\pm$ 0,14	2,02 $\pm$ 0,17
24	3,48 $\pm$ 0,07	2,31 $\pm$ 0,14
29	3,53 $\pm$ 0,19	2,34 $\pm$ 0,07
45	3,60 $\pm$ 0,21	2,26 $\pm$ 0,08
60	3,56 $\pm$ 0,24	2,12 $\pm$ 0,06

¹ N= 3 repetições por data; ² N= 6 repetições por data

ANEXO C

Tabela 4.1 – Equações¹ de biomassa (kg planta⁻¹) usadas para cada tratamento e respectivos parâmetros da equação e coeficientes de ajuste (R-valores)

Tratamento	Fração	Coeficiente		R ²	P-valor regressão	N
		a	b			
T1 e T2	Folha	0,0625	2,0712	0,95	0,001	18
	Galho	0,0373	2,3400	0,92	0,001	18
	Casca	0,0128	2,2140	0,94	0,001	18
	Madeira	0,0623	2,3073	0,98	0,001	18

¹Equação: $y=a*x^b$; onde: y, é a biomassa em kg planta⁻¹; a e b, parâmetros da equação; x, é o Dap, em cm.

Figura 4.1 – Proporção de folhas, galhos, casca e madeira em clone de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 14 meses após o plantio em parcelas com rotação anterior de *Acacia mangium* (T1) e *E. grandis* (T2)

Figura 4.2 - Biomassa das árvores de clone de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 14 meses após o plantio em parcelas com manutenção de resíduos de colheita da rotação anterior de *Acacia mangium* (T1) e *E. grandis* (T2) e, respectivos, valores de circunferência a 1,30m de altura do solo (CAP) e altura total. 1- raízes com diâmetro >10mm; 2 – raízes entre 2-10 mm

Figura 4.3 – Densidade de raízes finas (< 2 mm) árvores de clone de híbrido de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* aos 14 meses após o plantio em parcelas com manutenção de resíduos de colheita da rotação anterior de *Acacia mangium* (T1) e *E. grandis* (T2) em duas camadas de solo