

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**"APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE SOLUTOS NITROGENADOS DA  
SEIVA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM  
*DESMODIUM OVALIFOLIUM* CV. ITABELA"**

BRUNO JOSÉ RODRIGUES ALVES

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1996

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**"APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE SOLUTOS NITROGENADOS DA  
SEIVA PARA A QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM  
*DESMODIUM OVALIFOLIUM* CV. ITABELA"**

BRUNO JOSÉ RODRIGUES ALVES

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

SEGUNDO SACRAMENTO URQUIAGA-CABALLERO

ROBERT MICHAEL BODDEY

Tese submetida como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Doutor em  
Agronomia, área de concentração em  
Ciência do Solo.

ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1996

INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**“APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE ANÁLISE DE SOLUTOS NITROGENADOS DA  
SEIVA PARA QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM  
*DESMODIUM OVALIFOLIUM* CV. ITABELA”**

BRUNO JOSÉ RODRIQUES ALVES

APROVADO EM 28/10/96

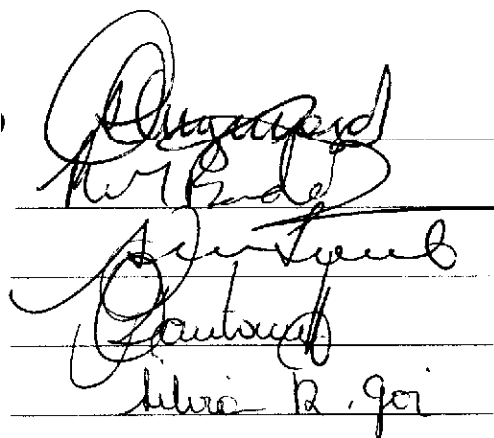
SEGUNDO SACRAMENTO URQUIAGA-CABALLERO)

ROBERT MICHAEL, BODDEY

SEBASTIÃO MANHÃES SOUTO

REINALDO BERTOLA CANTARUTTI

SILVIA REGINA GOI



ITAGUAÍ, RIO DE JANEIRO

1996

*À minha família e amigos,  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha esposa pelo amor, compreensão e apoio durante esta jornada.

A meus pais pela tranquilidade e confiança que sempre me deram e para que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), pelos ensinamentos e oportunidade oferecida para a realização deste curso.

A CAPES e a EMBRAPA, pelas bolsas de estudo concedidas.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e à Fundação Banco do Brasil pela infra-estrutura fornecida para a realização deste estudo.

Aos pesquisadores Segundo Urquiaga e Robert Michael Boddey pelo incentivo, orientação e amizade durante a realização de todo o curso e de toda a minha vida na EMBRAPA.

Ao Dr Sebastião Souto pela credibilidade em minha pessoa.

Aos pesquisadores do Centro Nacional de Agrobiologia, pelo convívio e atenção dispensada a todo o momento.

Ao pesquisador Georg Cadisch por valiosas sugestões na elaboração desta Tese.

Aos professores do Departamento de Solos da UFRRJ pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos Alexander Silva de Resende, Ricardo Tarré e Robert Macedo, um especial agradecimento pela amizade e pela grande ajuda na realização dos experimentos. Sou-lhes muito grato.

Aos amigos Roberto Grégio, Octávio Oliveira, Carlos Aragão, David Vilas-Boas, Elvino Ferreira, Fábio Olivares, Manoel Messias, Altiberto, Daniel, Selmo e Roberto Andrade pela amizade e pela disposição em ajudar sempre que solicitados.

Aos demais funcionários do CNPAB-EMBRAPA e também aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

Bruno José Rodrigues Alves nasceu a 14 de setembro de 1966 no Rio de Janeiro. Realizou os cursos primário e ginásial na Escola Municipal Almirante Saldanha da Gama em Campo Grande, RJ, e o curso científico no Colégio Belisário dos Santos, também em Campo Grande, formando-se como auxiliar técnico de laboratório. Em 1984 iniciou o curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), vindo a graduar-se no ano de 1987. Durante o curso de graduação, estagiou na EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (CNPBS), como bolsista de Iniciação Científica pelo CNPq, conduzindo experimentos na área de fixação biológica do nitrogênio (1986-1987). De 1988 a 1992, realizou o curso de Mestrado em "Ciência do Solo", conduzindo o trabalho de tese intitulado "Avaliação da mineralização do N do solo *in situ*" na UFRRJ e na EMBRAPA, então Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB), Itaguaí, Rio de Janeiro. Em 1992 deu início ao Curso de Doutorado na mesma Universidade. Em 1994 foi aprovado por concurso público para o quadro de pesquisadores do CNPAB.

## ÍNDICE GERAL

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO GERAL .....                                                     | i  |
| GENERAL ABSTRACT .....                                                 | iv |
| INTRODUÇÃO GERAL .....                                                 | 1  |
| REVISÃO DE LITERATURA.....                                             | 4  |
| 1. O papel das leguminosas nos sistemas de pastagens .....             | 4  |
| 2. Métodos para a quantificação da FBN em leguminosas forrageiras..... | 10 |
| 2.1. A técnica de redução de acetileno.....                            | 10 |
| 2.2. Diferença de N total.....                                         | 11 |
| 2.3. Balanço de N-total.....                                           | 11 |
| 2.4. Balanço de N mineral.....                                         | 12 |
| 2.5. N <sub>2</sub> marcado isotopicamente.....                        | 13 |
| 2.6. Diluição isotópica de <sup>15</sup> N .....                       | 14 |
| 2.7. A abundância natural de <sup>15</sup> N (δ <sup>15</sup> N) ..... | 17 |
| 3 A nutrição nitrogenada das leguminosas. ....                         | 19 |
| 4 . A técnica de abundância relativa de ureídeos.....                  | 22 |

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1: Considerações a respeito da amostragem e dosagem de ureídeos e nitrato em extratos de caule de <i>Desmodium ovalifolium</i> ..... | 26 |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                              | 27 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                      | 31 |
| 1. Método de Extração de Solutos .....                                                                                                        | 31 |
| 2. Determinação do N-nitrato no extrato de caule de <i>D. ovalifolium</i> .....                                                               | 32 |
| 2.1. Preparação de padrões.....                                                                                                               | 32 |
| 2.2 Equipamento para FIA.....                                                                                                                 | 32 |
| 2.3 Reagentes (concentrações e vazões dos tubos de Tygon®).....                                                                               | 33 |
| 2.4. Procedimentos .....                                                                                                                      | 34 |
| 3 Determinação de ureídeos em extratos de caule de <i>D. ovalifolium</i> .....                                                                | 34 |
| 3.1. Preparação de padrões.....                                                                                                               | 34 |
| 3.2. Reagentes para o método colorimétrico (PEOPLES <i>et al</i> , 1989).....                                                                 | 35 |
| 3.3. Procedimento para a determinação colorimétrica .....                                                                                     | 35 |
| 3.4. Avaliação da reação colorimétrica.....                                                                                                   | 36 |
| 3 5. Efeito do extrato no desenvolvimento e na estabilidade da cor.....                                                                       | 36 |
| 4. Variação diurna da abundância relativa de ureídeos em <i>D. ovalifolium</i> .....                                                          | 37 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                   | 38 |
| 1. Determinação do N-nitrato no extrato de caule de <i>D. ovalifolium</i> .....                                                               | 38 |
| 2. Determinação de ureídeos em extratos de caule de <i>D. ovalifolium</i> .....                                                               | 44 |
| 3. Variação diurna da abundância relativa de ureídeos em <i>D. ovalifolium</i> .....                                                          | 47 |

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 2. Calibração da abundância relativa de ureídos com a proporção do N derivado da FBN por <i>Desmodium ovalifolium</i> .....                                        | 52 |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                            | 53 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                    | 55 |
| 1. Cultivo das plantas.....                                                                                                                                                 | 55 |
| 2. Amostragens.....                                                                                                                                                         | 56 |
| 3. Análise química das amostras.....                                                                                                                                        | 56 |
| 4 . Cálculos.....                                                                                                                                                           | 57 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                 | 59 |
| 1. Avaliação do crescimento da planta.....                                                                                                                                  | 59 |
| 2. Curvas de simulação e a estimativa de N derivado da FBN (%Nd <sub>fa</sub> ) .....                                                                                       | 62 |
| 3. Efeito das doses de N sobre a nodulação de <i>D. ovalifolium</i> .....                                                                                                   | 69 |
| 4. Curva de calibração entre a abundância relativa de ureídos e a contribuição da FBN .                                                                                     | 71 |
| CAPÍTULO 3. Quantificação da FBN por abundância relativa de ureídos e diluição isotópica de <sup>15</sup> N em <i>Desmodium ovalifolium</i> crescido em vasos com solo..... | 76 |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                             | 77 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                    | 79 |
| 1. Implantação do experimento.....                                                                                                                                          | 79 |
| 2. Tratamentos.....                                                                                                                                                         | 79 |
| 3. Amostragens.....                                                                                                                                                         | 80 |
| 4. Análise química das amostras.....                                                                                                                                        | 81 |
| 5. Cálculos.....                                                                                                                                                            | 81 |

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                               | 82  |
| 1. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de <i>D. ovalifolium</i> , <i>P. maximum</i> e arroz..      | 82  |
| 2 . Avaliação da simulação de acúmulo de N e <sup>15</sup> N pelas plantas .....                          | 85  |
| 3. Quantificação da FBN para <i>D. ovalifolium</i> através da diluição isotópica de <sup>15</sup> N ..... | 91  |
| 4. Análise de solutos em extratos de caule de <i>D. ovalifolium</i> e sua relação com a FBN .             | 105 |
| CAPÍTULO 4 . Avaliação da técnica de abundância relativa de ureídos em <i>Desmodium</i>                   |     |
| <i>ovalifolium</i> cv Itabela, estabelecido no campo .....                                                | 117 |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                           | 118 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                  | 122 |
| 1. Comparação métodos (ureídos x diluição isotópica de <sup>15</sup> N) .....                             | 122 |
| 2. Avaliação sazonal da FBN.....                                                                          | 123 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                               | 125 |
| 1 .Comparação métodos (ureídos x diluição isotópica de <sup>15</sup> N) .....                             | 125 |
| 2 . Avaliação sazonal da FBN.....                                                                         | 128 |
| CONCLUSÕES GERAIS.....                                                                                    | 131 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                                                           | 133 |

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1. Dados de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  em excesso, N total acumulado e  $^{15}\text{N}$  recuperado, em várias épocas de amostragem, por *P. maximum* cv KK16 e *D. ovalifolium* cv Itabela, cultivados em vasos contendo areia e solução nutritiva com variadas doses de  $^{15}\text{N}$  – $\text{KNO}_3$  ..... 61
- Tabela 2. Valores obtidos para os parâmetros da curva de acumulação de WITTY (1983) aplicada aos dados originais de acumulação de N total e de recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* e *D. ovalifolium*, para cada dose de  $^{15}\text{N}$ -  $\text{KNO}_3$ . Também é apresentado o coeficiente de determinação de cada curva obtida ..... 65
- Tabela 3. Estimativas da contribuição da FBN para plantas de *D. ovalifolium* cv Itabela utilizando-se o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , tendo como testemunha *P. maximum* cv KK16 e o método de simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996) ..... 68

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 4. | Estimativas da contribuição da FBN (% Ndfa) para plantas de <i>D. ovalifolium</i> cv Itabela, inoculadas ou não com estirpes específicas de <i>Bradyrhizobium</i> sp., utilizando-se o método de diluição isotópica de $^{15}\text{N}$ tradicional e a simulação planta-planta (BODDEY et al, 1996) tendo como testemunha <i>P. maximum</i> (PM) cv Centenário ou Arroz (AR)..... | 104 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 5. | Contribuição da FBN segundo o método de diluição isotópica de $^{15}\text{N}$ e o de abundância relativa de ureídeos, cujas curvas de calibração foram obtidas em cultivo em areia (capítulo 2) ou em solo (capítulo 3). Neste último caso sob inoculação ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp. Médias de 5 repetições ..... | 126 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema modificado de análise de nitrato por redução por cádmio proposto por GINÉ *et al.* (1980). Utilizou-se a resina do tipo aniônica fortemente básica saturada com  $\text{Cl}^-$  (DOWEX 1-X8 - 100-200 Mesh) e foi colocada numa coluna com 1 cm comp. x 2,79 mm d.i.. As partículas de cádmio (20-40 Mesh) foram colocadas numa coluna com 5cm comp. x 3 mm d.i. .... 3 9
- Figura 2. Regressão entre as leituras de absorbância, expressas no registrador como picos medidos em mm, de padrões de  $\text{NO}_3^-$  em água obtidas utilizando-se o sistema tradicional de análise de  $\text{NO}_3^-$  por redução por Cd adaptado a FIA, proposto por GINÉ *et al* (1980) e o sistema modificado com a inclusão de uma coluna de resina (Figura 1)..... 4 1
- Figura 3. Regressão entre as leituras de absorbância, expressas no registrador como picos medidos em mm, de padrões de  $\text{NO}_3^-$  em água (A) e em extratos de *D. ovalifolium* (B) com as respectivas concentrações dos padrões obtidas utilizando-se o sistema de análise de  $\text{NO}_3^-$  por redução por Cd adaptado a FIA com a inclusão de uma coluna de resina (Figura 1). A Figura 3C mostra o resultado da

razão de leituras dos padrões em extrato descontados do branco (linha cheia, Figura 3B) com as leituras dos respectivos padrões em água. Valor ideal igual a 1 (Linha quebrada)..... 42

Figura 4. Espectros de absorbância do produto colorido da análise de um padrão de 10 nmoles de alantoína/mL e de extratos de caule de *D. ovalifolium*, adicionados ou não do padrão de 10 nmoles de alantoína/mL. A - espectros referentes aos extratos da amostra de cor purpura; B - espectros do padrão de alantoína e do resultado da diferença entre os espectros do extrato puro da amostra purpura e desta mesma amostra adicionado do padrão de 10 nmoles de alantoína/mL; C - o mesmo que A, porém relativo a amostra alaranjada; D - o mesmo que B, porém relativo a amostra alaranjada. .... 46

Figura 5. Efeito da matriz de extratos de tecido de caule sobre a leitura da curva padrão de ureídos (25 a 250 nmoles de alantoína/mL). Valores médios de 16 plantas de *D. ovalifolium* de diferentes idades. As barras verticais indicam o erro padrão da média ..... 48

Figura 6. Variação da absorbância do produto colorido da análise de um padrão de 10 nmoles de alantoína/mL e de extratos de caule de *D. ovalifolium* adicionados ou não do padrão de 10 nmoles de alantoína/mL. O monitoramento das leituras foi iniciado a partir dos 7 minutos de início de desenvolvimento da cor. O intervalo de 10 a 20 min. marcado na Figura corresponde ao tempo recomendado para as leituras (PEOPLES *et al*, 1989) ..... 49

- Figura 7. Flutuação diária da abundância relativa de ureídeos em extratos de caule de *D. ovalifolium*. Os pontos representam a média de 3 repetições. As barras verticais indicam o erro padrão da média ..... 51
- Figura 8. Acumulação de matéria seca em varias épocas de colheita por plantas de (A) *P. maximum* cv KK16 e (B) *D. ovalifolium* cv Itabela, crescidas em vasos contendo areia e solução nutritiva com variadas doses de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ . As barras verticais correspondem a diferença mínima significativa. A presença do asterisco indica a existência de diferença significativa (Teste de Tukey;  $p < 0,05$ )..... 60
- Figura 9. Simulação do acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$ , até os 70 dias após o corte de uniformização, por *P. maximum* cv KK16 utilizando a curva de acumulação proposta por WITTY (1983), para as doses de 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0 mgN/vaso, A, B, C e D, respectivamente. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto..... 63
- Figura 10. Simulação do acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$ , até os 70 dias após o corte de uniformização, por *D. ovalifolium* cv Itabeia, utilizando a curva de acumulação proposta por WITTY (1983), para as doses de 12,5, 25,0, 50,0 e 100,0 mgN/vaso, A, B, C e D, respectivamente. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto..... 64

- Figura II. Acumulação de N total nas plantas de *D. ovalifolium* segundo a curva de acumulação de WITTY (1983), e estimativa do N proveniente do fertilizante ( $^{15}\text{N-KNO}_3$ ) adicionado nas doses de A - 12,5 mgN/vaso, B - 25,0 mgN/vaso, C - 50,0 mgN/vaso e D - 100,0 mgN/vaso, durante todo o período experimental (70 dias após o corte de uniformização) ..... 66
- Figura 12. Variação da massa seca de nódulos de *D. ovalifolium* cv Itabela durante o período experimental, sob diferentes dose de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ . As barras verticais correspondem a mínima diferença significativa. A presença de asterisco indica a existência de diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ..... 70
- Figura 13. Correlação entre os dados de abundância relativa de ureídos e a contribuição da FBN no N total acumulado a cada dia (%Ndfa/dia) para *D. ovalifolium*, obtidas para os tratamentos de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ ; adicionado nas doses de A - 12,5 mgN/vaso, B - 25,0 mgN/vaso, C - 50,0 mgN/vaso e D - 100,0 mgN/vaso. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto ..... 73
- Figura 14. Curva de calibração entre os dados de abundância relativa de ureídos e a contribuição da FBN no N total acumulado a cada dia (%Ndfa/dia) para *D. ovalifolium*, obtidos de todos os tratamento de  $^{15}\text{N-KNO}_3$  e de todas as colheitas durante o período experimental. As barras verticais representam o erro padrão da média ..... 74
- Figura 15. Acúmulo de matéria seca por plantas de *D. ovalifolium*, inoculadas (A) ou não inoculadas (B) com estirpes específicas de *Bradyrhizobium* sp., sob o efeito de diferentes proporções de palha (com base no peso seco) incorporadas ao solo,

durante o período experimental. As barras representam a mínima diferença significativa. O asterisco indica a existência de diferença entre os tratamentos a  $p < 0,05$  ..... 83

Figura 16. Acúmulo de matéria seca por plantas de *P. maximum* (A) e arroz (B) sob o efeito de diferentes proporções de palha (com base no peso seco) incorporadas ao solo, durante o período experimental. As barras representam a mínima diferença significativa. O asterisco indica a existência de diferença entre os tratamentos a  $p < 0,05$ ..... 84

Figura 17. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *D. ovalifolium* inoculado sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média ..... 86

Figura 18. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *D. ovalifolium* não inoculado sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%, B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média ..... 87

Figura 19. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média..... 88

- Figura 20. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  pelo arroz sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média..... 89
- Figura 21. Curva de acúmulo de N total, ajustada aos dados medidos (WITTY, 1983) e curva do N acumulado proveniente do solo, estimada pela simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996) para plantas de arroz sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2% ..... 92
- Figura 22. Curva de acúmulo de N total, ajustada aos dados medidos (WITTY, 1983), e curva do N acumulado proveniente do solo, estimada pela simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996) para plantas de *P. maximum* sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%..... 93
- Figura 23. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 0,3% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 94

Figura 24. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 0,6% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 95

Figura 25. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 0,9% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 96

Figura 26. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 1,2% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 97

Figura 27. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 0,3% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 98

- Figura 28. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 0,6% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 99
- Figura 29. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 0,9% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 100
- Figura 30. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 1,2% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D)..... 101
- Figura 31. Variação do peso seco de nódulos por planta de *D. ovalifolium*, inoculada ou não, sob o efeito de diferentes tratamentos de palha. As barras indicam o erro padrão da média ..... 106
- Figura 32. Correlações entre a contribuição diária da FBN e a abundância relativa de ureídeos em *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp., obtidas para os tratamentos de palha A - 0,3%; B - 0,6%, C - 0,9% e D - 1,2%. As barras representam o erro padrão da média ..... 108

- Figura 33. Correlações entre a contribuição diária da FBN e a abundância relativa de ureídeos em *D. ovalifolium*, não inoculado, obtidas para os tratamentos de palha A - 0,3%; B - 0,6%, C - 0,9% e D - 1,2%. As barras representam o erro padrão da média ..... 109
- Figura 34. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de abundância relativa de ureídeos e pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto..... 111
- Figura 35. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de abundância relativa de ureídeos e pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em *D. ovalifolium* não inoculado, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto ..... 112
- Figura 36. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e valores de abundância relativa de ureídeos para *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto..... 113
- Figura 37. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e valores de abundância relativa de ureídeos para *D. ovalifolium* não inoculado , obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. Os pontos representam valores médios de 4 repetições. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto ..... 114

Figura 38. Médias mensais de temperatura (A) e precipitação (C), registradas na Estação de Zootecnia do Extremo Sul da Bahia (ESSUL/CEPLAC), e estimativas da contribuição da FBN (%Ndfa) para *D. ovalifolium* (B), obtidas através da técnica de análise de ureídos em extratos de caule segundo a equação:  $ARU = 0,887(\%Ndfa) - 2,107$ , onde (ARU) significa a abundância relativa de ureídos no extrato de caule. Dados médios de 9 repetições..... 130

## RESUMO GERAL

A introdução de leguminosas forrageiras nas áreas de pastagens extensivas vem sendo difundida com o objetivo de contrabalançar as perdas de N do sistema, através das contribuições da fixação biológica do N (FBN), e aumentar a oferta de proteína para o gado. *Desmodium ovalifolium* é uma leguminosa forrageira que já vem sendo utilizada em áreas de pastagens consorciadas em regiões da Bahia anteriormente vegetadas pela Mata Atlântica, no sentido de manter estas áreas produtivas e reduzir o desmatamento, que atualmente é a forma utilizada pelos agricultores para manter a produção de carne. A informação sobre a contribuição da FBN para esta leguminosa é muito importante para avaliar o seu papel na sustentabilidade do pasto.

Das técnicas disponíveis para quantificar a FBN em leguminosas forrageiras, a mais empregada até o momento é a da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , porém, a sua utilização para obtenção das estimativas de FBN em sistemas estabelecidos é uma tarefa complexa e sujeita a muitas críticas.

Além da técnica isotópica, a técnica baseada na abundância relativa de ureídeos nos tecidos das plantas tem grande potencial para estudos de quantificação da FBN a nível de

campo. Esta técnica baseia-se no fato de que para a maioria das leguminosas tropicais, os principais produtos da fixação de  $N_2$  nos nódulos são alantoína e ácido alantoíco (ureídeos), e que o N mineral do solo é translocado na forma de nitrato. Quando se trabalha com extratos de caule, utiliza-se a relação  $[N\text{-ureídeos}/(N\text{-ureídeos}+N\text{-nitrato})] \times 100$ , para definir a abundância relativa de ureídeos, que foi proposta como um índice da dependência da planta pela FBN. Para empregar esta técnica na quantificação da FBN, é necessária a obtenção de uma curva de calibração (específica para a leguminosa em estudo) entre os dados de abundância relativa de ureídeos e a proporção do N derivado da FBN, obtida por diluição isotópica de  $^{15}N$  (esta curva é obtida em substrato inerte como areia ou areia e vermiculita, por exemplo).

O objetivo deste estudo foi o de verificar a viabilidade de uso desta técnica para a quantificação da FBN *in situ* para *Desmodium ovalifolium* presente em pastagem consorciada, antes porém, avaliar o protocolo de amostragem de planta e determinações colorimétricas para esta espécie.

A avaliação preliminar do protocolo para as determinações colorimétricas de nitrato em extrato de caule de *D. ovalifolium*, mostraram que a metodologia de fluxo contínuo baseada na redução de nitrato para nitrito pelo Cd pode ser utilizada adaptando-se uma coluna de resina de troca de ânions ao sistema de fluxo, que separa o nitrato do meio orgânico, reduzindo assim as interferências observadas no sistema tradicional. Para a determinação de ureídeos, baseada na reação Rimini-Schryver, observou-se a existência de interferências do extrato porém o efeito não foi aditivo e permitiu uma sensibilidade até

cerca de 10 nmoles de alantoína/mL de extrato. Na avaliação do horário de amostragem da planta, concluiu-se como mais apropriado o horário entre 9:00 e 16:00h.

Os dados de abundância relativa de ureídeos correlacionaram-se significativamente ( $r = 0,91$ ) com a contribuição da FBN obtida por diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , e esta relação Obedeceu um modelo linear, que definiu a curva de calibração para *D. ovalifolium*, cultivado em areia. Num estudo posterior em um experimento estabelecido em vasos contendo solo, observou-se que a curva de calibração produziu resultados superestimados em relação aos obtidos pela diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . Os tratamentos estudados neste experimento com solo, permitiram que novas curvas de calibração fossem obtidas para *D. ovalifolium* (para plantas inoculadas e não inoculadas).

As estimativas da FBN fornecidas pelas curvas de calibração obtidas em areia e solo foram comparadas com as estimativas fornecidas pela diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em um experimento realizado com plantas de *D. ovalifolium* crescidas em parcelas marcadas com  $^{15}\text{N}$  dentro de uma área de pastagem. Novamente observou-se que a curva de calibração obtida em areia superestimou a contribuição da FBN. Já curva de calibração obtida em solo proporcionaram resultados muito semelhantes ao da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . A aplicação da técnica de abundância relativa de ureídeos para quantificar a FBN para *D. ovalifolium* estabelecido em um pasto consorciado, mostrou que tal como observado nos experimentos de vasos, a contribuição da FBN oscilou em torno de 50% durante o ano, tendendo a se reduzir nos meses mais frios e secos.

A técnica de abundância relativa de ureídeos mostrou-se uma ferramenta muito útil para determinar a dependência do *D. ovalifolium* pela FBN.

## ABSTRACT

The introduction of forage legumes into pastures for beef cattle is recommended in order to counterbalance the losses of N from the system, through inputs of biological nitrogen fixation (BNF), and to increase the protein on offer to cattle. *Desmodium ovalifolium* is a forage legume which is being utilised in mixed pastures in the south of the state of Bahia in areas previously covered by the Atlantic forest. It is hoped that preserving the productivity of these pasture by the introduction of this forage legume Will reduce the incentive of farmers to clear the forest. Information concerning the contribution of BNF to this legume is most important to evaluate its contribution to the sustainability of the pasture.

Of the techniques available to quantify BNF to forage legumes, the most utilised until now has been the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique, although, its use to quantify BNF in established systems is rather complex and subjected to criticisms.

Apart from the  $^{15}\text{N}$  isotope technique, the technique based on the relative abundance of ureides in the plant tissues shows potential for the quantification of BNF in the field. This technique is based on the assumption that the majority of tropical legumes, the principal products of NI fixation in the nodules are allantoin and allantoic acid (ureides), and that most of soil N is translocated as nitrate. When the analyses are performed on tissue extracts, the relationship  $\text{IN-ureides}/(\text{N-ureides} + \text{N-nitrate}) \times 100$  should be used to define the relative abundance of ureides, which was proposed as an index of the plant dependence for BNF. To employ this technique to quantify de BNF contributions to a certain species, it is necessary to establish a calibration curve between data of relative abundance of ureides and

proportion of N derived from BNF, using the  $^{15}\text{N}$  isotopic dilution technique (usually, this calibration curve is obtained from plants grown in sand or vermiculite and Sand). The objective of this present study was to determine the viability of the use of this technique to quantify BNF *in situ* with *Desmodium ovalifolium* in a mixed pasture, which was to be performed after an examination of the protocols of plant sampling and colorimetric methods of analysis.

A preliminary evaluation of the flow injection analysis (FIA) technique to determine nitrate in stem extracts using the reduction of nitrate to nitrite with Cd, showed the technique to suffer from interference by organic substances in the extracts. The problem was resolved by adding a column of anion exchange resin to the flow system which separated nitrate from organic solutes. The determination of ureides, based on the Rimini-Schryver reaction, also showed interference by the substrate matrix, but the effect was found not to be additive and permitted a sensitivity down to 10 nmole allantoin/ml extract. With relation to the time of sampling of the plants for analysis of the nitrogenous solutes, while no great diurnal variation in relative ureide abundance was recorded, it was concluded that sampling was best made between 09.00 and 16.00h.

The relative abundance of ureides in stem extracts of *Desmodium ovalifolium* was shown to correlate significantly ( $r=0.91$ ) with the contribution of BNF as estimated by the use of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique with plants grown in sand and this relationship was found to be linear. In a subsequent study performed in soil in pots it was found that the calibration curve established for the plants grown in sand overestimated the contribution of BNF as determined by isotope dilution. The treatments utilised in this study with soil-grown

plants resulted in new calibration curves could be obtained for *D. ovalifolium* (for inoculated and non-inoculated plants).

The estimates of BNF supplied by the calibration curves obtained in sand and soil were compared with the estimate derived from the use of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique in an experiment performed with *Desmodium ovalifolium* grown in plots labelled with  $^{15}\text{N}$  within an area of pasture. Again it was shown that the calibration curve obtained in soil showed very similar results to the isotope dilution estimates.

The use of the ureide abundance technique to determine the BNF dependency of *Desmodium ovalifolium*, showed, as was observed in pot experiments, that the BNF contribution oscillated in terms of 50% of total accumulated N being somewhat lower in cooler and dryer periods.

The ureide abundance technique was shown to be a very useful tool to determine the BNF dependency of *Desmodium ovalifolium*.

## INTRODUÇÃO GERAL

A degradação da maioria das áreas de pastagem tropicais, formadas basicamente de monocultura de gramíneas, parece estar associada a uma significativa perda de N do sistema através da exportação de produtos animais ou através das perdas de N das excretas. Para contornar a baixa produtividade das pastagens sugere-se a introdução de uma leguminosa forrageira na forma de consórcio como a solução mais viável (THOMAS, 1992).

Do ponto de vista econômico, a introdução de leguminosas forrageiras nas áreas de pastagens foi muito difundida com o objetivo de aumentar a oferta de proteína para o gado. Contudo, além de uma melhor dieta, a leguminosa pode assumir um papel ainda mais importante que é o de compensar as perdas de N do sistema solo/planta através da fixação biológica de N<sub>2</sub> (BODDEY *et al*, 1994; CADISCH *et al*, 1994). O desempenho da leguminosa na sustentabilidade da pastagem dependerá da sobrevivência a condições adversas de solo e clima e de sua eficiência na FBN.

Quando se considera a consorciação gramínea/leguminosa para pastagens, um dos grandes problemas é a compatibilidade de ambas as espécies, no sentido de coexistirem de forma equilibrada e contínua. Em termos de gramíneas, as espécies mais adaptadas as condições de solos e manejo em regiões tropicais são as do gênero *Brachiaria* e *Andropogon* (MACEDO, 1995). Poucas leguminosas se mostraram aptas a se consorciarem com estas gramíneas, sendo os pares *Andropogon gayanus*/*Stylosanthes guyanensis*, na região dos Cerrados (MACEDO, 1995) e *Brachiaria humidicola*/*Desmodium ovalifolium* na zona da Mata Atlântica (PEREIRA *et al*, 1995) exemplos de relativo sucesso nesta prática. Muita expectativa gira em torno do melhor conhecimento deste último consórcio, *B. humidicola*/*D. ovalifolium*, uma vez que cerca de 50% das pastagens formadas no ecossistema da Mata Atlântica se apresentam degradadas ou em fase de degradação (PEREIRA *et al*, 1995).

Não obstante a grande adaptabilidade do *D. ovalifolium* aos solos tropicais, tem sido considerado que uma das limitações do seu uso como leguminosa recuperadora de pastos estaria associada a sua baixa capacidade fixadora de N (CADISCH *et al.*, 1989; VIERA-VARGAS, 1994).

Os estudos para quantificação da FBN tem sido baseados na técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , considerada como a mais eficiente para a quantificação da FBN  $^{15}\text{N}$  (TA & FARIS, 1987a; CADISCH *et al.*, 1989; VIERA-VARGAS, 1994). Devido a complexidade desta técnica para o seu uso no campo, a maioria dos resultados obtidos tem sido restritos a experimentos de casa de vegetação e pequenas parcelas em condições controladas, que certamente não representam as condições normais de desenvolvimento da cultura no campo.

Além da técnica isotópica, a técnica baseada na abundância relativa de ureídos tem grande potencial para estudos a nível de campo. Esta técnica foi proposta por MCCLURE & ISRAEL (1979) e é baseada na observação de que na maioria das leguminosas tropicais, os principais produtos da fixação de  $\text{N}_2$  nos nódulos são alantoína e ácido alantóico (ureídos), que são transportados para a parte aérea da planta através do xilema, sendo o N proveniente do solo transportado no xilema principalmente nas formas de nitrato ou amidas (asparagina ou glutamina). Eles e outros autores (PATTERSON & LARUE, 1983; HERRIDGE & PEOPLES, 1990), trabalhando principalmente com soja, mostraram que havia uma alta correlação entre os teores de N-ureído na seiva e o percentual de N derivado da FBN.

As razões que fazem com que esta técnica seja raramente usada para quantificar a FBN está na dificuldade em se extrair seiva das plantas em condição de campo, e na exigência de uma curva de calibração que relacione os teores de ureídos com diferentes valores de FBN para a cultura a ser avaliada.

O gênero *Desmodium* está entre os relacionados por PEOPLES *et al* (1989) como os que transportam o N fixado na forma de ureídeos e, portanto, tem potencial para que a FBN possa ser avaliada pela técnica de abundância relativa de ureídeos.

Esta tese teve como objetivo verificar a relação entre a qualidade dos solutos nitrogenados transportados na seiva de *D. ovalifolium* e a quantidade de N fixado determinada através da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . Com base nestes dados, obter uma curva de calibração para esta cultura.

Outro objetivo foi o de verificar a possibilidade de empregar modelos de simulação de acumulação de N e  $^{15}\text{N}$  (WITTY, 1983) como uma etapa inicial para a quantificação da FBN por diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . O emprego do modelamento parece ser uma estratégia com grande potencial para contornar os problemas relacionados com diferenças em tempo quanto a amostragem do N do solo pela testemunha e a planta teste (HAMILTON *et al*, 1992; BODDEY *et al*, 1996).

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. O papel das leguminosas nos sistemas de pastagens

Vários gêneros de gramíneas de origem africana, entre elas *Cynodon*, *Panicum*, *Andropogon* e *Brachiaria*, foram introduzidas no território brasileiro com o objetivo de se aumentar a produtividade das pastagens (GILLER e WILSON, 1993). Devido a limitações de ordem econômica a grande maioria das áreas de pastagem vieram sendo estabelecidas e exploradas extensivamente com a mínima adição de insumos. Como a grande maioria dos solos brasileiros são predominantemente caolíníticos e oxídicos, ou seja de baixa CTC, somente as espécies menos exigentes como as do gênero *Brachiaria* persistiram sob este regime de exploração pastoril. A alta capacidade produtiva de algumas espécies de *Brachiaria* crescidas em solos pobres está associada a sua baixa qualidade forrageira. Hoje a maior parte dos 150 milhões de hectares de pastagens no Brasil são de gramíneas em monocultura, onde se destacam em termos de área plantada, os pastos de *B. humidicola* e *B. decumbens*.

Mais recentemente tem sido observado que com o passar dos anos, a produtividade destas pastagens tendem a diminuir, permitindo a invasão de plantas de baixa palatabilidade e digestibilidade, o que prejudica, severamente, a produção animal. Um dos fatores que contribuem para a redução no crescimento da gramínea é a baixa disponibilidade de N para as plantas devido a alta relação C:N da liteira depositada no solo imobilizando grandes quantidades de N e as altas perdas de N das excreções dos animais (SANCHEZ & COCHRANE, 1980; GRAHAM *et al.*, 1985; STEELE & VALLIS, 1988).

Em sistemas de baixa disponibilidade de proteína, como os baseados em pastos de *Brachiaria*, o N é excretado divide-se em quase 50% na forma de urina e 50% na forma de fezes, sendo que menos do que 20% do N das fezes está numa forma solúvel dos quais até 50% podem ser perdidos do sistema (FERREIRA *et al*, 1995a). As perdas através da urina são mais importantes, uma vez que quase todo o N está na forma de uréia e amônio. Neste caso foi demonstrado que quando a urina foi depositada em uma área densamente vegetada por *Brachiaria*, as perdas chegaram a 34% do total de N da urina (FERREIRA *et al*, 1995b). Neste mesmo estudo, demonstrou-se que 76% do N depositado como urina foi perdido quando a deposição se deu em solo descoberto. THOMAS *et al* (1995) em um estudo semelhante, com plantas, demonstrou a ocorrência de perdas de N via urina da ordem de 40%.

Com relação ao efeito de sequestro de N pela liteira depositada, ROBBINS *et al* (1989), encontrou que a contínua deposição de liteira de alta relação C/N da própria pastagem ao solo, que imobiliza grandes quantidades de N, é a mais provável razão para que os pastos cultivados, na maioria das vezes resultem em uma condição de degradação. THOMAS & ASAKAWA (1993) evidenciam que a natureza do C, tais como os teores de ligninas e polifenóis podem ser fatores tão importantes na liberação de N para o sistema quanto a simples relação entre os teores totais de C e N. Estes autores sugeriram que, principalmente a relação lignina/N do litter podem representar os verdadeiros indicadores da liberação de N do material em decomposição.

Além das perdas de N via excretas e da alteração na qualidade do N orgânico do solo, deve-se considerar também como geradores de degradação a redução dos níveis de P e a compactação do solo por mau manejo animal (MACEDO, 1995)

As áreas degradadas do Brasil são imensas, e nas regiões mais úmidas de solos mais pobres essa proporção pode chegar a 50% da área de pastagens formadas, como é o caso das existentes na área anteriormente ocupada pela Mata Atlântica (PEREIRA *et al*, 1995). Com relação aos Cerrados, onde a criação extensiva é preponderante (MACEDO, 1995), existem poucas informações quanto ao percentual de áreas degradadas, no entanto tem se observado um contínuo declínio das áreas de pastos cultivados e que não conseguem sustentar pelo menos 1 UA/ha (MACEDO, 1995).

A elevação da produtividade destas pastagens é facilmente conseguida através da adição de N conforme mostram vários experimentos já realizados (NASCIMENTO Jr., 1986). No entanto o tipo de pecuária exercida no Brasil exige uma solução a menos custo uma vez que o emprego de fertilizantes nitrogenados é antieconômico neste tipo de atividade. A utilização de leguminosas em sistemas de pastagem, a princípio, constitui uma excelente fonte de proteína para o gado e, também, é uma forma potencial de se introduzir N na pastagem cuja origem é a FBN.

O plantio destas leguminosas pode ser feito de forma isolada, denominado banco de proteínas (GARCIA, 1986) ou num cultivo em faixas em meio a pastagem de gramíneas formando as chamadas pastagens consorciadas.

FRANCO *et al* (1972) estudaram fontes de N para o capim-pangola (*Digitaria decumbens*) e encontraram que a produção de massa seca, em dois cortes, nos vasos com Siratro consorciado com o capim pangola, foi mais do que o dobro da do capim-pangola sozinho, porém inferior ao tratamento da gramínea adubada com um equivalente a 120 kgN/ha. No entanto, a produção de proteína, considerando-se os dois cortes, no tratamento consorciado superou a do tratamento com

N mineral. Dados apresentados por ZIMMER & CORREA (1993) mostraram claramente o efeito positivo da consorciação de leguminosas em pastagens. O ganho de peso vivo foi mais significativo para o pasto consorciado quando a comparação foi feita com pastos de grama pura sem adição de N. No entanto pode-se dizer que a presença da leguminosa em consórcio, dependendo do manejo dado, pôde produzir resultados que se equipararam a pastos de gramínea pura adubados com até 100kgN/ha.

Em um estudo com  $^{15}\text{N}$  realizado na região dos Cerrados, encontrou-se que *Stylosanthes guianensis* cv Bandeirantes obteve aproximadamente 81% do total de N acumulado na planta proveniente da FBN (CADISCH *et al*, 1994). Este estudo, que avaliou o ciclo de N para a pastagem de *Andropogon gayanus*/S. *guianensis*, mostrou um grande benefício da presença da leguminosa em termos do fornecimento de N para o solo através da deposição de liteira de menor relação C/N. Em experimentos onde pequenas quantidades de fertilizantes marcados com  $^{15}\text{N}$  foram aplicados a pastos de gramínea pura ou consorciadas com leguminosas, a recuperação do N aplicado foi 3 vezes maior no pasto consorciado em comparação ao de gramínea pura (VALLIS *et al*, 1977). Este aumento na disponibilidade de N com a introdução da leguminosa proporcionou uma redução na imobilização de N, ou estimulou a mineralização do N anteriormente imobilizado, devido a adição de resíduos ricos em N ao solo. Dessa forma, a introdução de leguminosas aos sistemas de pastagem podem resultar em um maior aporte de N ao sistema através da FBN e ainda aumentar a disponibilidade de N no solo através do estímulo da mineralização da reserva de N orgânico.

Todo o benefício da leguminosa para os sistemas de pastagem está no fato de haver uma maior quantidade de N por unidade de matéria seca na planta quando comparada com gramíneas. Se a leguminosa não fixa N e o solo pode fornecer todas as suas necessidades nutricionais, os efeitos em termos de ganhos de peso animal serão os mesmos como se houvesse fixação de N. No entanto o sistema seria ainda mais extrativo e provavelmente haveria uma aceleração no processo de degradação por esgotamento de N do solo. Surge daí a necessidade de se incluírem leguminosas com alto potencial para FBN a fim de se manter um balanço sempre positivo entre ganhos e perdas deste nutriente.

As leguminosas forrageiras são pouco competitivas por N do solo se comparadas as gramíneas tropicais como as do gênero *Brachiaria* e, dessa forma, uma vez estabelecidas em consórcio, as contribuições da fixação biológica de N (FBN) através da simbiose planta/*Rhizobium* são incrementadas (CADISCH *et al*, 1994; THOMAS & ASAKAWA, 1993). Estimativas da contribuição da FBN realizadas utilizando-se o isótopo  $^{15}\text{N}$  (diluição isotópica) indicaram que 80-95% do N acumulado pelas leguminosas forrageiras é derivado da FBN quando não existe escassez de outros nutrientes no solo (VALLIS *et al*, 1977; CADISCH *et al*, 1989). Quando por exemplo a disponibilidade de P e K eram limitantes no solo uma avaliação do potencial fixador de 8 leguminosas tropicais proporcionou estimativas que variaram de 44 a 84% de N derivado da FBN (CADISCH *et al*, 1989).

Um dos problemas relacionados ao estabelecimento dos consórcios é a persistência da leguminosa na pastagem. *Desmodium ovalifolium* é uma espécie de leguminosa estolonífera que se destacou no sul da Bahia por ser agressiva e persistente em pastos de *Brachiaria humidicola* lá

existentes. Outras características importantes são a alta adaptabilidade a solos ácidos, a regiões de alta pluviosidade e curtos períodos de seca (GILLER & WILSON, 1993). Os poucos resultados existentes sobre quantificação da FBN para *D. ovalifolium* tem revelado que esta espécie forrageira necessita de solos férteis para que o seu sistema simbiótico possa atender a grande parte da sua necessidade de N (CADISCH *et al*, 1989).

Na maioria das vezes, os resultados de quantificação das contribuições da FBN para as leguminosas forrageiras (GOODMAN P.J. & COLLISON M. (1986); DANSO (1988); CADISCH *et al*, 1989; VIERA-VARGAS *et al*, 1994) como o *D. ovalifolium*, foram obtidos através do uso da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (MCAULIFFE *et al*, 1958). No entanto como discutido por BODDEY *et al*, (1995), a obtenção de estimativas mais realísticas das contribuições da FBN a partir da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  requer o estabelecimento de experimentos com técnicas especiais de marcação do solo e ainda com o uso de várias testemunhas para estimar o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do N mineral disponível do solo. Tais prerrogativas tornam praticamente inviável a quantificação segura da FBN *in situ*, especialmente quando a contribuição da FBN é baixa.

Alternativamente, as técnicas baseadas na abundância natural de  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ) (CHALK, 1985), apesar dos problemas relacionados a aptidão de testemunhas (PATE *et al*, 1994) e sensibilidade do método (UNKOVICH *et al*, 1994), e de abundância relativa de ureídos (MCCLURE & ISRAEL, 1979) mostram-se muito promissoras para a quantificação da contribuição da FBN para muitas espécies de leguminosas que já se encontram estabelecidas em sistemas agrícolas ou naturais.

## 2. Quantificação da FBN em leguminosas forrageiras

A dependência das leguminosas pelo  $N_2$  atmosférico pode ser acessada por métodos diretos e indiretos e dentro destes, de forma integrada ou instantânea.

### 2.1. A técnica de redução de acetileno

A descoberta de que a nitrogenase é capaz de reduzir acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ) resultou no desenvolvimento de um método altamente sensível e de grande utilidade para avaliações a nível de laboratório e para algumas medidas a nível de campo (BURRIS, 1975). Este método foi utilizado amplamente na década de 70 para estimar a atividade da nitrogenase, que algumas vezes foi extrapolada para quantificar o N fixado. Um fator teórico de conversão de 3 moles de  $C_2H_4$  produzidos para 1 mol de  $N_2$  reduzido foi sugerido inicialmente (HARDY *et al*, 1968). Durante a FBN, alguns eletrons são consumidos para produção de  $H_2$ , processo este que não ocorre na presença de  $C_2H_2$ . Dessa forma, considerou-se que uma proporção de 4 moles de  $C_2H_4$  produzidos para 1 mol de  $N_2$  reduzido seria razoável para uma conversão quantitativa (BODDEY, 1987). Atualmente, o uso desta técnica para quantificação da FBN é amplamente criticado (WITTY & MINCHIN, 1988). A exposição do sistema fixador de leguminosas ao acetileno implica em uma redução da permeabilidade de  $O_2$  nos nódulos o que resulta em uma redução da atividade da nitrogenase. Outro ponto é que como o acetileno inibe o processo de redução de  $H^+$ , a FBN pode ser superestimada a não ser que a estirpe nodulante apresente uma hidrogenase eficiente a quase 100% (NEVES & HUNGRIA, 1987). A perturbação do sistema fixador no processo de incubação das raízes afetam a barreira de  $O_2$  e inibem a FBN, cuja resposta é dependente da espécie de leguminosa (MINCHIN *et al*, 1986), o que também contribui para críticas mesmo em condições comparativas. Atualmente, a redução de acetileno é mais

utilizada a nível de laboratório como ferramenta indicadora de existência de sistema fixador de  $N_2$  ativo.

## 2.2. Diferença de N total

Nesta técnica, uma planta não fixadora deve ser plantada ao mesmo tempo que a leguminosa em avaliação. A planta não fixadora serve para determinar a quantidade de N disponível no solo que foi extraída pela leguminosa e a diferença entre os totais de N da leguminosa e da planta não fixadora representa a contribuição da FBN (BODDEY, 1987). O pré requisito desta técnica é a de que a quantidade de N do solo extraída pela planta testemunha é igual a da leguminosa. A diferença de aproveitamento de N do solo entre as gramíneas e leguminosas impede o emprego desta técnica para sistemas estabelecidos de pastagens consorciadas.

## 2.3. Balanço de N-total

Esta técnica também é bastante simples e implica em se determinar as quantidades totais de N existentes no sistema solo/planta ao início e ao final do período de avaliação de uma dada cultura. Um dos pontos mais limitantes para o emprego desta técnica a nível de campo é a variabilidade observada no processo de análise e amostragem de N do solo (BREMNER, 1965). A imprecisão nas determinações dos totais de N, principalmente do solo, faz com que exista a necessidade de se acumular vários cultivos seguidos de espécies anuais para que o balanço apresente valores significativos (APP *et al*, 1980). Não obstante, URQUIAGA *et al* (1992) empregaram a técnica de balanço de N para quantificar a contribuição da FBN para cana-de-

açúcar e encontraram valores muito semelhantes aos obtidos pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ .

A limitação dos estudos de balanço de N está na dificuldade em separar perdas e ganhos de N do sistema solo planta. Em pastagens sob pastejo, se observam significativas perdas de N, provavelmente por volatilização de amônia, originadas das zonas de deposição de fezes e urina. Também ocorrem contribuições de N depositados com as chuvas. A interpretação destes efeitos com o estabelecimento de uma parcela controle (sem a leguminosa) seria de pouca ajuda pois a deposição de N como urina e fezes seria alterada em função da qualidade do material em oferta no pasto.

#### 2.4. Balanço de N mineral

Esta metodologia é bastante recente e só foi empregada uma vez por seus autores (ALVES *et al*, 1995). A idéia surgiu de estudos sobre mineralização de N do solo que utilizavam sistemas intactos *in situ*. ADAMS & ATTIWILL (1986) utilizaram uma metodologia de avaliação da mineralização *in situ* na qual um cilindro de aço ou PVC é inserido no solo e deixado para incubar durante 30 dias. Ao final deste tempo estima-se o N mineralizado subtraindo-se a quantidade inicial de N mineral, da quantidade de N mineral acumulada ao final da incubação contida dentro da coluna de solo. O N extraído pela planta é calculado pela diferença do N mineralizado e a quantidade de N fora da coluna no final da incubação. RAISON *et al* (1987) incluíram uma segunda coluna que é incubada sem cobertura ao mesmo tempo que a coberta. Dessa forma, subtraindo-se o N-mineralizado da coluna coberta pelo da coluna aberta, tem-se o N perdido no período de incubação.

SMETHURST & NAMBIAR (1989), demonstraram que a estimativa de extração de N pela planta através da metodologia de colunas correlacionava-se razoavelmente com o N extraído por plantas de *Pinus radiata* com 1 ano e meio de idade ( $r^2 = 0,57$ ;  $P < 0,01$ ). Melhores resultados foram obtidos para *Panicum maximum* onde observou-se uma diferença de apenas 10% entre o acúmulo de N total pela planta e estimado pela técnica de colunas (ALVES, 1992). As variabilidades nas estimativas foram atribuídas ao tempo de incubação das colunas no solo, perturbação do solo durante a inserção das colunas (60 cm prof.) e profundidade efetiva de raízes (ALVES, 1992; ALVES *et al*, 1993). Considerando-se que a estimativa de acúmulo de N do solo pela planta obtida pelo método de colunas está próxima da exatidão, a diferença entre esta estimativa e o total de N acumulado pela planta, no período, representa a contribuição do N da FBN (ALVES *et al*, 1995). Neste trabalho obteve-se uma estimativa de N derivado do solo para uma testemunha não fixadora de N (*Panicum maximum* cv KK16, MIRANDA *et al*, 1990) através do método de colunas que foi muito semelhante ao acumulado na planta. Já em relação a *Desmodium ovalifolium*, espécie fixadora em estudo, a estimativa do N acumulado pelo método de colunas foi um pouco menos da metade do encontrado na planta, sugerindo uma fixação de N da ordem de 40%, muito próxima ao obtido pelo método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . Não obstante, mais estudos devem ser executados com esta metodologia antes que se possa generalizar a sua utilização.

## 2.5. N<sub>2</sub> marcado isotopicamente

A única forma direta e inequívoca de se medir as contribuições da FBN é através do emprego do  $^{15}\text{N}_2$  ou do  $^{13}\text{N}_2$ . O  $^{13}\text{N}$  é um isótopo radioativo de N e possui uma meia-vida muito curta de 10,05 min. O rápido decaimento do  $^{13}\text{N}$  faz com que o seu uso seja raro e bastante

limitado para estudos de quantificação, entretanto, alguns autores mostraram a sua aplicação em estudos de curta duração para identificar os primeiros produtos derivados do processo de FBN (MEEKS *et al*, 1978). O trabalho com o  $^{15}\text{N}$  é mais fácil por ser este um isótopo estável. Contudo, uma das limitações para o uso do  $^{13}\text{N}_2$  também se aplica ao  $^{15}\text{N}_2$ . Para o trabalho com  $\text{N}_2$  marcado, é necessária a montagem de uma câmara de crescimento com atmosfera controlada e hermética para evitar contaminações do  $\text{N}_2$  externo. Na prática isso impede a aplicação do método por períodos prolongados e as condições impostas tornam o sistema muito artificial. A incorporação pela planta do  $^{15}\text{N}_2$  pode ser considerada como prova definitiva dos benefícios da FBN. Esta técnica tem sido empregada para confirmar a existência de FBN em associações entre bactérias diazotróficas e gramíneas (RUSCHEL *et al*, 1978; DE-POLLI *et al*, 1977; YOSHIDA & YONEYAMA, 1980).

## 2.6. Diluição isotópica de $^{15}\text{N}$

Das técnicas disponíveis para quantificar a FBN em leguminosas forrageiras, a mais empregada até o momento é a da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (VALLIS *et al*, 1967; HENZELL *et al*, 1968; GOODMAN & COLLISON, 1986; TA & FARIS, 1987a; 1987b; CADISCH *et al*, 1989). O maior problema associado com a utilização desta técnica no campo é aplicar o  $^{15}\text{N}$  ao solo sem alterar a disponibilidade do N no solo, de tal forma que o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N do solo seja uniforme com a área, a profundidade e seja estável com o tempo. No caso em que uma destas condições não sejam atingidas, é provável que os resultados da quantificação da FBN não sejam satisfatórios (WITTY, 1983; RENNIE, 1986; VOSE & VICTORIA, 1986; BODDEY, 1987; DANSO, 1988; BODDEY *et al*, 1990). Para avaliar o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N mineral do solo, uma planta não fixadora de  $\text{N}_2$  é utilizada como testemunha. Num solo com

enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  uniforme em extensão e profundidade, e estável com o tempo, qualquer planta retirará N do solo com o mesmo enriquecimento de  $^{15}\text{N}$ . Na realidade, porém, é muito difícil ter satisfeitas as três condições, sendo portanto de grande importância a seleção de uma planta controle adequada.

A marcação do solo em termos de área não apresenta grandes dificuldades. O maior problema é a marcação uniforme em  $^{15}\text{N}$  até a profundidade onde as raízes extraem o N para sua nutrição, o que diminuiria muito a influência das diferenças do padrão de distribuição das raízes tanto entre as variedades testadas quanto entre estas e a planta controle. Ainda mais complicado é a dificuldade de se ter uma marcação com  $^{15}\text{N}$  no N disponível do solo estável com o tempo. Se a amplitude e a frequência de variação do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no solo são grandes, a única alternativa para se ter êxito na quantificação da FBN é o uso de uma planta controle que apresente um padrão de absorção de N do solo com o tempo muito semelhante ao da planta teste (BODDEY, 1987). Deve-se destacar que é muito difícil determinar-se a curva de absorção de N do solo de uma planta fixadora de  $\text{N}_2$ , contudo quanto mais lentas as mudanças do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N disponível do solo com o tempo, menos crítica é a seleção da planta controle.

Uma planta controle ideal seria aquela em que a única diferença da planta teste fosse apenas a incapacidade de obter contribuições da FBN. Muitos autores (PEOPLES *et al*, 1989) têm recomendado o uso, como planta controle, de um genótipo não nodulante das leguminosas teste em estudo. Genótipos não nodulantes ou nodulantes ineficazes de muitas leguminosas são agora disponíveis, mas devido às muitas variações no hábito de crescimento e enraizamento dentro de uma mesma espécie, estas podem não ser apropriadas para todas as situações.

Para minimizar os problemas quanto a escolha da planta controle, uma estratégia é a de minimizar as variações na marcação de  $^{15}\text{N}$  no N disponível com o tempo. Pela facilidade, o método mais usual de enriquecimento do solo com  $^{15}\text{N}$  é através da aplicação de solução de fertilizante marcado com  $^{15}\text{N}$  (ex. uréia, sulfato de amônio, nitrato de potássio etc) na superfície do solo. BODDEY & VICTORIA (1986) encontraram que nos solos que receberam pequenas mas frequentes aplicações de  $^{15}\text{N}$ -sulfato de amônio, os enriquecimentos médios no N mineralizável em 4 camadas sucessivas de aproximadamente 10 cm foram: 0,140; 0,069; 0,048 e 0,030 átomos % de  $^{15}\text{N}$  em excesso, respectivamente. Eles também obtiveram dados que indicaram que, devido a isto, plantas com diferentes distribuições verticais de raízes absorveram N do solo com diferentes enriquecimentos de  $^{15}\text{N}$ . O problema mais importante associado com o uso de fertilizantes solúveis marcados com  $^{15}\text{N}$  se deve ao fato de que imediatamente após a aplicação destes, ocorre uma rápida queda no enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N mineral do solo, devido à contínua mineralização do N não-marcado da matéria orgânica do solo que continuamente vai diluindo o  $^{15}\text{N}$  do N mineral do solo, ou devido a perdas por lixiviação e/ou volatilização do N mineral do solo (FRIED *et al*, 1983; WITTY, 1983).

Para diminuir as mudanças temporais de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N mineral do solo, tem-se proposto a adição de pequenas quantidades de N marcado solúvel em intervalos regulares (ex. semanalmente). Esta técnica tem sido empregada por muitos autores (VALLIS *et al*, 1967; BODDEY *et al*, 1983), contudo, RENNIE (1985) tem destacado que esta técnica está sujeita a erros, se colheitas sequenciais de plantas são feitas e se a disponibilidade de N do solo é alta. Neste caso, as plantas controle e teste podem remover diferentes quantidades de N do solo, deixando quantidades diferentes de N mineral residual no solo para as subsequentes colheitas.

Além disso a adição de N marcado ao solo resultará em enriquecimento diferente do N mineral para as duas culturas, no começo do período de crescimento seguinte.

Uma outra estratégia para diminuir as mudanças temporais e a queda do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do solo é a utilização de uma fonte de liberação lenta de  $^{15}\text{N}$ . Nas diferentes formulações de liberação lenta de N, incluem-se a adição de matéria orgânica marcada com  $^{15}\text{N}$  (BODDEY, 1987) e a mistura de substratos carbonatados, como a sacarose e celulose, com fertilizantes nitrogenados solúveis, que promoverão uma imobilização e posteriormente uma liberação lenta do  $^{15}\text{N}$  adicionado (GILLER & WITTY, 1987).

Recentemente uma técnica foi descrita onde o controle não fixador de  $\text{N}_2$  foi dispensado e a extração do N do solo pela planta fixadora foi estimado usando-se os dados de várias amostragens de planta e do N mineral do solo (HAMILTON *et al*, 1992; SMITH *et al*, 1992). Com base no enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  presente na planta e no extrato de N mineral do solo, quantificou-se o total de N extraído do solo pela leguminosa. Por diferença obteve-se a contribuição da FBN. Estes autores consideraram que a técnica foi um sucesso devido a concordância dos resultados obtidos a partir do emprego de várias testemunhas. Neste mesmo raciocínio BODDEY *et al* (1996) empregaram esta técnica e testaram os resultados da estimativa do N proveniente do solo em plantas testemunhas, encontrando que a única limitação da amostragem de N mineral está relacionada com a profundidade amostrada e que melhores resultados poderiam ser obtidos aplicando-se a mesma técnica, porém ao invés de se utilizar amostragens do N mineral do solo deveria empregar-se plantas não fixadoras que amostrassem profundidades semelhantes a da planta fixadora.

## 2.7. A abundância natural de $^{15}\text{N}$ ( $\delta^{15}\text{N}$ )

A técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  baseia-se no fato de que, geralmente, o N do solo é levemente enriquecido em  $^{15}\text{N}$  em comparação ao  $\text{N}_2$  do ar (SHEARER *et al.*, 1978).

O N da atmosfera apresenta a seguinte composição isotópica: 99,6337 % de átomos de  $^{14}\text{N}$  e 0,3663% de átomos de  $^{15}\text{N}$  (JUNK & SVEC, 1958). Devido a discriminação isotópica que ocorre durante as transformações que o nitrogênio sofre no sistema solo-planta, como mineralização/imobilização e desnitrificação/nitrificação, é possível se observarem pequenas variações na composição isotópica ( $^{14}\text{N}$  e  $^{15}\text{N}$ ) no solo e nas plantas (MARIOTTI *et al.*, 1982). Normalmente esta discriminação resulta num ligeiro enriquecimento do solo e das plantas em relação ao ar atmosférico (SHEARER *et al.*, 1978; MARIOTTI, 1982). Essa diferença serve como um traçador natural para estudos de quantificação da FBN (DELWICHE & STEYN, 1970; RENNIE *et al.*, 1976), e a interpretação básica dos resultados será a mesma da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ : A planta não fixadora apresentará um enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  muito semelhante ao solo e maior do que o da planta fixadora.

O método da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para a quantificação da FBN sofre os mesmos problemas dos outros métodos isotópicos, tal como a técnica da diluição isotópica. A premissa básica é que as plantas fixadoras e não-fixadoras absorvem N do solo com a mesma marcação (SHEARER & KOHL, 1986; BODDEY, 1987). No caso do método da abundância natural, existe uma dificuldade adicional: o fracionamento isotópico que ocorre durante a assimilação de N pelas plantas. Esta dificuldade é solucionada crescendo a planta fixadora hidroponicamente em solução livre de N, pois assim o seu enriquecimento em  $^{15}\text{N}$  representará o enriquecimento do  $\text{N}_2$  atmosférico e o fracionamento isotópico associado com a fixação biológica de nitrogênio (SHEARER & KOHL, 1986). Entretanto, os valores de fracionamento encontrados em plantas crescendo em soluções hidropônicas variam conforme a estirpe e condições de crescimento, o

que pode levar a erros de estimativas da FBN quando não conhecemos as estirpes de diazotróficos em sistemas naturais.

Devido às diferenças que podem existir na exploração do volume do solo e/ou marchas de absorção de N das plantas, é aconselhável o uso de várias plantas referência (SHEARER & KOHL, 1986; PATE *et al*, 1994), tal como é recomendado quando se usa a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (BODDEY *et al.*, 1995).

### **3. A nutrição nitrogenada das leguminosas**

A seiva xilemática carrega compostos nitrogenados das raízes para a parte aérea das leguminosas, que foram originados ou do processo de FBN ou da solução do solo. Nitrato e amônio são as formas nitrogenadas mais importantes que são absorvidas da solução do solo. Embora amônio seja um intermediário no processo de assimilação de N, como será visto mais adiante, este pode ser tóxico para as plantas normalmente quando esta é a única fonte disponível de N (GOYAL & HUFFAKER, 1984). Neste caso a extração desta espécie nitrogenada pode exceder a taxa de assimilação e assim se acumular no interior da célula, uma vez que o processo assimilatório ocorre dentro dos plastídeos. O efeito tóxico é difícil de ser explicado uma vez que se confunde com a alteração de pH do meio pelo excesso de amônio (HARPER, 1994). Segundo HARPER (1994), mais espécies monocotiledôneas do que dicotiledôneas são tolerantes ao amônio.

As enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, mais conhecidos como sistema GS/GOGAT, é reconhecido como a principal rota de assimilação de amônio em plantas superiores. Por outro lado a enzima glutamato desidrogenase (GDH) tem sido encontrada em altas quantidades em tecidos senescentes e de raízes. Aparentemente, esta enzima parece operar

na reassimilação de amônio e também complementando a assimilação primária de amônio (HARPER, 1994).

A maioria das plantas toleram altos níveis de nitrato sem que haja qualquer desordem de origem fisiológica. A toxidez de nitrato está mais associada a deficiência de micronutrientes como o Fe que se retém na forma de quelados formados pelo excesso de ácidos orgânicos que são liberados para balancear o pH celular devido a absorção de nitrato (WALLACE, 1971).

Tradicionalmente o nitrato tem sido considerado como a fonte de N preferencial absorvida pelas plantas (BLOOM, 1994). A assimilação de nitrato requer dois passos enzimáticos para que o nitrato seja levado a amônio que é assimilado como demonstrado acima. O primeiro envolve a enzima nitrato redutase que requer nitrato e luz para ser induzida e reduzir nitrato a nitrito, requerendo normalmente NADH como doador de elétrons (OAKS *et al*, 1988). O seguinte passo é controlado pela enzima nitrito redutase que requer ferredoxina reduzida como doador de elétrons. Foi demonstrado que a nitrato redutase está localizada no citoplasma de células do mesófilo das folhas e que a nitrito redutase se encontra no estroma do cloroplasto onde existe suficiente potencial redutor para atividade desta enzima e assimilação de CO<sub>2</sub> (HARPER, 1994). Em condições suficientes de luz e CO<sub>2</sub>, a assimilação de nitrato nas folhas não interfere de forma significativa no desenvolvimento da planta (BLOOM *et al*, 1989). No entanto, a assimilação de nitrato nas raízes chega a consumir 25% do total de energia produzida pelo processo respiratório (BLOOM *et al*, 1992).

Nas condições tropicais foi observado que grande parte das leguminosas fixadoras de N<sub>2</sub> de origem tropical apresentam maior atividade de assimilação de nitrato nas folhas (PEOPLES *et al*, 1989), o que poderia estar relacionado com uma maior economia de energia em condições onde o suprimento de N deve ser complementado através da FBN.

Através da atividade da enzima nitrogenase localizada nos bacteróides do nódulo, o N<sub>2</sub> atmosférico é reduzido a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O complexo enzimático GS/GOGAT é responsável pela

assimilação do N formado, em esqueletos de carbono, especificamente glutamina (NEVES & HUNGRIA, 1987). Daí em diante algumas espécies transportam esse N na forma de glutamina ou asparagina ou na forma de ureídos (alantoína e ácido alantóico) e citrulina (SPRENT & SPRENT, 1990).

Os ureídos são compostos que apresentam relação C/N igual a 1, cujas moléculas são de natureza apolar. Tal fato representa uma maior economia de carbono para translocar N, que se dá de forma mais eficiente pela baixa retenção destes compostos nos vasos condutores (NEVES & HUNGRIA, 1987). No entanto, quando se consideram os custos totais de síntese e subsequente reassimilação parece não existir grandes diferenças em termos de custo de energia entre plantas que transportam amidas ou ureídos (SPRENT & SPRENT, 1990).

Foi demonstrado para soja, caupí e feijão que a via de formação de ureídos se dá através da síntese e degradação de purinas (REYNOLDS *et al*, 1982). Conforme revisto por NEVES & HUNGRIA (1987), o processo de síntese de ureídos é resultado de um sistema operante em parte em células infectadas e parte em células não infectadas dos nódulos. A síntese e degradação da purina se dá a nível de plastídio da célula infectada e o produto desta degradação, a xantina ou um precursor deste, se move para uma célula vizinha não infectada onde sofre a ação da enzima xantina desidrogenase formando ácido úrico, precursor da alantoína (DATTA *et al*, 1991).

Compostos diferentes das amidas e de alantoína e ácido alantóico, oriundos de sistemas fixadores de N<sub>2</sub> são observados na literatura. WALSH *et al* (1984) demonstrou que citrulina é o principal composto nitrogenado translocado no xilema de plantas de *Casuarina equisetifolia*, que apresentam nódulos formados por actinomicetos. Em 1986, PEOPLES *et al*. sugeriram que metil-glutamina seria um composto translocado na seiva de espécies do gênero *Arachis*. Numa reavaliação deste processo, ficou claro que embora este composto seja produzido por este gênero, parece não ter relação com a FBN, uma vez que todo o N fixado é transportado na forma de amida (PEOPLES *et al*, 1991).

Os compostos nitrogenados provenientes do sistema radicular, não são distribuídos uniformemente entre os órgãos da parte aérea. Em soja, o N marcado fornecido como alantoína foi transferido e metabolizado nas folhas jovens e nas vagens (YONEYAMA, 1984b). As folhas jovens também foram responsáveis pelo metabolismo de grande parte do N fornecido como nitrato. Já as amidas tenderam a ser metabolizadas em hastes e folhas, com pouca retranslocação para as vagens (YONEYAMA, 1984a).

#### **4. A técnica de abundância relativa de ureídos**

Muitos anos se passaram desde que MCCLURE & ISRAEL (1979) propuseram um método para estimar a proporção do N derivado da FBN de uma planta de soja baseado na composição de solutos nitrogenados presentes na seiva xilemática. Eles e muitos outros autores (HERRIDGE, 1982a; 1982b; PATE *et al*, 1980; RERKASEM *et al*, 1988) mostraram que havia uma alta correlação entre os teores de N-ureído na seiva e o percentual de N derivado da FBN. Esta técnica depende da observação de que na maioria das leguminosas forrageiras tropicais (*Desmodium*, *Centrosema*, *Calopogonium*, *Pueraria* spp., etc.), os principais produtos da fixação de  $N_2$  nos nódulos são alantoína e ácido alantóico (ureídos) (PEOPLES *et al.*, 1989). Estes ureídos são transportados para a parte aérea da planta através do xilema. Por outro lado, o N do solo absorvido por esta leguminosa é transportado no xilema principalmente nas formas de nitrato ou amidas (asparagina ou glutamina).

Observou-se que a composição nitrogenada da seiva presente nos colmos era a que melhor se relacionava com a FBN (HERRIDGE, 1982a,b; PATTERSON & LARUE, 1983) e considerou-se como o órgão mais apropriado para este tipo de estudo. Também deve-se considerar que as reações que metabolizam os compostos nitrogenados conduzidos no xilema são mínimas nos colmos e aumentam de intensidade nas folhas e vagens (YONEYAMA, 1984; 1984b).

A abundância relativa de ureídeos é determinada a partir da análise do total de ureídeos (alantoína e ácido alantóico), total de aminoácidos e de nitrato. Para isso, tem sido utilizados os métodos colorimétricos de YOUNG & CONWAY (1942), para análise de ureídeos; o de YEMM & COCKING (1955) para análise de aminoácidos e o de CATALDO *et al* (1975) ou o de GINÉ *et al* (1980) para a análise de nitrato. A razão entre o total de ureídeos pelo total de formas nitrogenadas na seiva fornece a abundância relativa de ureídeos. No caso da seiva, a análise de aminoácidos e nitrato pode ser substituída pela análise direta do total de N na seiva por digestão Kjeldhal (BREMNER & MULVANEY, 1982).

Relações quantitativas entre a composição de solutos nitrogenados nos exsudatos do xilema, ou dos extratos de caule, e diferentes contribuições da FBN podem ser conseguidas crescendo-se plantas leguminosas em vasos contendo um meio inerte livre de N (areia) (HERRIDGE & PEOPLES, 1990). As leguminosas efetivamente noduladas podem ser nutridas com soluções nutritivas com concentrações crescentes de  $^{15}\text{N}$ -nitrato produzindo tratamentos crescentes em relação à necessidade de N, ou seja maior dependência da FBN (PEOPLES *et al*, 1989). A regressão entre os valores de abundância relativa de ureídeos e as estimativas da FBN fornecem uma curva de calibração para a espécie em questão e pode ser usada para estimar a contribuição da FBN em condições de campo (HERRIDGE & PEOPLES, 1990; HERRIDGE *et al*, 1990).

A técnica de abundância relativa de ureídeos foi desenvolvida e principalmente empregada na cultura de soja (MCCLURE *et al.*, 1980; HERRIDGE, 1982a; HERRIDGE *et al.*, 1990); guandu (PEOPLES *et al*, 1988) e, mais recentemente em espécies arbustivas (HERRIDGE *et al*, 1996). Nas espécies estudadas, a extração da seiva para análise não é uma tarefa difícil e em alguns casos pode-se usar um sistema de sucção para se obter os volumes necessários para a análise (PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE *et al*, 1988). No caso especial de algumas leguminosas forrageiras, como o *Desmodium ovalifolium*, a retirada da seiva, ainda que por

processos forçados, é extremamente difícil, ou na prática, impossível para atender as quantidades requeridas para as análises.

HERRIDGE (1982a) propôs a análise de extratos de caule como uma forma de se avaliar a abundância relativa de ureídeos na nutrição nitrogenada de plantas de soja. A abundância relativa de ureídeos é calculada tomando como base apenas as concentrações de ureídeos e de nitrato, pois, no procedimento de extração, uma quantidade grande de produtos intracelulares é extraída, superestimando a concentração de aminoácidos e o total de N da seiva. Esta forma de se avaliar a abundância de ureídeos no total de N em processo de absorção pela planta foi testada posteriormente, ainda com soja (HERRIDGE & PEOPLES, 1990), onde demonstrou-se que a abundância relativa de ureídeos em extratos da matéria seca de caule com água quente (PEOPLES *et al.*, 1989), produzia uma solução representativa dos solutos existentes na seiva da planta no momento da amostragem, e tal como as metodologias de extração de seiva por vácuo e por simples exsudação, correlacionaram-se muito bem com a proporção do N derivado da FBN ( $r > 0.98$ ,  $r > 0.97$ ,  $r > 0.98$ ; respectivamente).

As metodologias de extração a vácuo e exsudação requerem maiores cuidados quanto ao ponto de amostragem e a conservação do material. Segundo HERRIDGE *et al* (1988), no período de crescimento vegetativo e florescimento da soja, existe um gradiente diferenciado de concentração dos compostos nitrogenados presentes na seiva, que se dá da base para o topo da planta. Tal fato, no caso da extração forçada, obriga que a seiva seja extraída de todo o colmo da planta para se ter uma idéia mais real da composição do total do N absorvido do solo, a não ser que seja padronizado um local e um mesmo segmento para se fazer as amostragens.

HERRIDGE (1984) demonstrou que a abundância relativa de ureídeos na seiva de soja variava com a idade e por isso sugeriu que para cada estágio de desenvolvimento da planta deveria se obter uma conversão diferente entre ureídeos e N fixado. Mais tarde PEOPLES *et al* (1988) e HERRIDGE & PEOPLES (1990), trabalhando respectivamente com guandu e soja,

demonstraram que a relação entre a abundância relativa de ureídos e a proporção de N fixado se alterava, de forma significativa, entre o período de crescimento vegetativo e o de floração e maturação de vagens. Dessa forma para uma maior exatidão na quantificação da FBN pela abundância relativa de ureídos, seriam necessárias 2 curvas de calibração, uma para o período vegetativo e outra para a floração e enchimento de grãos.

Não obstante, quando se considera a variabilidade dos dados para a obtenção da curva de calibração (PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE *et al*, 1996), e também se observa a diferença das curvas entre os 2 períodos (HERRIDGE & PEOPLES, 1990), fica a dúvida quanto à relevância desta prática com relação a estimativa final da FBN.

***Capítulo I: Considerações a respeito da amostragem de plantas de *Desmodium ovalifolium* e dosagem de ureídeos e nitrato em extratos de caule desta espécie.***

## INTRODUÇÃO

O procedimento de amostragem para obtenção de extratos de caule requer que todo o caule e pecíolos da planta sejam separados, secados a 60°C e posteriormente moídos para a preparação dos extratos, sendo que o intervalo entre a amostragem e a secagem não deve exceder 24h (HERRIDGE *et al*, 1988).

Uma importante consideração no que se refere ao desenvolvimento de um protocolo para amostragem de planta é a possibilidade da ocorrência de uma flutuação diurna no conteúdo relativo de ureídos da seiva. Segundo as avaliações feitas em soja (HERRIDGE *et al*, 1988), *Cajanus cajan* (PEOPLES *et al*, 1988), *Desmodium rensonii* e *Codariocalyx gyroides* (HERRIDGE *et al*, 1996), existe um intervalo razoável de 9:00h às 16:00h onde praticamente não existem grandes oscilações na abundância relativa de ureídos, com exceção do observado em *Codariocalyx gyroides* onde o período indicado para as amostragens restringe-se em torno do meio-dia. Seguindo a técnica de extração de solutos de caule, a abundância relativa de ureídos é obtida pela relação percentual entre a concentração de N-ureído e o somatório das concentrações do N-ureído e N-nitrato (HERRIDGE & PEOPLES, 1990).

O método de destilação a vapor para análise de nitrato cuja determinação é feita após a redução do nitrato a amônio intermediada pela Liga de Devarda é considerado um padrão para este tipo de análise (SAH, 1994). No entanto, segundo este procedimento, todo o amônio presente na amostra deve ser destilado para que, num segundo passo, somente o amônio originado das formas nítricas seja determinado. Considerando-se que cada etapa de destilação leva cerca de 3 a 4 min, as determinações de nitrato por este método tornam-se trabalhosas e consomem muito tempo, ainda sem considerar o fato de que alguns compostos nitrogenados mais lábeis podem se hidrolizar e contribuir para um aumento da fração amoniacal originada da redução do nitrato.

Uma alternativa ao uso da destilação a vapor é a adoção de um método colorimétrico, que pode tornar-se mais rápido e preciso se adaptado a um sistema de fluxo contínuo (RUZICKA & HANSEN, 1980).

Um dos métodos mais utilizados para a determinação do nitrato em tecidos de planta é o desenvolvido por CATALDO *et al* (1975), onde um produto alcalino de cor amarelo, produto da “transnitração” com ácido salicílico e sulfúrico, é lido num comprimento de onda de 430 nm. A falta de repetibilidade, coerência e sensibilidade são constantes questionamentos feitos por técnicos que utilizam este método pela primeira vez. É possível que a qualidade de reagentes e a demora na sua preparação e na condução da análise aliado ao “fator” prática, sejam os responsáveis pelas críticas negativas a este método.

Uma outra metodologia para a análise de nitrato é a que se baseia na colorimetria de nitrito, através da reação de Griss-Ilosvay, após redução do nitrato a nitrito por cádmio (Cd) cuperizado (BREMNER, 1965). Apesar de ser um método indireto, este tem se mostrado bastante sensível possibilitando a dosagem de concentrações de nitrato abaixo de 0,1  $\mu\text{gN-NO}_3^-/\text{mL}$  de extratos de solo em KCl (ALVES, 1992). A grande vantagem desta metodologia, está na sua adaptação ao sistema de fluxo contínuo (FIA) (GINÉ *et al*, 1980), viabilizando a sua utilização para determinação de nitrato em muitas amostras, de forma precisa e veloz. No entanto, SAH

(1994) relata que, de forma geral, as metodologias para determinação de nitrato baseadas na sua redução sofrem interferências de material orgânico em suspensão. De fato, alguns testes realizados com extratos de *D. ovalifolium* mostraram que havia uma perda de eficiência no processo redutor detectado pela diminuição do comprimento do pico de absorbância registrado após cada determinação. É interessante ressaltar que este efeito não era detectado em todos os extratos avaliados.

A análise de alantoína e ácido alantóico (ureídeos) tem sido feita segundo a reação Rimini-Schryver proposta por YOUNG & CONWAY (1942) com dosagem de glioxilato pelo complexo fenilhidrazona em meio ácido. Devido a sequência de hidrólises necessárias para a obtenção do glioxilato, seria bastante desejável a sua automatização. Neste sentido, PATTERSON *et al* (1982) desenvolveram um sistema de dosagem de ureídeos próprio para auto-analizador. O método proposto não se baseia na dosagem do glioxilato mas sim na dosagem do amônio formado após hidrólise dos ureídeos (reação de Berthelot). A limitação deste processo está na necessidade de se remover todas as substâncias que produzem amônia sob hidrólise e também na necessidade do autoanalisador para maior eficiência do processo. Também limitado pela necessidade de um autoanalisador é o método desenvolvido por VAN BERKUM & SLOGER (1983), que baseia-se na reação Rimini-Shriver porém, ao contrário do descrito em YOUNG & CONWAY (1942), a determinação colorimétrica se dá em meio alcalino.

Embora exista um certo consenso sobre a origem dos ureídeos estar relacionada a FBN, VAN KESSEL *et al* (1988) relataram que várias espécies não leguminosas apresentavam valores altos de alantoína e ácido alantóico. Tal fato foi explicado por HERRIDGE *et al* (1996) como sendo resultado da presença de substâncias diferentes de ureídeos na seiva de certas espécies que se comportam como ureídeos no método que emprega a reação de Rimini-Shryver. Segundo os autores do método de dosagem de glioxilato, reação Rimini-Shryver, (YOUNG & CONWAY, 1942), existem substâncias que podem comportar-se como ureídeos produzindo uma cor púrpura

durante as determinações, ou ainda, produzir cores diferentes mas que podem interferir nas determinações colorimétricas.

Neste capítulo foram realizados pequenos experimentos para se avaliar os principais questionamentos sobre o protocolo para a determinação da abundância relativa de ureídos em extratos de colmos de *D. ovalifolium*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os testes realizados utilizaram extratos obtidos de colmos de *Desmodium ovalifolium* cv Itabela.

### 1. Método de Extração de Solutos:

Plantas de *Desmodium ovalifolium* cv Itabela foram colhidas e secadas em estufa a 60 °C. As plantas colhidas foram secadas em estufa dentro das primeiras 24h após colheita para que não ocorressem significativas alterações na composição de solutos nitrogenados na planta (HERRIDGE, 1982a). Depois de secas, todos os segmentos de colmos, onde se incluem os pecíolos, foram separados e moídos em moinho tipo Wiley.

Para preparação dos extratos seguiu-se o descrito em PEOPLES *et al* (1989). Em um becker de 125 mL, colocaram-se 500 mg do material seco de colmo moído e aproximadamente 25 mL de água destilada. Levou-se esta suspensão ao aquecimento até que se completassem 3 min em ebulição. Deixou-se o material esfriar e filtrou-se todo o volume para um balão volumétrico de 50 mL, utilizando-se papel de filtro (filtração rápida). Completou-se o volume para 50 mL com água destilada.

## 2. Determinação do N-nitrato no extrato de caule de *D. ovalifolium*:

Optou-se pelo método de determinação indireta de nitrato através do procedimento de detecção de nitrito após redução por cádmio já adaptado ao FIA (GINÉ *et al*, 1980). Para tentar minimizar as interferências dos materiais orgânicos em suspensão, ou até eliminá-las, objetivou-se nesta etapa a inclusão, na linha de fluxo, de uma resina aniônica fortemente básica para tentar separar o nitrato dos interferentes dentro do sistema de análise.

### 2.1. Preparação de padrões:

Os padrões analisados foram feitos em água com concentrações de 3; 6; 18; 30; 60 e 120 nmoles  $\text{NO}_3^-/\text{mL}$ . Também foram preparados padrões em extrato de *D. ovalifolium* nas concentrações de 6; 18; 30 e 60 nmoles  $\text{NO}_3^-/\text{mL}$  de extrato.

### 2.2. Equipamento para FIA:

Espectrofotômetro digital (Micronal, mod. B342II) equipado com célula para fluxo contínuo; bomba peristáltica com 6 canais (Micronal, mod. B332II) com tubos de Tygon<sup>®</sup> (as vazões são especificadas mais abaixo), um comutador-injetor de amostras (confeccionado no Centro de Energia Nuclear para a Agricultura - CENA) equipado com bobinas de reação, tubos capilares (0.7 mm de diâmetro interno) para as conexões e um registrador.

2.3. Reagentes (concentrações e vazões dos tubos de Tygon<sup>®</sup> segundo GINÉ *et al*, 1980):

R<sub>1</sub> - 2 g de sulfanilamida, 0.1g de N-naftiletilenodiamôniodicloreto, 10 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 80% em 100mL de solução. (1,0 mL/min). Esta solução se degrada rapidamente na presença da luz e por isso deve ser mantida em frasco escuro até a análise. Pode ser armazenada em geladeira por um período máximo de 1 semana e deverá ser descartada se for observada uma coloração rosada.

R<sub>2</sub> -10g de NH<sub>4</sub>Cl, 2g de Borax (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O), 0.1g de EDTA-Na em 100mL de solução. (0,6 mL/min). Esta solução, se mantida em frasco escuro, pode ser armazenada por semanas.

Coluna de cádmio - Uma coluna de vidro, com 3 mm de diâmetro interno (d.i.) e 50 mm de comprimento, foi preenchida com limalha de Cd (40-60 mesh) cuperizada. A cuperização do Cd foi feita após a seguinte sequência: lavagem com água destilada, lavagem com HCl 0,1N, lavagem com água destilada, lavagem com CuSO<sub>4</sub> 0,1N e lavagem com água destilada.

A água destilada, com vazão modificada para 2,50 mL/min, não funciona mais como carreador para o sistema, passando a carreador para a resina, na modificação da linha de fluxo.

Amostra (3,2 mL/min).

Adicionados ao sistema acima:

Coluna de 2,8 mm d.i. e 10 mm comprimento contendo resina aniônica fortemente básica saturada com Cl (DOWEX 1-X8 - 100-200 Mesh).

Carreador - solução de NaCl 0,5N (5,0 mL/min).

## 2.4. Procedimentos:

A disposição dos componentes do sistema está mostrada na Figura 1 (seção 3.3.1 Resultados e Discussão).

Na posição I, um volume fixo de 0,270 mL do extrato, definido pelas dimensões de um tubo capilar (“loop da amostra”) (70cm comp. x 0,7mm diâmetro) é amostrado (linha A). Aumentando-se o comprimento do “loop da amostra” foi possível aumentar a sensibilidade do método. Simultaneamente a coluna com resina foi saturada com Cl<sup>-</sup> (linha C). Na posição II o carreador secundário leva a amostra até a coluna de resina que retém o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (e outros ânions) da amostra, deixando passar as grandes cadeias orgânicas de natureza apolar e pouco polar. Na posição III (retorno a posição I) a coluna foi recuperada com Cl<sup>-</sup> e o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é colocado no fluxo de análise, sendo reduzido a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> na coluna de Cd e, após interação com os reagentes 1 e 2 (linhas D e E), é medida a absorbância da cor violeta por espectrofotometria ( $\lambda = 530\text{nm}$ ).

## 3. Determinação de ureídeos em extratos de caule de *D. ovalifolium*:

A metodologia utilizada para determinação de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) nos extratos de caule de *D. ovalifolium* foi a recomendada por PEOPLES *et al* (1989) que é uma adaptação da metodologia tradicional Rimini-Shriver (YOUNG & CONWAY, 1942).

### 3.1. Preparação de padrões:

Os padrões analisados foram feitos em água com concentrações de 10; 20; 30; 50; 100 nmoles de alantoína/mL. Também foram preparados padrões em extrato de *D. ovalifolium* nas concentrações de 10; 20; 30; 50 e 100 nmoles de alantoína/mL de extrato.

### 3.2. Reagentes para o método colorimétrico (PEOPLES *et al*, 1989):

Solução de hidróxido de sódio 0,5N - 2g de NaOH diluído em 100 mL de água destilada.

Solução de ácido clorídrico 0,65N - 6,5 mL de HCl concentrado (32%) diluído em 100 mL de água destilada.

Solução de cloridrato de fenilhidrazina - 0,33 g de cloridrato de fenilhidrazina dissolvida em 100 mL de água destilada. Esta solução se degrada rapidamente na presença da luz e por isso deve ser mantida em frasco escuro até a análise. Deve ser preparada imediatamente antes da análise.

Solução de ferricianeto de potássio - 0,833 g de ferricianeto de potássio dissolvido em 50 mL de água destilada. Recomenda-se também que esta solução seja preparada imediatamente antes da análise.

Ácido clorídrico concentrado (32% = 10M).

### 3.3. Procedimento para a determinação colorimétrica:

Antes do início da análise, separou-se um volume suficiente de ácido clorídrico concentrado em um becker que foi deixado dentro de um frasco com água e gelo.

Colocou-se 0,5 mL de extrato aquoso de tecido da planta em tubo de ensaio e completou-se o volume para 2,5mL com água destilada. No caso dos padrões utilizou-se um volume de 2,5 mL de cada um sem adicionar água ao tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL da solução de hidróxido de sódio 0,5N. Misturou-se bem e colocaram-se os tubos em banho-maria de 10 a 15 minutos. Removeram-se os tubos e os deixaram esfriar à temperatura ambiente, então adicionou-se 0,5 mL da solução de ácido clorídrico 0,65N e 0,5 mL da solução de cloridrato de fenilhidrazina. Misturou-se bem e colocaram-se os tubos em banho-maria por 2 a 4 minutos. Removeram-se os tubos e imediatamente foram resfriados em um recipiente contendo água e gelo

por 15 minutos (a velocidade do resfriamento é um fator importante para o desenvolvimento da cor). Após o resfriamento, adicionaram-se 2 mL de ácido clorídrico, pré-resfriado a 0°C e 0,5 mL da solução de ferricianeto de potássio. Misturou-se bem a cada adição de ferricianeto. Após 10 minutos à temperatura ambiente, foi medida a absorbância da cor púrpura por espectrofotometria ( $\lambda = 525\text{nm}$ ).

#### 3.4. Avaliação da reação colorimétrica:

Após algumas determinações preliminares, observou-se que os extratos de caule de *D. ovalifolium* apresentavam uma variação de cor que ia desde púrpura até uma alaranjado fraco. Amostras pertencentes aos extremos destas cores foram investigadas para se saber se a coloração observada em ambas as situações seria devida a presença de ureídeos. A investigação baseou-se na comparação de espectros de absorbância nos comprimentos de onda de 400 a 700 nm utilizando-se um espectrofotômetro com correção automática do branco. Para comparação, utilizou-se um padrão de alantoína em água na concentração de 10 nmoles de alantoína/mL, que foi analisado em separado e também adicionado a cada um dos extratos.

#### 3.5. Efeito do extrato no desenvolvimento e na estabilidade da cor:

Dezesseis amostras de colmos de *D. ovalifolium* cv Itabela, de diferentes idades e obtidas de vários locais, foram utilizadas para avaliação do efeito do extrato no desenvolvimento da cor. Cada valor de absorbância encontrado para cada padrão adicionado a cada extrato foi subtraído da leitura da amostra de extrato sem adição de padrão (teoricamente seria o branco da curva de padrões adicionados ao extrato). Uma vez descontado o branco (extrato puro), cada leitura de padrão adicionado ao extrato foi relacionada com a leitura do respectivo padrão preparado em

água. Dessa forma, se o desenvolvimento da cor não é afetado pelo extrato, a relação entre os padrões adicionados a extrato e a água seria igual a 1.

Para se avaliar a estabilidade da cor obtida pelo processo analítico, extratos das mesmas amostras referidas na seção 3.2.3.4. foram lidos em espectrofotômetro multicanal durante 70 minutos a partir do início do desenvolvimento da cor. Para a comparação, também acompanhou-se o desenvolvimento de cor do padrão puro de alantoina (25 nmoles/mL) e das adições deste padrão aos extratos.

#### 4. Flutuação horária da abundância de ureídos em *D. ovalifolium*:

A avaliação foi feita em uma área de pasto consorciado de *D. ovalifolium* cv Itabela e *Brachiaria humidicola*, localizado na Estação de Zootecnia do Extremo Sul da Bahia (ESSUL), pertencente ao CEPLAC. Nesta área, o *D. ovalifolium* estabeleceu-se formando algo como “ilhas” dentro da pastagem de *B. humidicola*. Foram separadas 3 “ilhas” de *D. ovalifolium* localizadas em diferentes pontos na área de pastagem. Dessa forma foi possível também se ter uma idéia da variabilidade a nível de campo da abundância de ureídos para esta espécie, em cada momento de amostragem.

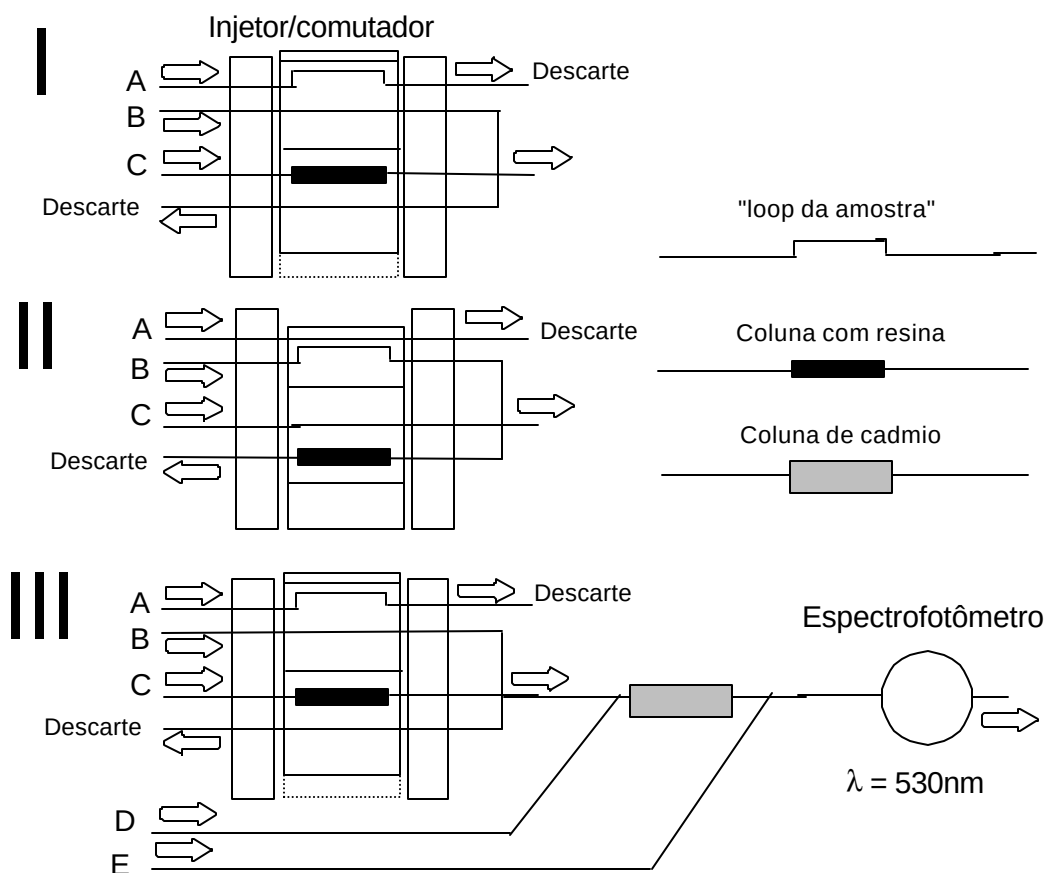
De cada uma destas “ilhas” retirou-se uma planta a cada 2 horas, à partir das 7 horas até as 19 horas. Separaram-se os colmos e pecíolos de cada planta e se colocaram para secar em estufa à 60°C. Após a secagem o material foi moído e, então, iniciou-se a preparação dos extratos em água conforme seção 3.2.1.

As quantificações de nitrato e de ureídos foram feitas segundo os procedimentos estabelecidos na seção 3.2.2.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Determinação do N-nitrato no extrato de caule de *D. ovalifolium*

Para se chegar a configuração descrita em Material e Métodos (seção 2.3), foram realizados alguns testes com o tamanho da coluna de resina, a concentração do NaCl (que entra no sistema como o trocador e recuperador da resina - Cl<sup>-</sup>) e as vazões da água destilada e, também, do NaCl. Os resultados destes testes não são mostrados. No entanto, observou-se que o aumento da concentração do NaCl não produzia um fluxo com o nitrato menos disperso (um deslocamento mais instantâneo da resina), mas sim contribuía para aumentar a linha base do sistema (maior contaminação). Variando-se o tamanho da coluna de resina (volume de resina), observava-se que quanto maior o tamanho, maior o impedimento ao fluxo e em consequência maior a diferença de linha base entre os passos II e III (Figura 1). Diminuindo-se a coluna não se observava grandes diferenças no sistema, somente tornava-se mais difícil o empacotamento da coluna. O aumento do fluxo de água destilada tendeu a diminuir a sensibilidade do método, possivelmente pelo



A - Linha de captação de amostra - vazão 3,2 mL/min.

B - Carreador secundário da amostra (água deionizada) - vazão 2,5 mL/min.

C - Carreador principal da amostra (NaCl 0,5N) - vazão 5,0 mL/min.

D - Reagente 1 ((100g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 20g Bórax + 1g EDTA-Na)/1000mL água destilada) - vazão 0,6 mL/min.

E - Reagente 2 ((0,5g N-naftiletilenodiamônicloreto + 20g sulfanilamida + 100mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85%)/1000mL água destilada) - vazão 1,0 mL/min.

Figura 1. Sistema de análise de nitrato por redução por cádmio (GINÉ *et al.*, 1980), modificado.

A resina utilizada é do tipo aniônica fortemente básica saturada com Cl (DOWEX 1-X8 - 100-200 Mesh) e foi colocada numa coluna com 1cm comp. x 2,79mm d.i.. As partículas de cádmio (20-40 Mesh) foram colocadas numa coluna com 5cm comp. x 3 mm d.i..

menor tempo de contato entre a amostra do extrato e a resina. Dessa forma, seguiram-se com os demais testes adotando-se o sistema configurado desde o princípio.

Num primeiro teste comparou-se os resultados da leitura de absorbância dos padrões em água através da configuração descrita por GINÉ *et al* (1980) contra os da leitura de absorbância dos mesmos padrões com a configuração com resina. A presença da coluna de resina cria uma maior resistência ao fluxo gerando uma maior dispersão da amostra o que reduz a quase 50% a sensibilidade do método comparada ao original (Figura 2), no entanto embora reduzidos a proximadamente metade do ideal, a resina funcionou muito bem na tarefa de separar o nitrato do meio aquoso ( $r^2 = 0,991$ ,  $p < 0,001$ ).

Foram feitos testes com esta metodologia a partir de soluções padrão de nitrato e de padrões adicionados ao extrato aquoso de caule de *D. ovalifolium*, este último para verificar possíveis interferências de substâncias orgânicas que poderiam estar sendo retiradas da solução e sendo colocadas no fluxo de análise junto com o nitrato. A análise dos padrões de nitrato em água através do sistema FIA-resina produziu uma resposta linear ( $r^2 = 0,998$ ,  $p < 0,001$ , Figura 3A). Resposta semelhante foi observada quando se analisaram os padrões adicionados ao extrato de *D. ovalifolium* (Figura 3B), sendo que a maior concentração do padrão adicionado ao extrato teve uma leitura muito alta para a configuração de atenuação do registrador (100 mV), extrapolando o comprimento do pico. Subtraindo-se a leitura obtida do extrato sem a adição dos padrões (concentração 0 de padrão) das demais leituras e relacionando-as (leitura do padrão no extrato/leitura do padrão em água - chamada na Figura 3C de razão de leituras), observou-se que os resultados ficaram muito próximos da unidade (Figura 3C). Isto indicou que as substâncias

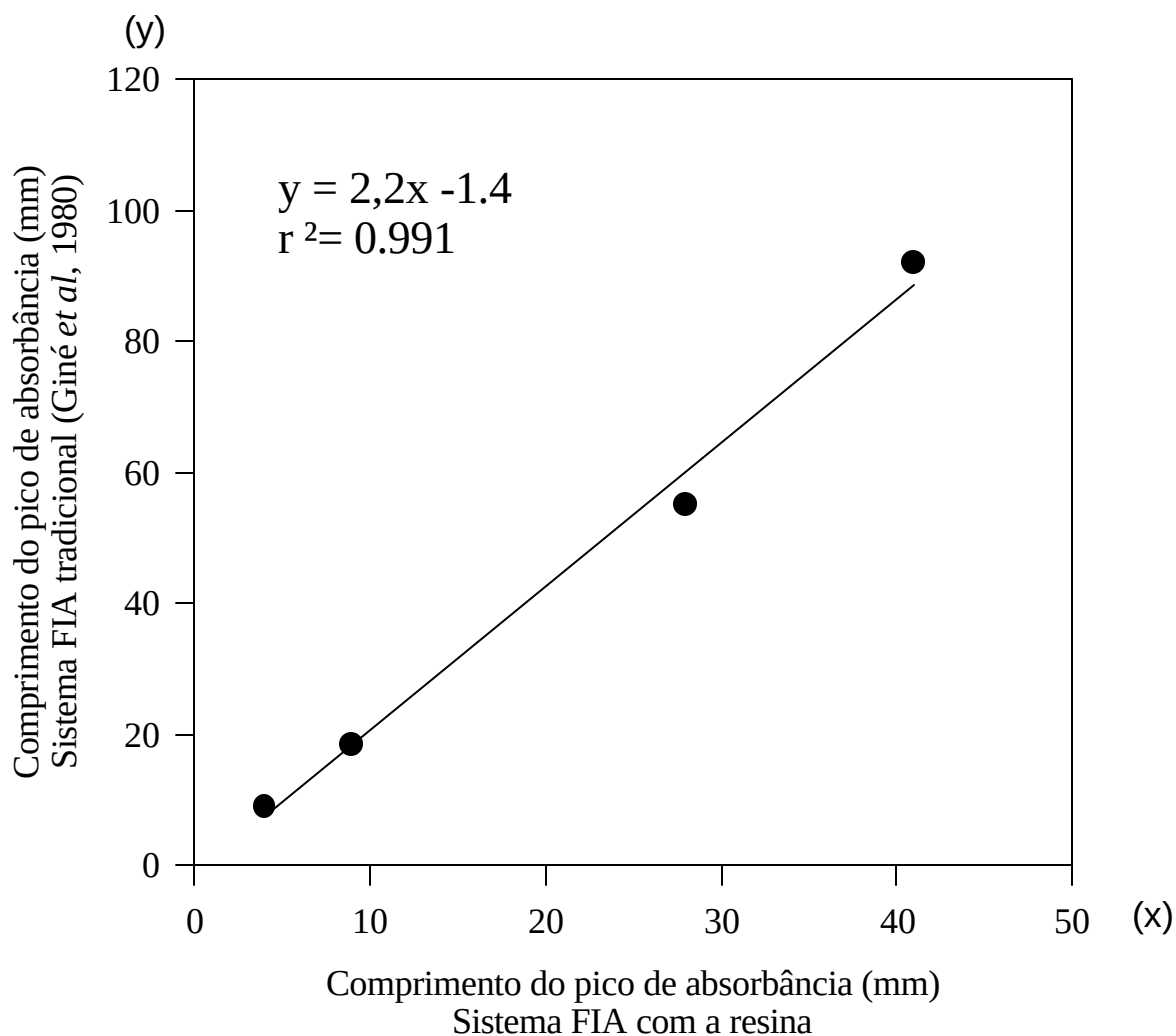


Figura 2. Regressão entre as leituras de absorbância, expressas no registrador como picos medidos em mm, de padrões de  $\text{NO}_3^-$  em água obtidas utilizando-se o sistema de análise de  $\text{NO}_3^-$  por redução por Cd adaptado a FIA, proposto por GINÉ *et al* (1980) e o sistema modificado com a inclusão de uma coluna de resina (Figura 1).

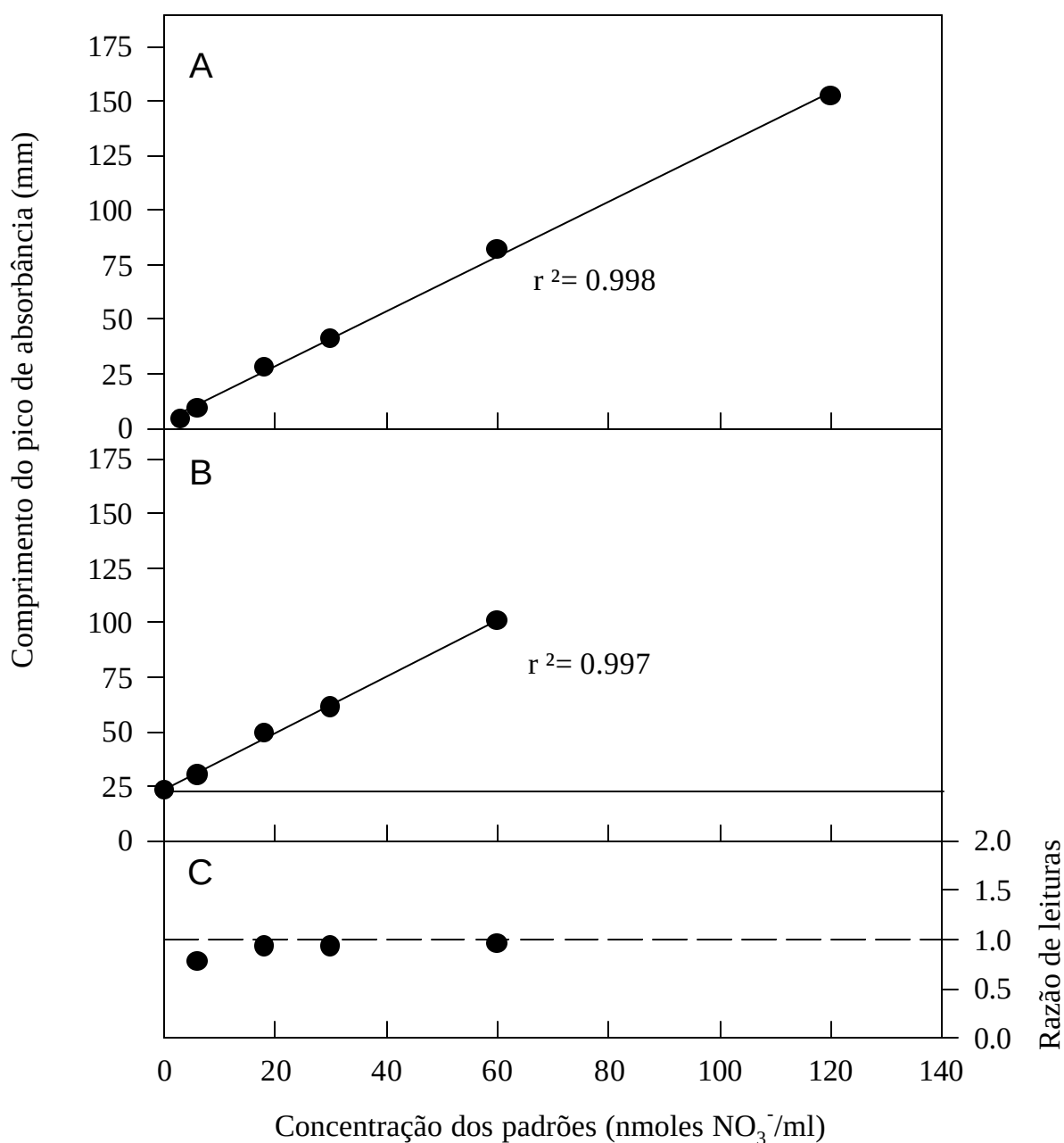


Figura 3. Regressão entre as leituras de absorbância, expressas no registrador como picos medidos em mm, de padrões de  $\text{NO}_3^-$  em água (A) e em extratos de *D. ovalifolium* (B) com as respectivas concentrações dos padrões obtidas utilizando-se o sistema de análise de  $\text{NO}_3^-$  por redução por Cd adaptado a FIA com a inclusão de uma coluna de resina (Figura 1). A Figura 3C mostra o resultado da razão de leituras dos padrões em extrato descontados do branco (linha cheia, Figura 3B) com as leituras dos respectivos padrões em água. Valor ideal igual a 1 (Linha quebrada).

presentes no extrato não interferiram no processo de troca entre o nitrato e o cloreto, e também, que as substâncias que por ventura tenham sido trocadas junto ao nitrato, não prejudicaram de forma significativa as determinações.

Embora o sistema de análise de nitrato em extratos de *D. ovalifolium* tenha se mostrado próprio para uso, alguns problemas de pouca importância para as determinações foram observados e merecem mais estudos para resolvê-los. Devido a presença da coluna de resina, o fluxo torna-se diferenciado quando o sistema se encontra no passo III ou no passo II (Figura 1). A diferença de fluxo gerada pela presença da resina faz com que a linha base (“branco do sistema”) seja alterada entre um passo e outro. Tal fato não chega a interferir nas determinações pois toda a solução que se encontra em fluxo entre o comutador de amostra e o espectrofotômetro serve para estabelecer uma nova linha base. Tal situação impede uma medição de picos mais eficiente utilizando a própria escala do papel do registrador de forma padronizada.

Outro problema observado foi em relação a resina. Observou-se que após a análise de cerca de 50 amostras, a resina tinha sua cor bastante alterada de um amarelo claro para um marrom escuro, sugerindo que substâncias orgânicas retidas na resina poderiam estar contribuindo para uma redução dos sítios de troca. Não obstante, até este limite não se observou um efeito significativo comparando-se leitura de padrões de nitrato em água, no início e no final da análise. Provavelmente, a quantidade de resina colocada na coluna permite uma grande capacidade de troca, se comparada as quantidades de nitrato nas amostras, suficientemente grande para conter cadeias orgânicas sem prejudicar a eficiência do método.

Uma limitação observada para o método está em relação ao comprimento do “loop da amostra”. Análises de padrões em extratos de caule de *D. ovalifolium* mostraram que

comprimentos superiores a 100 cm introduziam substâncias no sistema que causavam interferência nas determinações, tal como na ausência da coluna de resina (SAH, 1994).

Por fim, concluiu-se que o sistema especificado na seção 2.3., seguindo o procedimento descrito na seção 2.4., pode ser utilizado para análise de nitrato em extratos de caule de *D. ovalifolium*, respeitando as limitações discutidas anteriormente. As várias análises executadas mostraram que em média o tempo de análise é de cerca de 2 minutos por amostra, e especial atenção deve ser dada ao tempo de espera no passo II (cerca de 20 s.) e no passo III (até início da leitura da amostra - saída do pico).

### 3.2. Determinação de ureídeos em extratos de caule de *D. ovalifolium*:

Uma das preocupações com as determinações de ureídeos estava relacionada com o efeito da pigmentação amarelo-marrom do extrato de colmo de *D. ovalifolium* sobre a análise colorimétrica de ureídeos. Numa avaliação preliminar do método, observou-se que a coloração obtida das amostras variavam de coloração de um alaranjado fraco até uma cor púrpura.

Nas Figuras 4A e 4C, que mostram os espectros de absorbância do produto da análise de ureídeos dos extratos púrpura e alaranjado, respectivamente, observa-se que em qualquer uma das situações, parece existir uma interferência de fundo que gera maiores valores de absorbância nos espectros próximos ao amarelo ( $\lambda$  de 400 a 500 nm).

Ainda nas Figuras 4A e 4C, é possível se observar que os espectros dos extratos adicionados do padrão de 10 nmoles de alantoína/mL e da amostra púrpura se assemelham muito ao espectro do padrão puro de 10 nmoles de alantoína/mL, com pico máximo de absorção em torno de 525 nm. PEOPLES *et al* (1991) e HERRIDGE *et al* (1996) observaram espectros idênticos a estes na análise de padrões puros e de amostras de seiva de soja.

O espectro diferente obtido para o extrato puro da amostra alaranjada (Figura 4C) se assemelha ao observado para amostras de seiva de *Leucena leucocephala* (HERRIDGE *et al*, 1996). A diferença é que a coloração observada por estes autores era de cor marrom e surgia durante a análise colorimétrica de amostras de seiva, que são incolores. Certamente, neste caso, é possível se afirmar que substâncias diferentes dos ureídeos tenham reagido durante a análise colorimétrica e produzido uma coloração atípica como é o caso da interferência dos aldeídos, xantina, hipoxantina, ácidos pirúvico, málico e tartárico (YOUNG & CONWAY, 1942).

Subtraindo-se os valores de absorbância do espectro do extrato puro dos valores obtidos com o mesmo extrato adicionado do padrão de 10 nmoles de alantoína/mL, observa-se uma certa coincidência do espectro resultante, com o do padrão puro de 10 nmoles de alantoína/mL (Figuras 4B e 4D), sendo mais perfeita para o da amostra púrpura (Figura 4B). Isto indica que em qualquer um dos extratos havia ureídeos que geravam um efeito aditivo no caso dos extratos adicionados do padrão. A maior diferença observada no caso da amostra alaranjada (Figura 4D) parece ter ocorrido devido ao fato de que a intensidade do amarelo do extrato produz um espectro que sobrepôs ao espectro esperado para ureídeos presentes no extrato puro, que neste caso devia apresentar uma baixa concentração de ureídeos. Dessa forma, o espectro resultante da diferença entre extrato puro (superestimado) e o do extrato adicionado do padrão produz um espectro resultante de menor intensidade comparado ao do padrão puro.

Deve-se mencionar que diferente da seiva, todos os extratos de *D. ovalifolium* já apresentavam uma coloração amarelo-marrom bastante homogênea.

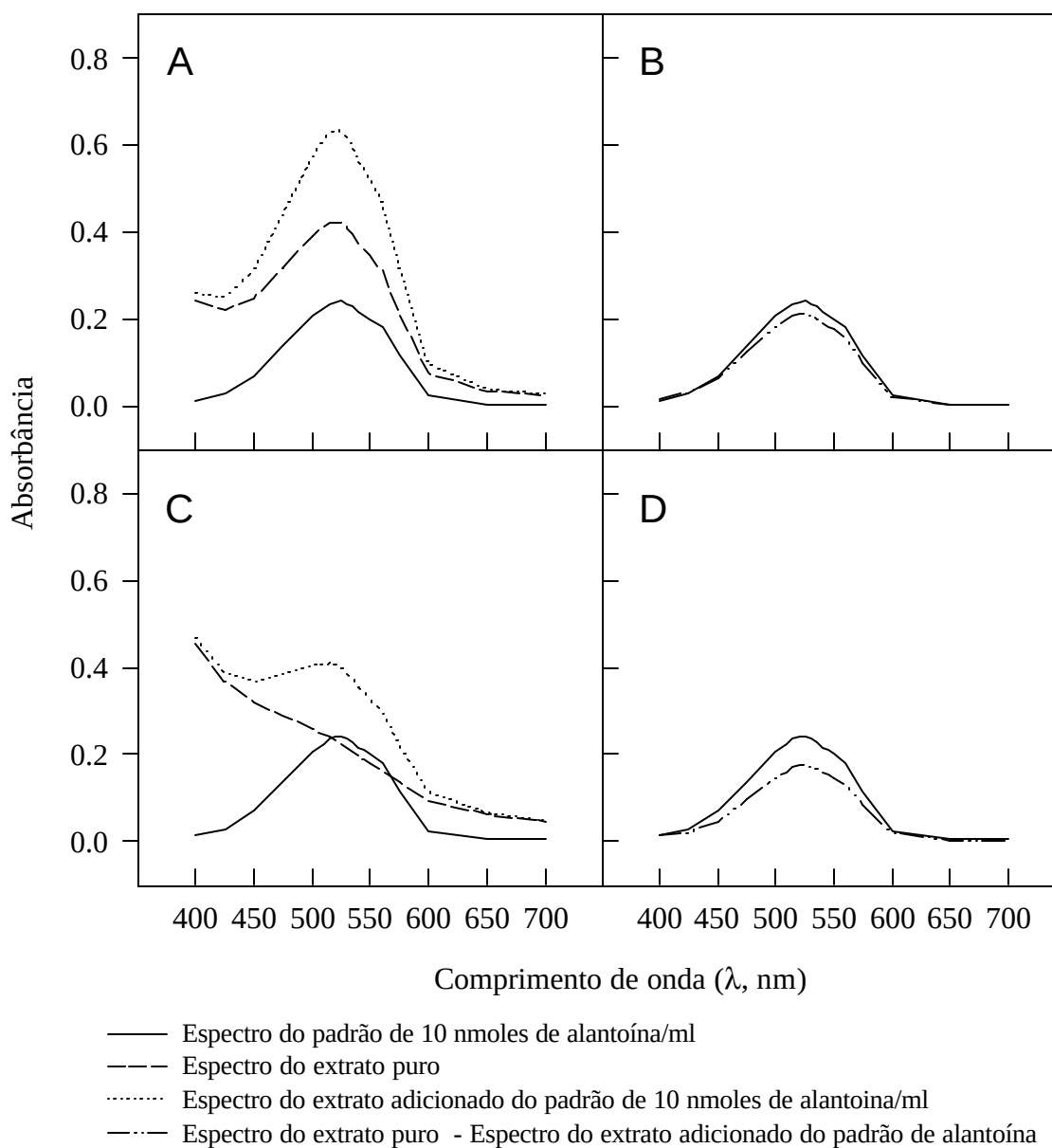


Figura 4. Espectros de absorbância do produto colorido da análise de um padrão de 10 nmoles de alantoína/mL e de extratos de caule de *D. ovalifolium*, adicionados ou não do padrão de 10 nmoles de alantoína/mL. A - espectros referentes aos extratos da amostra de cor púrpura; B - espectros do padrão de alantoína e do resultante da diferença entre os espectros do extrato puro da amostra púrpura e do adicionado do padrão; C - o mesmo que A, porém relativo a amostra alaranjada; D - o mesmo que B, porém relativo a amostra alaranjada.

Assumindo-se que as diferenças de intensidade das cores dos extratos de *D. ovalifolium* não é muito grande, concluiu-se que o limite de detecção de ureídeos, de acordo com este protocolo, estará próximo aos 10 nmoles de alantoina/mL, para *D. ovalifolium*, que é o menor valor de padrão recomendado para a análise de ureídeos (PEOPLES *et al*, 1989).

O efeito da coloração do extrato discutido acima é melhor evidenciado na Figura 5. Como se observa, a relação entre as leituras que deveria ser igual a 1, mantém-se para todos as concentrações de padrão adicionados ao extrato num limiar mais baixo. Estranhamente houve uma tendência ao efeito ser maior nas maiores concentrações do padrão. No entanto se além do efeito discutido anteriormente existe também um efeito sobre o desenvolvimento da cor, este parece não ser tão importante ao ponto de invalidar a utilização do método. Ainda mais que, independente do tipo de cor formada, observou-se uma estabilidade muito semelhante durante o tempo (Figura 6), o que poderia ser mais um suporte para confirmar a presença de ureídeos na amostra do tipo alaranjado cujo espectro de absorbância mostrou-se diferente. Nos primeiros 20 minutos após o desenvolvimento da cor, notou-se uma queda nos valores de absorbância de todas as amostras avaliada em 3%, comparado ao valor observado nos 10 minutos iniciais. Este é o tempo considerado limite por PEOPLES *et al* (1989) para que as leituras sejam feitas sem que o erro da instabilidade da cor seja significativo. Aos 60 minutos, a perda na leitura chegou a 6%, tal como observado por YOUNG & CONWAY (1942).

### 3.3. Variação diurna da abundância de ureídeos em *D. ovalifolium*:

Uma importante consideração no desenvolvimento de procedimentos de amostragem é a possível ocorrência de uma flutuação diurna no conteúdo relativo de ureídeos nos extratos de caule. Na avaliação feita neste experimento, não se observaram significativas variações na

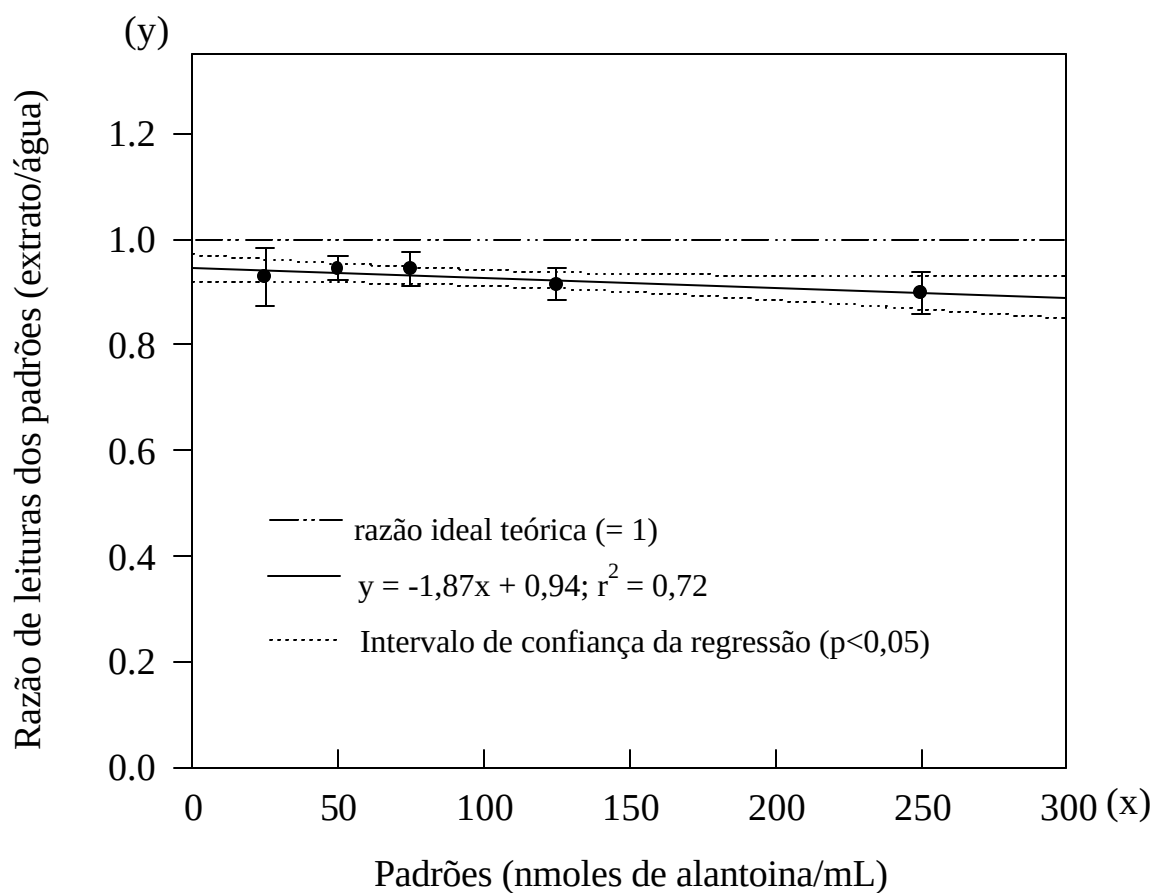


Figura 5. Efeito da matriz de extratos de tecido de caule sobre a leitura da curva padrão de ureídos (25 a 250 nmoles de alantoina/mL). Foram utilizadas amostras de caule de 16 plantas de *D. ovalifolium* de diferentes idades e origens. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

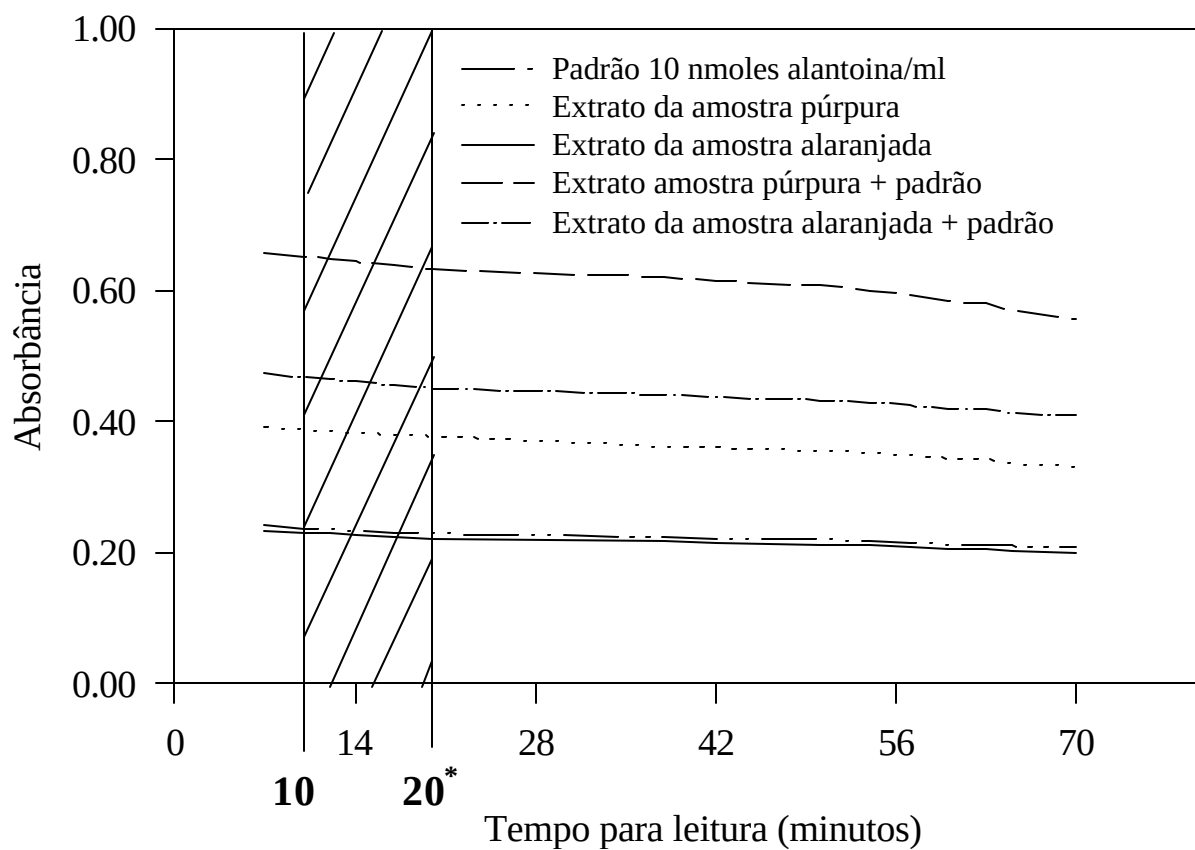


Figura 6. Variação da absorbância do produto colorido da análise de um padrão de 10 nmoles de alantoina/mL e de extratos de caule de *D. ovalifolium*, adicionados ou não do padrão de 10 nmoles de alantoina/mL. O monitoramento das leituras foi iniciado a partir dos 7 minutos de início de desenvolvimento da cor. O intervalo de 10 a 20 min. marcado na Figura corresponde ao tempo recomendado para as leituras (PEOPLES *et al*, 1989).

abundância relativa de ureídeos durante o todo o dia (Figura 7). Não obstante, houveram grandes variações nas concentrações de ureídeos (34 a 78 nmoles alantoina/mL) e nitratos (63 a 97 nmoles de nitrato/mL). PEOPLES *et al* (1988), trabalhando com guandu (*Cajanus cajan*) não observaram grandes variações na abundância relativa de ureídeos durante o dia, porém recomendaram que o horário de amostragens deveria se restringir de 9:00 às 16:30h. Nesta mesma faixa de horário também são recomendadas as amostragens para soja (MCCLURE *et al*, 1980; HERRIDGE *et al*, 1988) e *Desmodium rensonii* (HERRIDGE *et al*, 1996).

Embora não tenha sido observado neste experimento uma tendência comum de ocorrerem maiores valores de abundância relativa de ureídeos no início e final do dia (PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE *et al*, 1988, 1996), é mais seguro considerar o período recomendado para outras culturas restrito a 9:00 às 16:00h do dia.

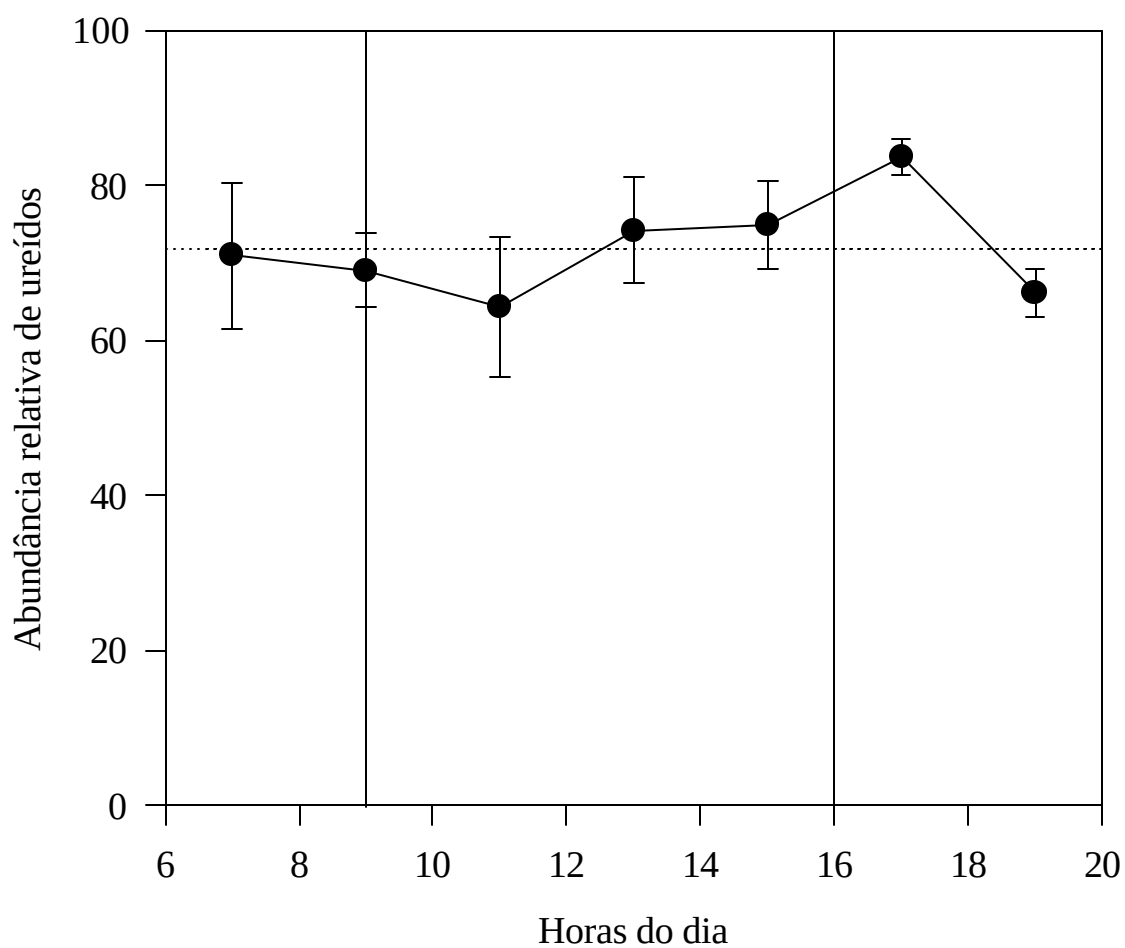


Figura 7. Flutuação diária da abundância relativa de ureídeos em extratos de caule de *D. ovalifolium*. As barras verticais indicam o erro padrão da média.

**Capítulo 2. Calibração da abundância relativa de ureídeos com a proporção do N derivado da FBN por *Desmodium ovalifolium*.**

## INTRODUÇÃO

Na parte I deste estudo, embora tenha sido observado que o método de determinação de ureídeos (YOUNG & CONWAY, 1942) sofra uma certa interferência da coloração natural do extrato de *D. ovalifolium*, a presença de ureídeos pôde ser detectada com segurança em amostras que apresentavam uma concentração desta substância superior a 10 nmoles de ureídeos/mL de extrato, limite inferior da curva padrão recomendada por PEOPLES *et al* (1989).

A técnica de abundância relativa de ureídeos só é empregada em espécies de leguminosas, cuja produção de ureídeos é dependente das contribuições da FBN para a planta (MCCLURE *et al*, 1980; PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE & PEOPLES, 1990; HERRIDGE *et al*, 1996). Estes autores demonstraram que a abundância relativa de ureídeos na seiva ou em extratos de caule era diretamente correlacionada com a dependência das plantas em estudo pelo N derivado da FBN. Não obstante, também foi observado que a relação entre a concentração de ureídeos e a contribuição de N derivado da FBN pode variar com a idade da planta (HERRIDGE, 1984), onde se sugeriu que diferentes curvas de calibração deveriam ser obtidas com a idade da cultura. Foi demonstrado posteriormente que para cobrir todo o ciclo da cultura, são suficientes uma curva de calibração para o período de crescimento vegetativo/início de floração e uma para o final da floração/enchimento de grãos (PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE & PEOPLES 1990).

Além do N fixado biologicamente, constata-se em alguns estudos que os ureídeos também podem ser originados da assimilação de amônio (FUJIHARA *et al*, 1977), sugerindo que mesmo totalmente dependente do N mineral do solo, seria possível encontrar ureídeos na planta. Ainda, a atividade da enzima nitrato-redutase nas raízes responde ao aumento das concentrações de nitrato no N mineral do solo, não obstante a concentração desta forma de N na seiva também aumente (PEOPLES *et al*, 1986).

Tantos são os fatores envolvidos nos processos de assimilação de N pelas plantas que é de se esperar que cada espécie de planta apresente uma composição diferente de solutos nitrogenados na seiva em resposta a uma mesma dependência pela FBN. Tal situação é confirmada pelas diferentes curvas de calibração, baseadas em mesmos padrões, já obtidas para diferentes espécies de plantas (HERRIDGE & PEOPLES, 1990; PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE *et al*, 1996).

Nesta etapa, objetivou-se estabelecer uma curva de calibração para *D. ovalifolium* de forma a realacionar os dados de abundância relativa de ureídeos e as contribuições da FBN a partir da técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , conforme o recomendado por PEOPLES *et al*. (1989).

## MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com 4 repetições. Os tratamentos corresponderam a 5 doses de fertilizante nitrogenado, marcado com  $^{15}\text{N}$ , e 5 colheitas.

### 1. Cultivo das plantas:

Em casa-de-vegetação, plantas de *Desmodium ovalifolium*, cv. Itabela, foram inoculadas no plantio com 2 estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR 1505 e 1507). As plantas foram crescidas em vasos de 4 litros, drenados, contendo somente areia irrigada frequentemente com solução nutritiva completa, porém sem N (GIBSON, 1980). Seis plantas de *D. ovalifolium* foram deixadas em cada vaso para que nas primeiras amostragens se conseguisse suficiente material para as análises. Após completo estabelecimento das plantas, 2 meses após o plantio, foi feito um corte de uniformização próximo à superfície do vaso de forma a permitir o rebrote. Ao mesmo tempo, deu-se continuidade às adições de solução nutritiva contendo todos os nutrientes e 5 diferentes doses de nitrato (0, 12.5, 25.0, 50.0 e 100.0 mgN/vaso/70 dias), aplicados de forma fracionada a cada 2 dias, como  $\text{K}^{15}\text{NO}_3^-$  com 0,570 atom %  $^{15}\text{N}$  em excesso. O mesmo tratamento foi dado a uma quantidade extra de vasos, suficientes para se ter 2 repetições para cada amostragem e dose

de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ , que foram semeados com *Panicum maximum* (cv KK 16), que serviu como testemunha não fixadora para a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (MIRANDA *et al*, 1990).

## 2. Amostragens:

No período da manhã, aos 14, 28, 42, 56 e 70 dias após o corte de uniformização, foram feitas as amostragens das plantas. Em cada época de colheita, as plantas de cada vaso foram divididas em folhas, colmos e pecíolos, raízes e nódulos. No caso de *P. maximum* somente raízes e parte aérea. No mesmo dia, todo o material foi colocado em estufa para secagem a 65°C, por 72 horas. Após esta etapa foram tomados os pesos secos de cada parte da planta e seguiu-se com a moagem destas para análises posteriores.

## 3. Análise química das amostras:

Cada parte das plantas de *D. ovalifolium* e de *P. maximum*, já secas e moídas, foram analisadas para N total através da digestão Kjeldahl das amostras e posterior quantificação através de destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (BREMNER & MULVANEY, 1982). A alíquota titulada foi acidificada e colocada para secar em estufa a 50°C a fim de se prepararem as amostras para análise de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  em espectrômetro de massas VG903 ISO-GAS (URQUIAGA *et al*, 1992).

Foram preparados extratos aquosos do material seco de colmos de *D. ovalifolium* conforme o descrito na seção 3.2.1. Nestes extratos dosaram-se a fração nitrato, através da metodologia de fluxo contínuo (seção 3.2.2.), a fração ureído (alantoína + ácido alantóico), segundo o descrito na seção 3.2.3, e também o N total de acordo com o estabelecido por LIAO, (1980). Na dosagem de N total do extrato, pipetou-se uma alíquota de 10 mL do extrato e se adicionou 1 mL de ácido sulfúrico concentrado juntamente com 200 mg de liga de Devarda. Adicionaram-se algumas gotas (~3) de octanol aos tubos de ensaio para prevenir a formação de espuma. Os tubos foram

deixados uma noite e pela manhã se adicionaram 1,1g de mistura catalizadora (100:10:1 de  $K_2SO_4$ ,  $CuSO_4$  e Se, respectivamente) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Em seguida iniciou-se o processo de digestão Kjeldahl e dosagem por destilação à vapor e titulometria.

#### 4. Cálculos:

A contribuição da FBN para *D. ovalifolium* foi calculada para cada colheita por duas formas:

Na primeira, seguiu-se o método tradicional (BODDEY, 1987) em que o N na planta derivado da FBN (%Ndfa) é calculado pela fórmula:

$$\%Ndfa = \left( 1 - \frac{\% \text{átomos de } ^{15}\text{N em excesso em } D. ovalifolium}{\% \text{átomos de } ^{15}\text{N em excesso em } P. maximum} \right) \times 100$$

Na segunda, o %Ndfa foi calculado através do método de simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1986). De acordo com este método, uma curva do tipo logística, descrita por WITTY (1983) é ajustada aos dados de N total e de recuperação de  $^{15}\text{N}$  (produto do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  em excesso pelo N total) determinados em cada colheita. A função utilizada foi a seguinte:

$$N \text{ total ou recup. } ^{15}\text{N} = \frac{N_m}{1 + \exp(-k \cdot (x \text{ (tempo em dias)} - T_m))},$$

onde  $N_m$ ,  $k$  e  $T_m$  são constantes que representam, respectivamente, a máxima quantidade de N acumulado, a constante de acúmulo de N e o tempo para que a planta acumule a metade de  $N_m$ . Obtidas as constantes para cada conjunto de dados de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$ , é possível, através das equações obtidas estimar valores de N total e de recuperação de  $^{15}\text{N}$  para cada dia dentro do período avaliado. Fazendo-se isto para o conjunto de dados relativos ao *P. maximum*,

testemunha não fixadora, é possível se determinar o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do substrato de crescimento a cada dia  $[(^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}})\times 100]$ , assumindo que todo o  $^{15}\text{N}$  e todo o N total desta espécie seja proveniente do substrato onde cresce (areia + solução nutritiva + adubo marcado com  $^{15}\text{N}$ ). Agora sabendo-se que % átomos  $^{15}\text{N}$  em excesso ( $\%^{15}\text{N}_{\text{xs}}$ ) =  $[(^{15}\text{N}/\text{N}_{\text{total}})\times 100]$ , e que todo o  $^{15}\text{N}$  presente na planta de *D. ovalifolium* só pode ter vindo do substrato onde cresce (o mesmo do *P. maximum*), é possível calcular a fração do N total do *D. ovalifolium* que veio do substrato ( $\text{N}_{\text{subst}}$ ):

$$\text{N}_{\text{subst}} = \frac{\text{recup. } ^{15}\text{N do } D. \text{ ovalifolium}}{\% ^{15}\text{N}_{\text{xs}} \text{ calculado com o } P. \text{ maximum}},$$

e dessa forma, a diferença entre o valor do N total acumulado por *D. ovalifolium* e o valor do diário do  $\text{N}_{\text{subst}}$  calculado, também para *D. ovalifolium*, dará a quantidade diária de N derivado da FBN, que dividida pelo N total diário e multiplicada por 100 dará o percentual de derivado da FBN no N acumulado a cada dia ( $\text{Ndfa}/\text{dia}$ ). Agora somando-se de forma cumulativa com os dias o valor de  $\text{Ndfa}/\text{dia}$ , chega-se ao %Ndfa em cada data de colheita.

A abundância relativa de ureídos (ARU) foi calculada usando-se a seguinte expressão:

$$\text{ARU} = \left( \frac{4 \times \text{nmoles de ureídos}}{\text{nmoles de nitrato} + 4 \times \text{nmoles de ureídos}} \right) \times 100.$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Avaliação do crescimento da planta

Não se observou em nenhuma das espécies em estudo a presença de órgãos reprodutivos durante o período experimental.

O crescimento de *P. maximum* e *D. ovalifolium* foram significativamente favorecidos pela adição do N-KNO<sub>3</sub> (Figura 8A e 8B, respectivamente). Como era de se esperar o efeito das doses de N foi mais evidente em *P. maximum*, tanto no acúmulo de matéria seca como no acúmulo de N (Tabela 1), sendo que, no pior dos casos, pelo menos triplicou o acúmulo de N desta gramínea, quando se compara a dose 12,5 mgN/vaso com a de 100,0 mgN/vaso. A recuperação de <sup>15</sup>N por esta espécie não fixadora de N<sub>2</sub> teve incrementos semelhantes ao do total de N, o que pode ser confirmado pela uniformidade dos valores de enriquecimento de <sup>15</sup>N (Tabela 1); exceção feita aos valores obtidos para a primeira colheita, nas menores doses de N, que revelam a pré-existência de uma quantidade extra de N não marcado, originada da contaminação do substrato e das sementes (WITTY, 1983).

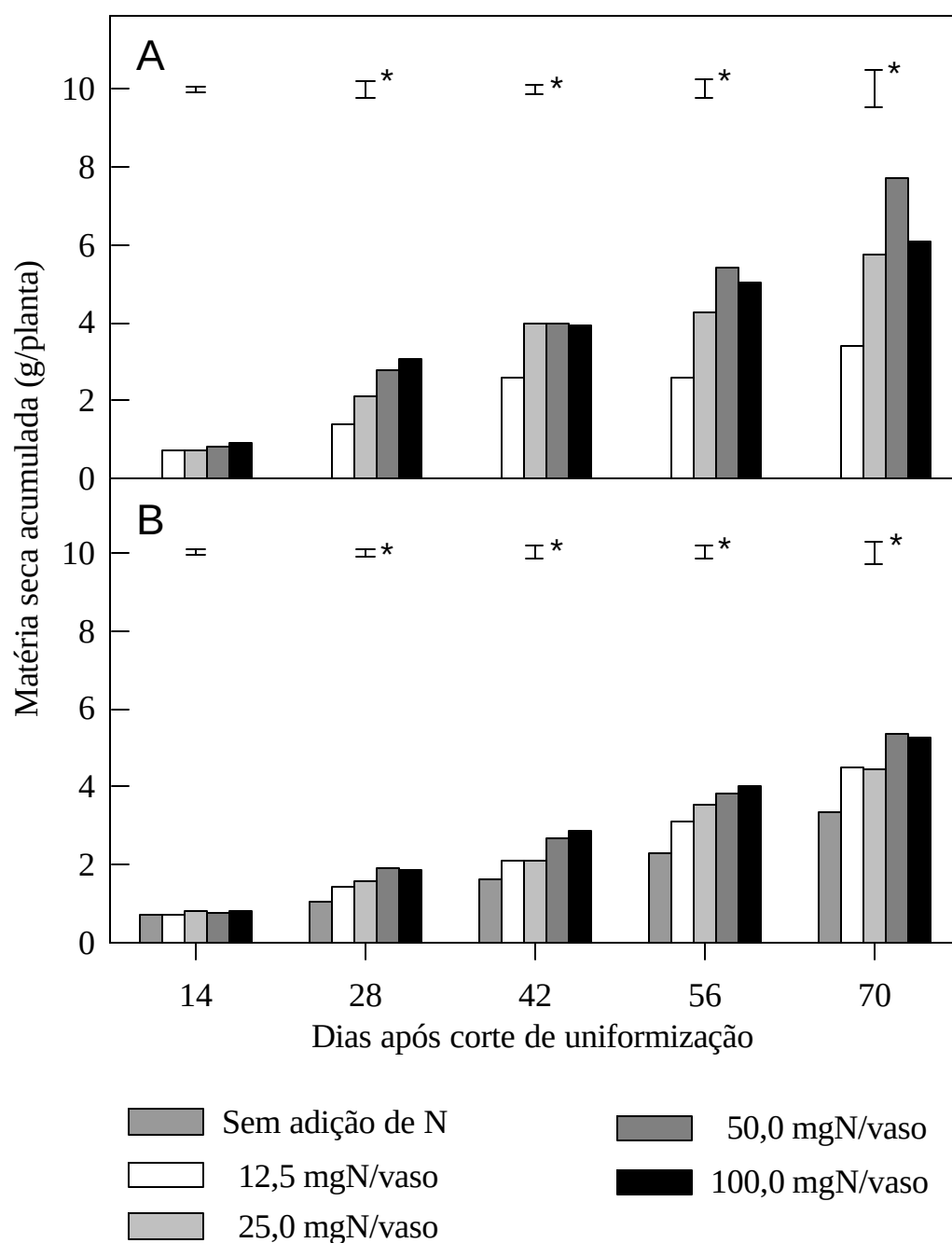


Figura 8. Acumulação de matéria seca em várias épocas de colheita por plantas de (A) *P. maximum* cv KK16 e (B) *D. ovalifolium* cv Itabela, crescidas em vasos contendo areia e solução nutritiva com variadas doses de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ . As barras verticais correspondem a diferença mínima significativa. A presença do asterisco indica a existência de diferença significativa (Teste de Tukey;  $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Dados de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  em excesso, N total acumulado e  $^{15}\text{N}$  recuperado, em várias épocas de amostragem, por *P. maximum* cv KK16 e *D. ovalifolium* cv Itabela, cultivados em vasos contendo areia e solução nutritiva com variadas doses de  $^{15}\text{N}$ - $\text{KNO}_3$

| Tratamentos | <i>P. maximum</i> cv KK16                      |                   |                                               |                                        | <i>D. ovalifolium</i> cv Itabela |                                  |                                        |
|-------------|------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
|             | Dose de $\text{K}^{15}\text{NO}_3$<br>mgN/vaso | N total<br>mg/pl. | %Átomos<br>de $^{15}\text{N}$ xs <sup>3</sup> | Recup.<br>de $^{15}\text{N}$<br>µg/pl. | N total<br>mg/planta             | %Átomos<br>de $^{15}\text{N}$ xs | Recup.<br>de $^{15}\text{N}$<br>µg/pl. |
| 14          | 0                                              | -                 | -                                             | -                                      | 9,53                             | -                                | -                                      |
|             | 12,5                                           | 8,11              | 0,306                                         | 24,80                                  | 11,04                            | 0,115                            | 12,63                                  |
|             | 25,0                                           | 12,70             | 0,408                                         | 52,06                                  | 13,31                            | 0,189                            | 24,74                                  |
|             | 50,0                                           | 18,10             | 0,456                                         | 82,41                                  | 14,21                            | 0,282                            | 40,09                                  |
|             | 100,0                                          | 21,00             | 0,460                                         | 96,37                                  | 17,33                            | 0,307                            | 54,09                                  |
|             | DMS <sup>2</sup>                               | 6,53              | 0,025*                                        | 30,72                                  | 2,61*                            | 0,042*                           | 9,96*                                  |
| 28          | 0                                              | -                 | -                                             | -                                      | 13,36                            | -                                | -                                      |
|             | 12,5                                           | 12,64             | 0,402                                         | 50,41                                  | 19,36                            | 0,152                            | 28,85                                  |
|             | 25,0                                           | 22,67             | 0,488                                         | 108,69                                 | 22,99                            | 0,234                            | 53,49                                  |
|             | 50,0                                           | 37,86             | 0,516                                         | 195,20                                 | 30,36                            | 0,359                            | 108,86                                 |
|             | 100,0                                          | 57,45             | 0,509                                         | 292,68                                 | 36,02                            | 0,437                            | 157,46                                 |
|             | DMS                                            | 5,27*             | 0,079                                         | 22,78*                                 | 3,56*                            | 0,039*                           | 9,42*                                  |
| 42          | 0                                              | -                 | -                                             | -                                      | 19,73                            | -                                | -                                      |
|             | 12,5                                           | 16,85             | 0,392                                         | 65,82                                  | 28,33                            | 0,113                            | 31,59                                  |
|             | 25,0                                           | 31,42             | 0,475                                         | 149,16                                 | 27,71                            | 0,219                            | 60,30                                  |
|             | 50,0                                           | 45,45             | 0,522                                         | 237,02                                 | 36,89                            | 0,359                            | 132,58                                 |
|             | 100,0                                          | 57,10             | 0,529                                         | 302,41                                 | 43,89                            | 0,466                            | 203,81                                 |
|             | DMS                                            | 13,98*            | 0,046*                                        | 76,30*                                 | 5,47*                            | 0,028*                           | 16,53*                                 |
| 56          | 0                                              | -                 | -                                             | -                                      | 27,06                            | -                                | -                                      |
|             | 12,5                                           | 15,51             | 0,433                                         | 66,94                                  | 37,20                            | 0,108                            | 39,44                                  |
|             | 25,0                                           | 33,69             | 0,483                                         | 162,80                                 | 40,90                            | 0,193                            | 78,04                                  |
|             | 50,0                                           | 53,37             | 0,499                                         | 266,05                                 | 45,41                            | 0,341                            | 154,09                                 |
|             | 100,0                                          | 76,31             | 0,539                                         | 411,36                                 | 51,20                            | 0,471                            | 241,51                                 |
|             | DMS                                            | 10,96*            | 0,015*                                        | 57,66*                                 | 3,89*                            | 0,025*                           | 24,16*                                 |
| 70          | 0                                              | -                 | -                                             | -                                      | 37,81                            | -                                | -                                      |
|             | 12,5                                           | 17,16             | 0,446                                         | 76,44                                  | 50,84                            | 0,083                            | 41,79                                  |
|             | 25,0                                           | 43,96             | 0,429                                         | 188,75                                 | 52,03                            | 0,168                            | 87,39                                  |
|             | 50,0                                           | 63,62             | 0,490                                         | 310,36                                 | 60,39                            | 0,303                            | 182,32                                 |
|             | 100,0                                          | 96,25             | 0,543                                         | 522,73                                 | 64,86                            | 0,463                            | 300,70                                 |
|             | DMS                                            | 18,51*            | 0,047*                                        | 68,53*                                 | 4,73*                            | 0,045*                           | 27,40*                                 |

<sup>1</sup> Dias após o corte de uniformização; <sup>2</sup> Mínima diferença significativa (P=0,05); <sup>3</sup> % átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso. A presença do asterisco indica a existência de diferença significativa entre tratamentos de fertilização com N.

O efeito das doses de N em *D. ovalifolium* foi mais evidente em relação ao acúmulo de N pela planta (Tabela 1). Contudo, a variação nas doses de N apenas dobrou a quantidade de N acumulada em cada tratamento, comparando-se o tratamento da dose 12,5 mgN/vaso com o de máxima dose (100 mgN). Ainda, a uniformidade observada para o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  de *P. maximum* não se repetiu para o *D. ovalifolium*, que revelou um crescente enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  com a dose de N fornecida, em todas as épocas de amostragem, o que sugere variados graus de dependência pela FBN.

## 2. Curvas de simulação e a estimativa de N derivado da FBN (%Ndfa)

As curvas de acumulação de N e de recuperação de  $^{15}\text{N}$  obtidas com a aplicação da equação de WITTY (1983) ajustaram-se muito bem aos dados originais obtidos da gramínea e da leguminosa, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para o acúmulo de N, variando de 0,91 a 0,97 e 0,95 a 0,99, para *P. maximum* e *D. ovalifolium*, respectivamente, e para a recuperação de  $^{15}\text{N}$ , variando de 0,92 a 0,98 para *P. maximum* e, invariavelmente igual a 0,96 para *D. ovalifolium* (Figuras 9 e 10, respectivamente).

O ajuste dos pontos originais à curva de acumulação de WITTY (1983), permitiu se conhecer o valor das constantes de cada curva ( $N_m$ ,  $k$  e  $T_m$ ) (Tabela 2) e com isso determinar a acumulação diária de N total e a recuperação diária de  $^{15}\text{N}$  de ambas as espécies. Considerando o cv KK16 de *P. maximum* como uma planta não fixadora de  $\text{N}_2$  (MIRANDA *et al*, 1990), calculou-se o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  no N presente no substrato de crescimento a cada dia ( $N_{\text{subst}} = [N_{\text{total}}/^{15}\text{N}] \times 100$ ). Com estes valores diários de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  e com os respectivos valores diários de recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *D. ovalifolium* estimou-se a quantidade de N do solo acumulada por *D. ovalifolium* durante o período experimental (Figura 11). A este tipo de cálculo denominou-se simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996).

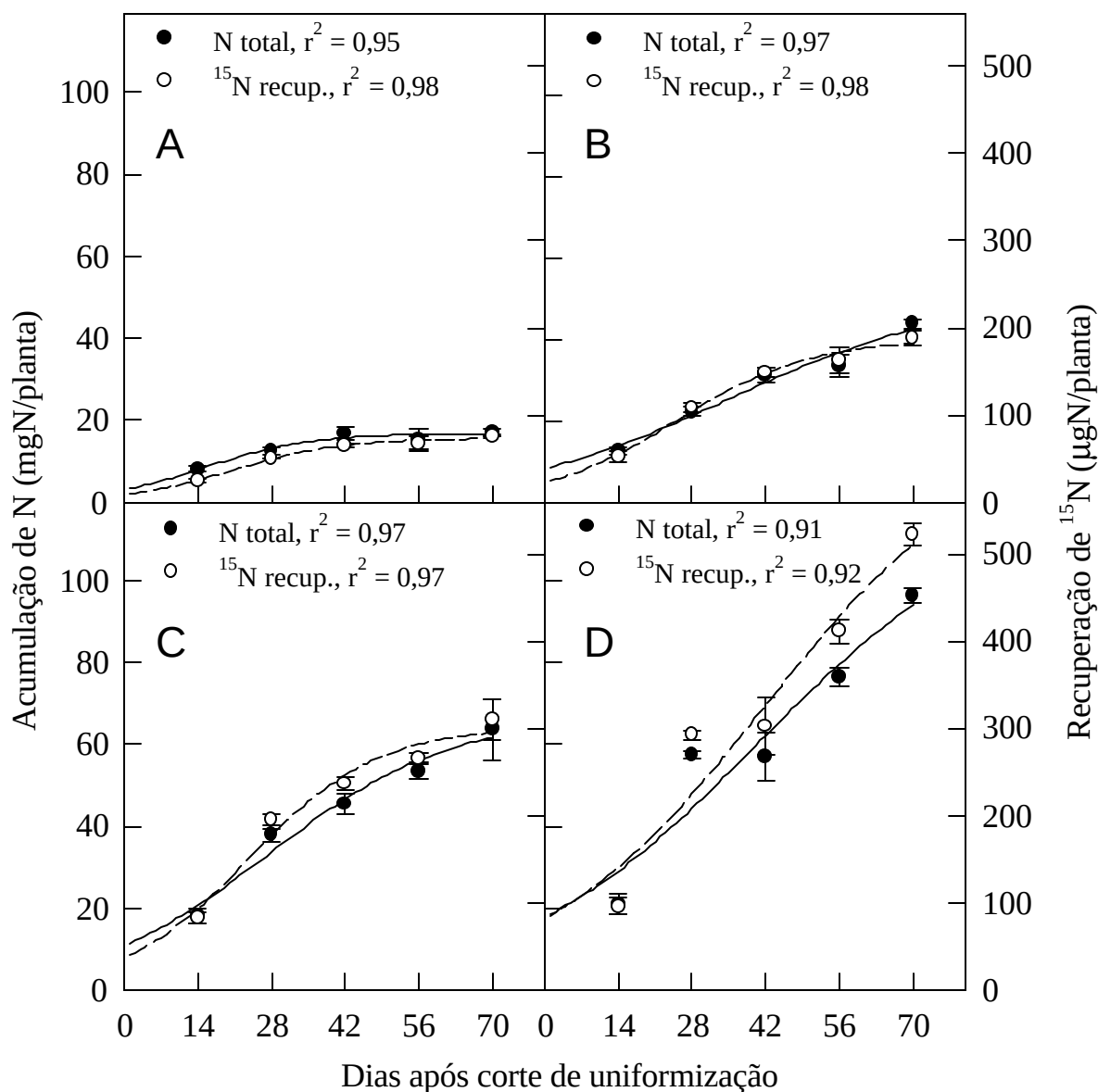


Figura 9. Simulação do acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* cv KK16 utilizando a curva de acumulação proposta por WITTY (1983), para os tratamentos de dose de N de A - 12,5 mgN/vaso, B - 25,0 mgN/vaso, C - 50,0 mgN/vaso e D - 100,0 mgN/vaso, durante todo o período experimental (70 dias após o corte de uniformização). Os coeficientes de determinação representam o grau de ajuste da curva aos dados originais. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto.

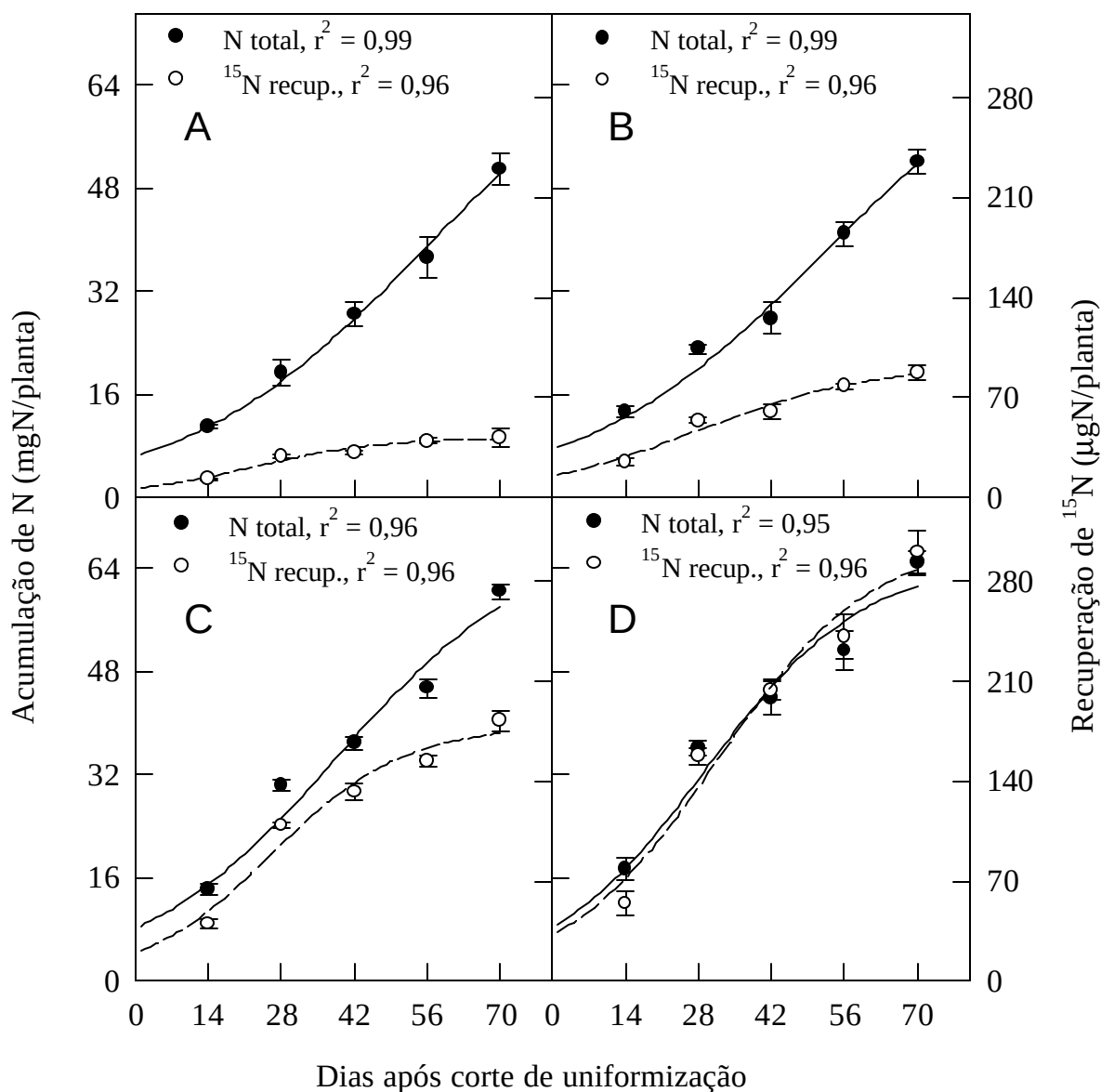


Figura 10. Simulação do acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *D. ovalifolium* cv Itabela, utilizando a curva de acumulação proposta por WITTY (1983), para os tratamentos de dose de N de A - 12,5 mgN/vaso, B - 25,0 mgN/vaso, C - 50,0 mgN/vaso e D - 100,0 mgN/vaso, durante todo o período experimental (70 dias após o corte de uniformização). Os coeficientes de determinação representam o grau de ajuste da curva aos dados originais. As barras verticais representam a o erro padrão de cada ponto.

Tabela 2. Valores obtidos para os parâmetros da curva de acumulação de WITTY (1983) aplicada aos dados originais de acumulação de N total e de recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* e *D. ovalifolium*, para cada dose de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ . Também é apresentado o coeficiente de determinação de cada curva obtida.

| Dose de N<br>aplicada<br>(mgN/vaso)                              | Parâmetros das curvas de acumulação |               |             |       |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------|-------|
|                                                                  | N total (mgN/planta)                |               |             |       |
|                                                                  | $N_{\max}$                          | k             | $t_m$       | $r^2$ |
| <i>D. ovalifolium</i>                                            |                                     |               |             |       |
| 12,5                                                             | 76,1 (15,9)*                        | 0,044 (0,007) | 55,9 (10,5) | 0,99  |
| 25,0                                                             | 75,5 (22,3)                         | 0,043 (0,011) | 51,9 (15,4) | 0,99  |
| 50,0                                                             | 69,4 (15,3)                         | 0,052 (0,017) | 38,7 (10,9) | 0,96  |
| 100,0                                                            | 65,4 (8,2)                          | 0,066 (0,019) | 29,3 (5,9)  | 0,95  |
| <i>P. maximum</i>                                                |                                     |               |             |       |
| 12,5                                                             | 16,9 (1,0)                          | 0,098 (0,036) | 15,2 (3,0)  | 0,95  |
| 25,0                                                             | 51,1 (13,3)                         | 0,046 (0,020) | 35,1 (12,7) | 0,97  |
| 50,0                                                             | 66,7 (9,2)                          | 0,059 (0,021) | 27,6 (6,1)  | 0,97  |
| 100,0                                                            | 119,8 (67,6)                        | 0,043 (0,034) | 40,3 (30,2) | 0,91  |
| $^{15}\text{N}$ recuperado ( $\mu\text{g}^{15}\text{N/planta}$ ) |                                     |               |             |       |
| <i>D. ovalifolium</i>                                            |                                     |               |             |       |
| 12,5                                                             | 41,7 (3,9)                          | 0,081 (0,030) | 22,2 (4,1)  | 0,96  |
| 25,0                                                             | 93,5 (14,2)                         | 0,059 (0,023) | 28,0 (6,8)  | 0,96  |
| 50,0                                                             | 179,0 (19,7)                        | 0,079 (0,029) | 26,3 (5,0)  | 0,96  |
| 100,0                                                            | 310,5 (49,6)                        | 0,067 (0,026) | 31,7 (6,7)  | 0,96  |
| <i>P. maximum</i>                                                |                                     |               |             |       |
| 12,5                                                             | 73,6 (3,6)                          | 0,097 (0,022) | 20,6 (2,2)  | 0,98  |
| 25,0                                                             | 187,4 (11,4)                        | 0,078 (0,017) | 25,1 (3,4)  | 0,98  |
| 50,0                                                             | 310,2 (25,8)                        | 0,083 (0,027) | 23,7 (4,1)  | 0,97  |
| 100,0                                                            | 648,9 (331,0)                       | 0,046 (0,032) | 41,7 (26,5) | 0,92  |

\*Os valores entre parênteses representam o erro padrão de cada parâmetro.

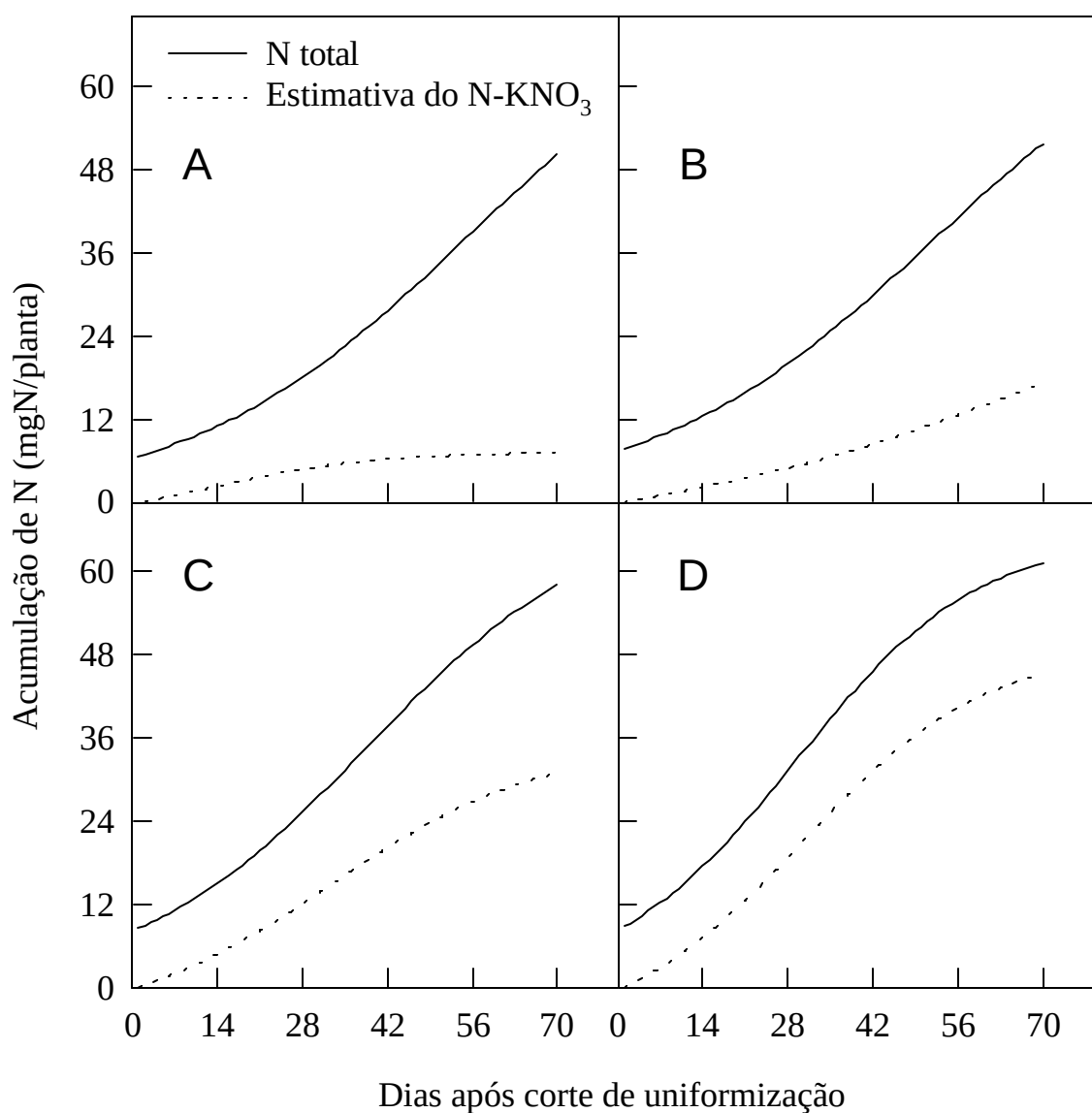


Figura 11. Acumulação de N total de plantas de *D. ovalifolium* segundo a curva de acumulação de WITTY (1983), e estimativa do N proveniente do fertilizante (<sup>15</sup>N-KNO<sub>3</sub>) adicionado nas doses de A - 12,5 mgN/vaso, B - 25,0 mgN/vaso, C - 50,0 mgN/vaso e D - 100,0 mgN/vaso, durante todo o período experimental (70 dias após o corte de uniformização).

No entanto, se observada a Figura 11D, fica claro que existia uma quantidade extra de N não marcado, antes das adições do fertilizante marcado, que aumentou muito pouco até o final das amostragens (contribuição da FBN), visto o quase paralelismo entre as curvas de acumulação. Essa situação sugere que já existia uma quantidade inicial de N não marcado no sistema, certamente relativo ao N contido nas raízes que permaneceram nos vasos após o corte de uniformização e início das aplicações de fertilizante marcado. Nos demais tratamentos de N, esse comportamento fica mascarado pela contribuição da FBN que ocorreu durante o período de colheitas.

As estimativas da contribuição da FBN (%Nd<sub>fa</sub>) para *D. ovalifolium*, sujeito a diferentes disponibilidades de N mineral, podem ser obtidas por caminhos diferentes tomando como base os dados originais de enriquecimento de <sup>15</sup>N (Tabela 1) e as curvas de simulação (Tabela 2) (BODDEY *et al*, 1996). Com as curvas de simulação também é possível estabelecer o %Nd<sub>fa</sub> no N acumulado a cada dia, ao contrário do método tradicional que fornece somente um valor integrado de %Nd<sub>fa</sub> até a data de colheita da planta.

Para cada data de colheita as estimativas de %Nd<sub>fa</sub> foram maiores, sendo que o método tradicional forneceu valores superiores aos estimados pelas curvas de simulação (Tabela 3) com uma tendência de se diminuir esta diferença em direção às últimas colheitas.

As estimativas de %Nd<sub>fa</sub> obtidas pelo uso direto dos dados originais de enriquecimento de <sup>15</sup>N de *P. maximum* e *D. ovalifolium*, integram todo o N não marcado presente no sistema até a última colheita, onde se incluiu o N das raízes remanescentes após o corte de uniformização.

Tabela 3 - Estimativas da contribuição da FBN para plantas de *D. ovalifolium* cv Itabela utilizando-se o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , tendo como testemunha *P. maximum* cv KK16 e o método de simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996b).

| DAC <sup>1</sup> | Dose de $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ mgN/vaso |                     |                |      |        |      |      |        |      |       |        |      |
|------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------|------|--------|------|------|--------|------|-------|--------|------|
|                  | 12,5                                        |                     |                | 25,0 |        |      | 50,0 |        |      | 100,0 |        |      |
|                  | A <sup>2</sup>                              | B <sup>3</sup><br>% | C <sup>4</sup> | A    | B<br>% | C    | A    | B<br>% | C    | A     | B<br>% | C    |
| 14               | 62,6                                        | 18,8                | 52,1           | 53,8 | 21,0   | 59,6 | 38,1 | 11,4   | 27,3 | 33,3  | 8,9    | 17,4 |
| 28               | 62,1                                        | 36,8                | 75,1           | 52,0 | 37,0   | 65,3 | 30,4 | 18,7   | 31,3 | 14,1  | 12,1   | 14,8 |
| 42               | 71,2                                        | 53,5                | 90,6           | 53,9 | 46,4   | 64,4 | 31,2 | 24,1   | 38,6 | 11,9  | 12,4   | 11,9 |
| 56               | 75,0                                        | 65,4                | 96,7           | 60,1 | 50,7   | 60,1 | 31,8 | 28,6   | 47,7 | 12,6  | 12,2   | 10,0 |
| 70               | 81,2                                        | 72,7                | 98,8           | 60,9 | 52,1   | 54,7 | 38,3 | 32,1   | 55,3 | 14,7  | 11,9   | 8,6  |

<sup>1</sup>Dias após o corte de uniformização e início das aplicações de  $\text{K}^{15}\text{NO}_3$ ; <sup>2</sup>A = Percentagem de N derivado da FBN calculado com base nos enriquecimentos das plantas de *D. ovalifolium* e de *P. maximum* na data da colheita; <sup>3</sup>B = Percentagem de N derivado da FBN nas plantas de *D. ovalifolium* até a data da colheita estimado pela simulação planta-planta; <sup>4</sup>C = Percentagem de N derivado da FBN no N extraído pelas plantas de *D. ovalifolium* na data da colheita.

Este efeito fica muito evidente porque embora as plantas de *P. maximum* também tivessem sido estabelecidas antes do início das aplicações de N, o total de N não marcado contido nelas foi proveniente de suas pequenas sementes e de algum resíduo presente no substrato de crescimento (areia), o que é insignificante perto do N fixado previamente presente nas raízes de *D. ovalifolium*.

De modo contrário, as estimativas de %Nd<sub>fa</sub> oferecidas pelo modelo para *D. ovalifolium* não são afetadas pelo N extra das raízes. O cálculo é baseado apenas nos ganhos diários de N e <sup>15</sup>N de ambas as espécies, sendo automaticamente descontada qualquer quantidade de N presente no substrato acumulado pelas plantas. A outra vantagem do uso das simulações é a possibilidade de se obter o %Nd<sub>fa</sub> instantâneo ou referente ao N acumulado em qualquer intervalo de tempo, que no caso deste trabalho foi estabelecido para 1 dia (Tabela 3).

Tanto as estimativas de FBN pelos dados originais como pela simulação possibilitaram concluir que as doses de N aplicadas foram efetivas para se estabelecer, em *D. ovalifolium*, graus de dependência pela FBN dentro da faixa de 0 a 100% (PEOPLES *et al*, 1989).

### 3. Efeito das doses de N sobre a nodulação de *D. ovalifolium*

A nodulação das plantas de *D. ovalifolium* também foi afetada pela aplicação do N fertilizante (Figura 12). Quatro semanas após o início das aplicações de N, a matéria seca de nódulos de todos os tratamentos de dose de N-KNO<sub>3</sub>, não foi alterada significativamente, mantendo-se numa média aproximada de 70 mg de nódulos/planta. A partir da 6ª semana, observou-se um aumento na matéria seca de nódulos dos tratamentos 0, 12,5 e 25,0 mgN/vaso e uma queda na matéria seca de nódulos do tratamento de maior dose de N, estando o tratamento de 50,0 mgN/vaso num mesmo patamar com relação as primeiras semanas.

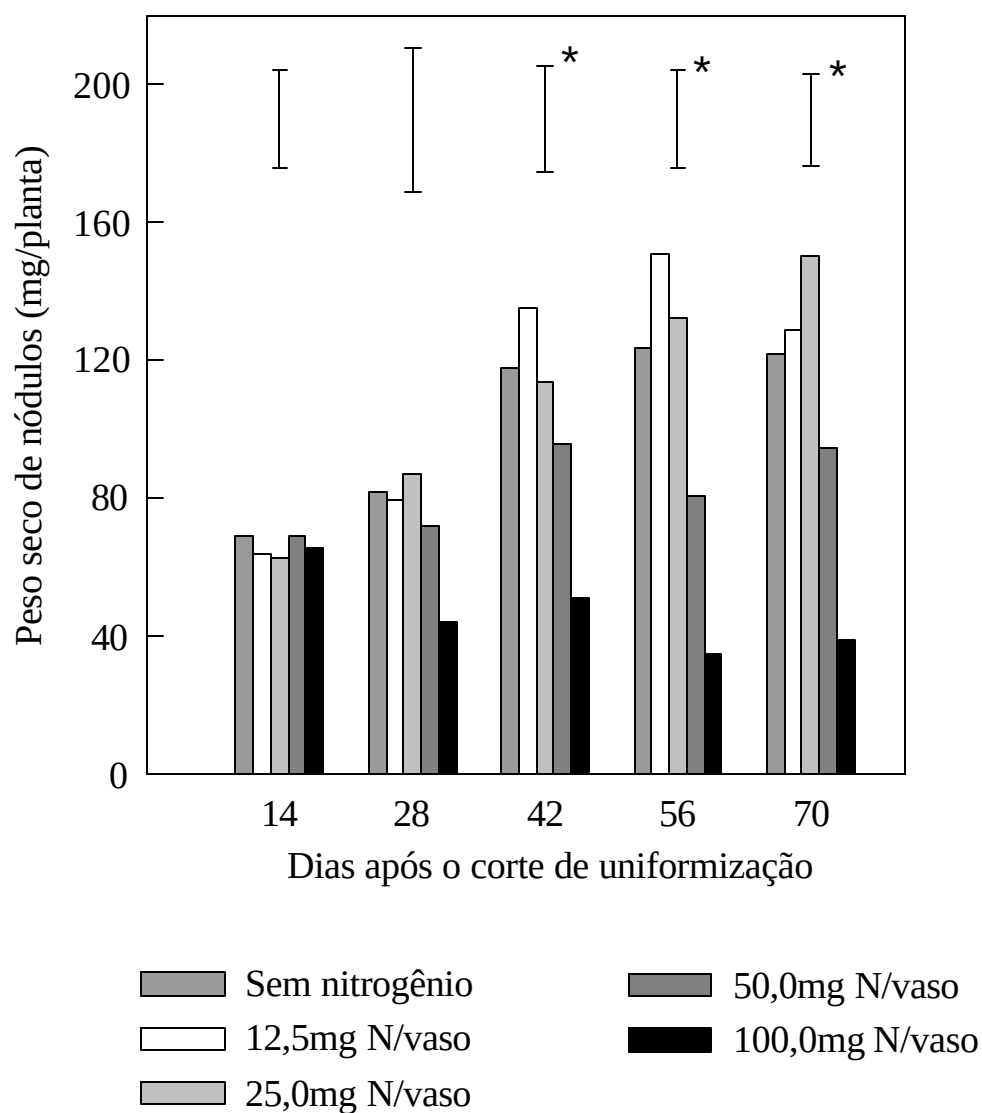


Figura 12. Variação da massa seca de nódulos de *D. ovalifolium* cv Itabela durante o período experimental, sob diferentes dose de  $^{15}\text{N-KNO}_3$ . As barras verticais correspondem a mínima diferença significativa. A presença de asterisco indica a existência de diferença significativa ( $P=0,05$ ).

É possível que o corte de uniformização realizado imediatamente antes do início do experimento tenha provocado uma drástica diminuição na matéria seca de nódulos pré-existent, devido principalmente a imposição drástica de limitação de carbono para os nódulos (NEVES & HUNGRIA, 1987). Nas plantas em substrato livre de N mineral, o simples rebrote permitiu o estabelecimento de novos nódulos, responsáveis pelo suprimento de todo o N requerido pela planta. As menores doses de N (12,5 e 25,0 mgN/vaso) não prejudicaram a nodulação de forma significativa, e é possível que a diferença observada em relação ao acúmulo de N (Tabela 1), seja o resultado de um efeito aditivo do N<sub>2</sub> fixado e da disponibilidade de N mineral para a planta (HARPER & GIBSON, 1984), uma vez que o gênero *Desmodium* é caracterizado por formar simbioses pouco efetivas (CADISCH *et al*, 1989, VIERA-VARGAS *et al.*, 1994).

A dose de 50,0 mgN/vaso, provavelmente, implicou em uma condição intermediária, onde o aumento na demanda de N da planta foi atendido pela suplementação de N mineral. Na dose máxima de N (100 mgN/vaso) pode-se concluir que toda a demanda de N da cultura foi atendida pelo N mineral fornecido e os nódulos presentes em número cada vez mais reduzido já deviam estar senescentes.

#### 4. Curva de calibração entre a abundância relativa de ureídeos e a contribuição da FBN

Como discutido anteriormente, a presença de raízes nos vasos de *D. ovalifolium* resultou em uma superestimativa das contribuições da FBN obtidas através do cálculo baseado nos dados originais de enriquecimento de <sup>15</sup>N das plantas de *D. ovalifolium* e de *P. maximum*. Os bons ajustes das curvas de acumulação de N aos dados de N total e de recuperação de <sup>15</sup>N por *P. maximum* e *D. ovalifolium*, aliado ao fato de que as contribuições da FBN são baseadas em ganhos diários, faz com que o método de simulação planta-planta seja o mais recomendado para o presente estudo. Ainda, segundo HERRIDGE & PEOPLES (1990), para a elaboração de curvas de calibração, deve-se utilizar o resultados de contribuição de FBN dentro do menor intervalo de

tempo possível uma vez que a abundância relativa de ureídeos é obtida de uma amostragem pontual. Neste caso, como a variação diária da abundância relativa de ureídeos é mínima (Figura 7, capítulo 1), o intervalo de tempo de um dia seria propício para se estimar a contribuição da FBN.

Em valores médios de todas as colheitas, a fração ureído correspondeu a  $8,3 \pm 0,7$  a  $1,03 \pm 0,2$  % do N total do extrato, para as condições de máxima e mínima contribuição da FBN (dose 0 e 100 mgN/vaso), respectivamente. Já as frações nitrato e ureídeos somadas para o tratamento de máxima aplicação de N (100 mgN/vaso) chegou a  $34,8 \pm 2,5$  % do total de N do extrato. A baixa proporção, em relação ao total de N do extrato, das formas de N encontradas sugeriram que nitrato e ureídeos não seriam formas predominantes de translocação de N em *D. ovalifolium*. Contudo, deve-se considerar que o extrato possui uma certa quantidade de N que não é creditada a seiva mas sim as células que compõe o tecido dos colmos. Também se observou neste experimento que a medida que as plantas ficavam maiores, as concentrações de ureídeos e nitrato por mL de extrato diminuía, possivelmente por um efeito de diluição devido ao aumento da demanda hídrica (NEVES & HUNGRIA, 1987).

Não obstante, a abundância relativa de ureídeos, calculada com base nas concentrações de ureídeos e nitrato (material e métodos) acompanhou relativamente bem as variações diárias na contribuição da FBN estimada pela simulação planta-planta (Figura 13). Somente para a dose de 25,0 mgN/vaso o coeficiente de determinação obtido foi muito baixo ( $r^2 = 0,25$ ). No entanto quando todos os dados são analisados em conjunto (Figura 14), o coeficiente de determinação atinge valores comparáveis aos encontrados para curvas de calibração de outras culturas (McCLURE *et al*, 1980; PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE *et al*, 1996).

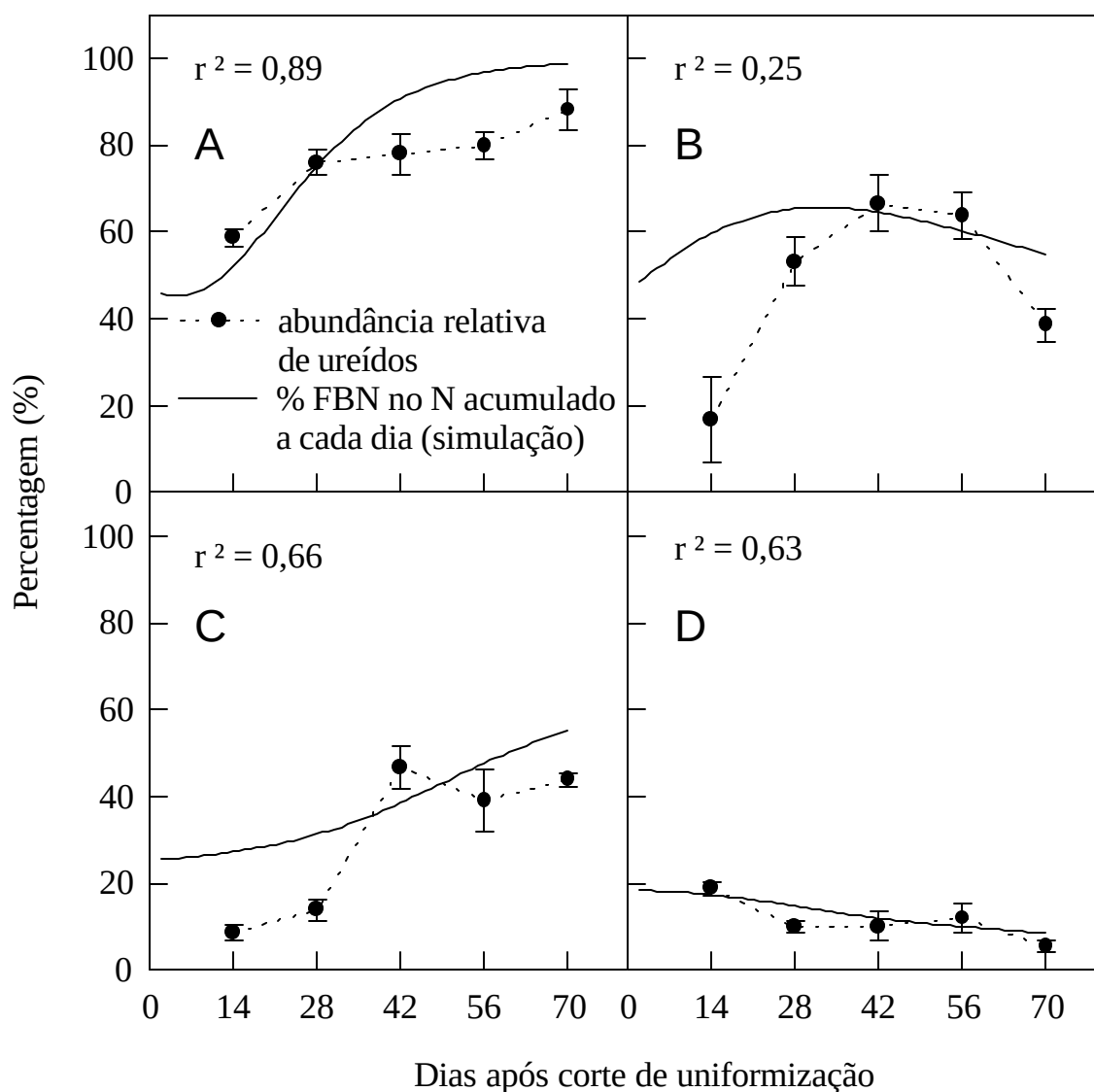


Figura 13. Correlação entre os dados de abundância relativa de ureídeos e a contribuição da FBN no N total acumulado a cada dia (%Nd<sub>fa</sub>/dia) para *D. ovalifolium*, obtidas para os tratamentos de <sup>15</sup>N-KNO<sub>3</sub> adicionado nas doses de A - 12,5 mgN/vaso, B - 25,0 mgN/vaso, C - 50,0 mgN/vaso e D - 100,0 mgN/vaso. As barras verticais representam o erro padrão das médias.

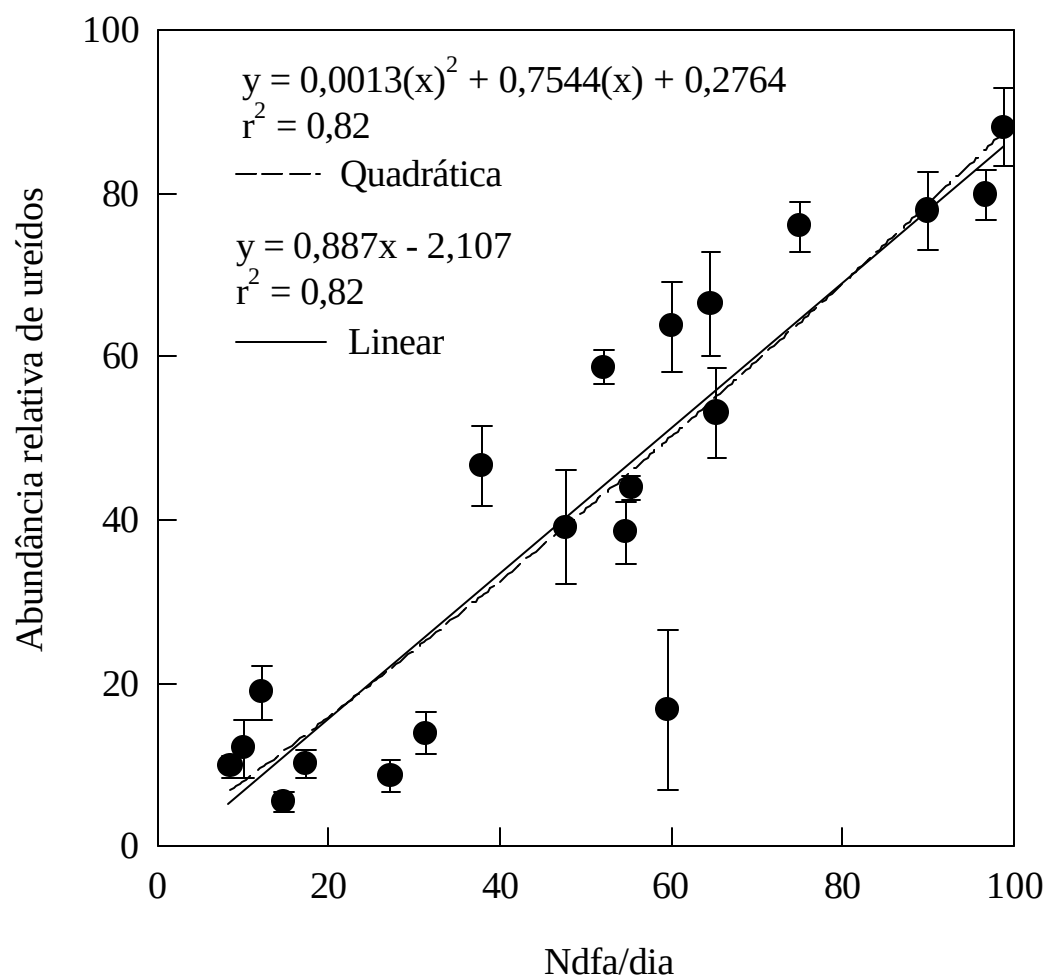


Figura 14. Correlação entre os dados de abundância relativa de ureídeos e a contribuição da FBN no N total acumulado a cada dia (%Ndfa/dia) para *D. ovalifolium*, obtidos de todos os tratamento de  $^{15}\text{N-KNO}_3$  e de todas as colheitas durante o período experimental. As barras verticais representam o erro padrão das média.

Devido a variabilidade dos dados, o ajuste de uma função quadrática à relação entre abundância relativa de ureídos e a contribuição diária da FBN (%Ndfa/dia) (HERRIDGE & PEOPLES, 1990) não foi diferente do ajuste de uma função linear.

Como todas as amostragens foram feitas dentro de um período de crescimento vegetativo de *D. ovalifolium*, novos estudos devem ser realizados para averiguar se existe uma diferença significativa da relação entre as contribuições da FBN e a abundância relativa de ureídos no período reprodutivo de *D. ovalifolium*, tal como tem sido observado para guandu (PEOPLES *et al*, 1989) e soja (HERRIDGE & PEOPLES, 1990).

**Capítulo 3. Quantificação da FBN por abundância relativa de ureídos e diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em *Desmodium ovalifolium* crescido em vasos com solo.**

## INTRODUÇÃO

PEOPLES *et al* (1989) elaboraram um protocolo a ser seguido para estimar a contribuição da FBN através da aplicação da técnica de abundância relativa de ureídos baseado, principalmente, nos avanços desta técnica obtidos para a cultura de soja. Dentro deste protocolo, propõe-se que o método de diluição isotópica seja o mais adequado para a obtenção das curvas de calibração. Para se ter um perfeito controle das formas de N disponíveis para a cultura, recomenda-se que a curva de calibração deva ser realizada em um meio isento de N como a areia lavada, ou a mistura desta a uma certa quantidade de vermiculita. Este controle torna-se ainda mais importante quando as estimativas dos solutos nitrogenados são feitas em extratos de caule, pois a abundância relativa de ureídos é calculada pela relação entre ureídos e nitratos + ureídos.

Para solos com pH neutro a alcalino, onde praticamente todo o N mineral se encontra na forma nítrica (KISSEL *et al*, 1985), a utilização da curva de calibração para quantificação da FBN baseada na análise de extratos de caule não deve ser um problema (HERRIDGE *et al*, 1990). No entanto, quando se pensa em solos das regiões tropicais, maiores cuidados devem ser tomados quando da interpretação do resultados, principalmente em áreas de pastagens. A maioria

dos solos localizados em regiões tropicais são caracteristicamente ácidos e de baixa CTC, condições estas desfavoráveis a existência de nitrato no solo (VAN RAIJ, 1991).

Um outro ponto que ainda deve ser discutido é o efeito da estirpe de *Bradyrhizobium* sobre a composição dos solutos nitrogenados na seiva. Embora tenham sido demonstrados indícios de que dependendo da estirpe que inocula as plantas de soja haveria uma diferente relação entre a abundância relativa de ureídos e a contribuição da FBN (NEVES *et al*, 1985), trabalhos mais direcionados a elucidar a significância deste efeito concluíram não ser importante para esta espécie (HERRIDGE *et al*, 1988; HERRIDGE & PEOPLES, 1990). Não obstante, deve ser ressaltado que este efeito não foi verificado para as leguminosas forrageiras que, em sua maioria, são consideradas promíscuas, nodulando com várias estirpes de *Bradyrhizobium* presente no solo (GILLER & WILSON, 1993).

Nesta etapa de estudo, objetivou-se averiguar o efeito da inoculação de *D. ovalifolium* com *Bradyrhizobium* sp. sobre a contribuição da FBN e também, comparar estimativas da contribuição da FBN através do método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  com as obtidas por abundância relativa de ureídos, através do emprego da curva de calibração obtida no experimento anterior (Capítulo 2).

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Implantação do experimento:

O experimento foi instalado na Estação de Zootecnia do Extremo Sul da Bahia, pertencente ao CEPLAC. Foi constituído de vasos com capacidade para 4kg de solo. O solo correspondia a um podzólico vermelho-amarelo, apresentando pH - 5,1; C - 10,1 g/kg; N total - 0,82 g/kg; Al - 0,2 cmol/kg, Ca+Mg - 2,7 cmol/kg; P (Mehlich I) - 7 mg/kg e K - 101 mg/kg. As espécies utilizadas foram *Desmodium ovalifolium* cv Itabela, *Panicum maximum* cv. Centenário e arroz (*Oriza sativa*) cv agulhinha. O plantio foi feito aos 14 dias do mês de fevereiro, adicionando-se 9 sementes por vaso para o *D. ovalifolium* e o arroz e 15 sementes por vaso para *P. maximum*. Foi feito um desbaste para 3 plantas por vaso para todas as espécies 1 mês após o plantio.

### 2. Tratamentos:

Foram utilizadas 4 repetições para os tratamentos utilizados e o experimento foi delineado em blocos ao acaso.

Avaliou-se o fator inoculação, onde *D. ovalifolium* foi inoculado, ou não, com uma mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (BR 1505 e 1507) da coleção do CNPAB, selecionadas para esta espécie.

Um segundo fator foi o nível de palha adicionada ao solo para marcá-lo com  $^{15}\text{N}$ . Para isto, utilizou-se uma mistura de palha de sorgo e soja que resultou num material de relação C/N  $\sim 24$  e enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  igual a 0,175 % átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso. Assumiu-se que a relação C/N da palha adicionada implicaria em uma imobilização inicial de N e em seguida uma mineralização de N cuja magnitude dependeria da quantidade de palha adicionada ao solo (ALVES, 1992). Dessa forma adicionou-se a palha marcada com  $^{15}\text{N}$  nas taxas de 0,3%, 0,6%, 0,9% e 1,2% em peso seco de solo (TFSA).

Outro fator foi a época de colheita. Foram feitas 5 colheitas, a cada 2 semanas, após um corte de uniformização realizado 1 mês após o desbaste (final de abril).

### 3. Amostragens:

No período da manhã, aos 14, 28, 42, 56 e 70 dias após o corte de uniformização, foram feitas as amostragens das plantas. Em cada época de colheita, as plantas de cada vaso foram divididas em folhas, colmos + pecíolos e raízes. No caso de *P. maximum* e do arroz, somente raízes e parte aérea. No mesmo dia, todo o material foi levado a estufa para secagem a 65°C. Após esta etapa foram tomados os pesos secos de cada parte da planta e seguiu-se com a moagem destas para análises posteriores.

Nos tratamentos de *D. ovalifolium* inoculado e *D. ovalifolium* não-inoculado crescidas em solo com 0.3% e 1.2% de palha, foi feita uma amostragem de nódulos, a cada colheita. Os nódulos foram secados em estufa a 65°C e depois determinada a matéria seca.

#### 4. Análise química das amostras:

Cada parte das plantas de *D. ovalifolium*, *P. maximum* e arroz já secas e moídas, foram analisadas para N total através da digestão Kjeldhal das amostras e posterior quantificação através de destilação a vapor e titulometria com ácido sulfúrico (BREMNER & MULVANEY, 1982). A alíquota titulada foi acidificada e colocada para secar em estufa a 60°C a fim de se prepararem as amostras para análise de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  em espectrômetro de massas VG903 ISO-GAZ (URQUIAGA *et al*, 1992).

Foram preparados extratos aquosos do material seco de colmos de *D. ovalifolium* conforme o descrito na seção 2.1, capítulo 1. Nestes extratos dosaram-se a fração nitrato, através da metodologia de fluxo contínuo (seção 2.), a fração ureído (alantoína + ácido alantóico), segundo o descrito na seção 2.3 do capítulo 1.

#### 5. Cálculos:

Os cálculos de abundância relativa de ureídos e da contribuição da FBN por diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , tanto pelo método tradicional como pela simulação planta-planta foram feitos de acordo com o apresentado no capítulo 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Efeito dos tratamentos sobre o crescimento de *D. ovalifolium*, *P. maximum* e arroz

O acúmulo de matéria seca pelas plantas de *D. ovalifolium* não foi afetado significativamente pelas diferentes quantidades de palha misturadas ao solo e, embora não seja mostrado nenhum parâmetro comparativo, a inoculação com estirpes específicas de *Bradyrhizobium* sp. também não proporcionou uma diferença significativa na acumulação de matéria seca desta leguminosa (Figura 15A e 15B). Já o crescimento de *P. maximum* e arroz foi dependente da proporção da palha em relação ao solo, não obstante a variabilidade ter sido alta em algumas colheitas (Figura 16A e 16B). Neste sentido, pode-se dizer que ambas as gramíneas no tratamento 1,2% de palha aumentaram a sua quantidade de matéria seca em relação às do tratamento 0,3% de palha ao final do experimento. Este efeito positivo da palha pode ser atribuído a uma maior disponibilidade de N. A baixa relação C/N da palha, independente da proporção adicionada, foi importante para que todo o processo inicial de decomposição, que implica em imobilização e posterior mineralização do N do solo (BERENDSE & BOSATTA, 1984),

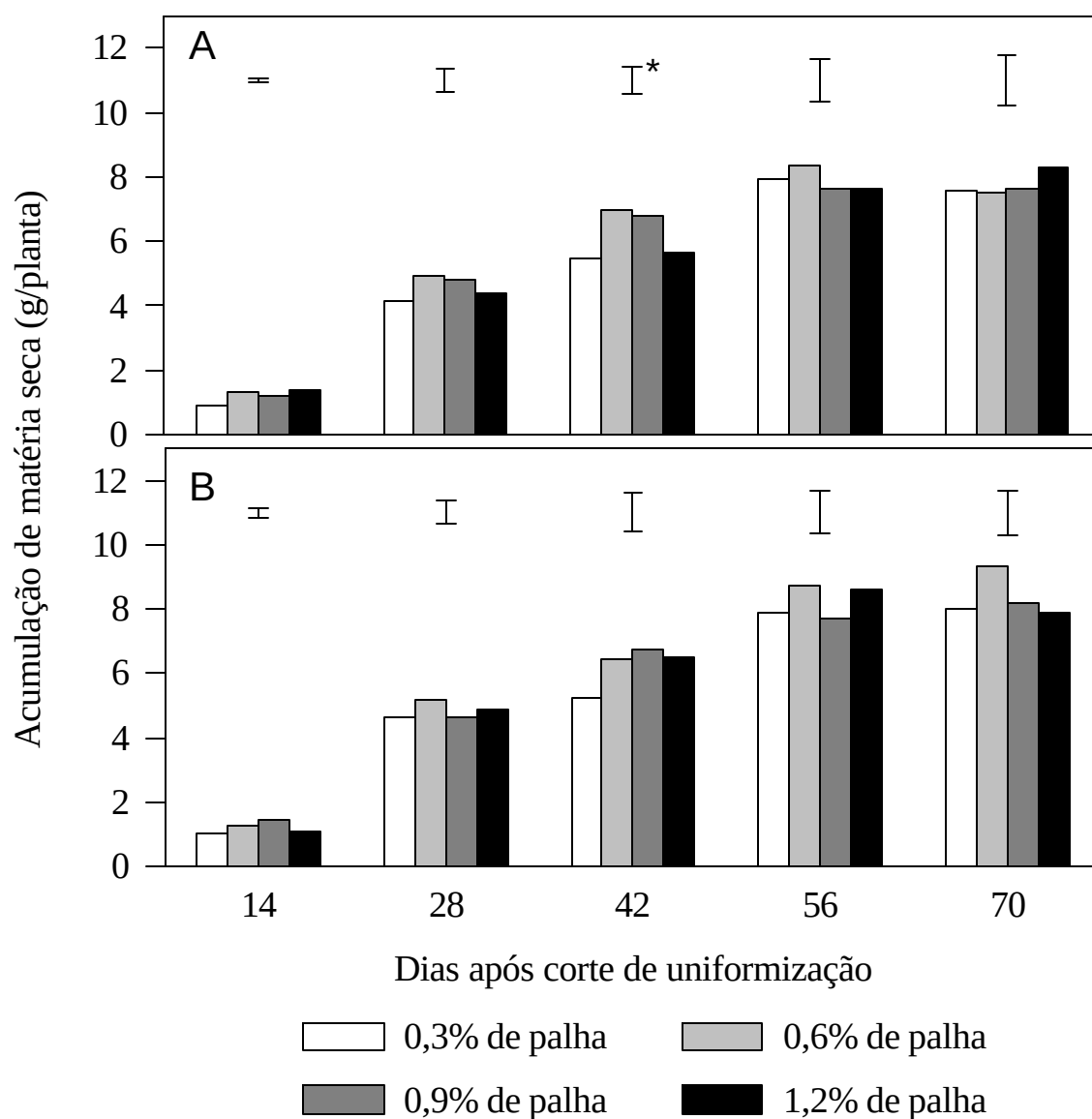


Figura 15 - Acúmulo de matéria seca por plantas de *D. ovalifolium*, inoculadas (A) ou não inoculadas (B) com estirpes específicas de *Bradyrhizobium* sp., sob o efeito de diferentes proporções de palha (com base no peso seco) incorporadas ao solo, durante o período experimental. As barras representam a mínima diferença significativa. O asterisco indica a existência de diferença entre os tratamentos a  $P = 0,05$ .

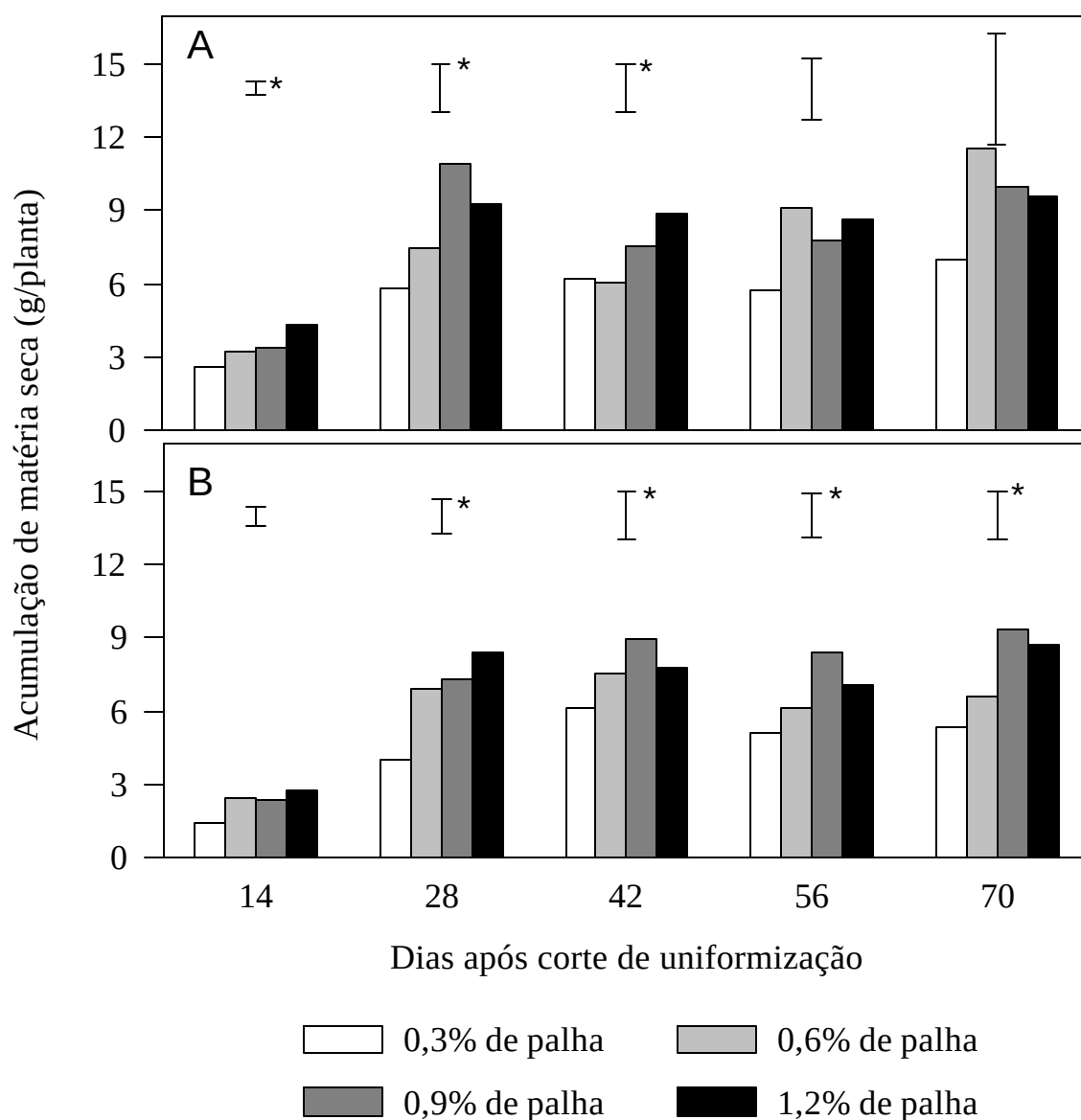


Figura 16 - Acúmulo de matéria seca por plantas de *P. maximum* (A) e arroz (B) sob o efeito de diferentes proporções de palha (com base no peso seco) incorporadas ao solo, durante o período experimental. As barras representam a mínima diferença significativa. O asterisco indica a existência de diferença entre os tratamentos a  $P = 0,05$ .

ocorresse dentro do período de estabelecimento até ao corte de uniformização. Este período de imobilização pode ter sido até favorável para o estabelecimento do sistema simbiótico das leguminosas, uma vez que o excesso de N mineral no momento da germinação pode ser problemático para a FBN (BODDEY *et al*, 1996). Não é possível saber ao certo a partir de quando a mineralização líquida foi o processo dominante, porém provavelmente já o era durante o período experimental, e maior foi a disponibilidade do N do solo quanto maior foi a quantidade de palha adicionada.

Analisando ainda os dados de acúmulo de matéria seca (Figuras 15A, 15B, 16A e 16B), tanto as plantas de *D. ovalifolium* como as de *P. maximum* e de arroz tiveram um rápido crescimento até aos 28 dias após o corte de uniformização. Dai em diante o crescimento reduziu-se para *D. ovalifolium* e praticamente cessou para ambas as gramíneas. A redução do crescimento pode ser explicada por muitos fatores, entre como causa da redução da temperatura que se observa na época do ano em que se realizou o experimento (HORIE, 1994). Também, é importante ressaltar que havia 3 plantas por vaso, cujo massa de solo usada pode ter sido insuficiente para fornecer toda a demanda de nutrientes das plantas.

## 2. Avaliação da simulação de acúmulo de N e $^{15}\text{N}$ pelas plantas

O comportamento de acumulação de N por *D. ovalifolium*, inoculado ou não, *P. maximum* e arroz seguiu o mesmo comportamento observado para a matéria seca (Figuras 17, 18, 19 e 20, respectivamente). Os dados de acumulação de N por *P. maximum* e arroz evidenciaram ainda mais o efeito da adição da palha marcada com  $^{15}\text{N}$  sobre a disponibilidade de N do solo. No caso do *P. maximum*, o tratamento com 1,2% de palha proporcionou um incremento de 51% na acumulação de N em relação ao tratamento com 0,3% de palha, sendo este incremento de 80% para o arroz (Figura 19A/19D e 20A/20D).

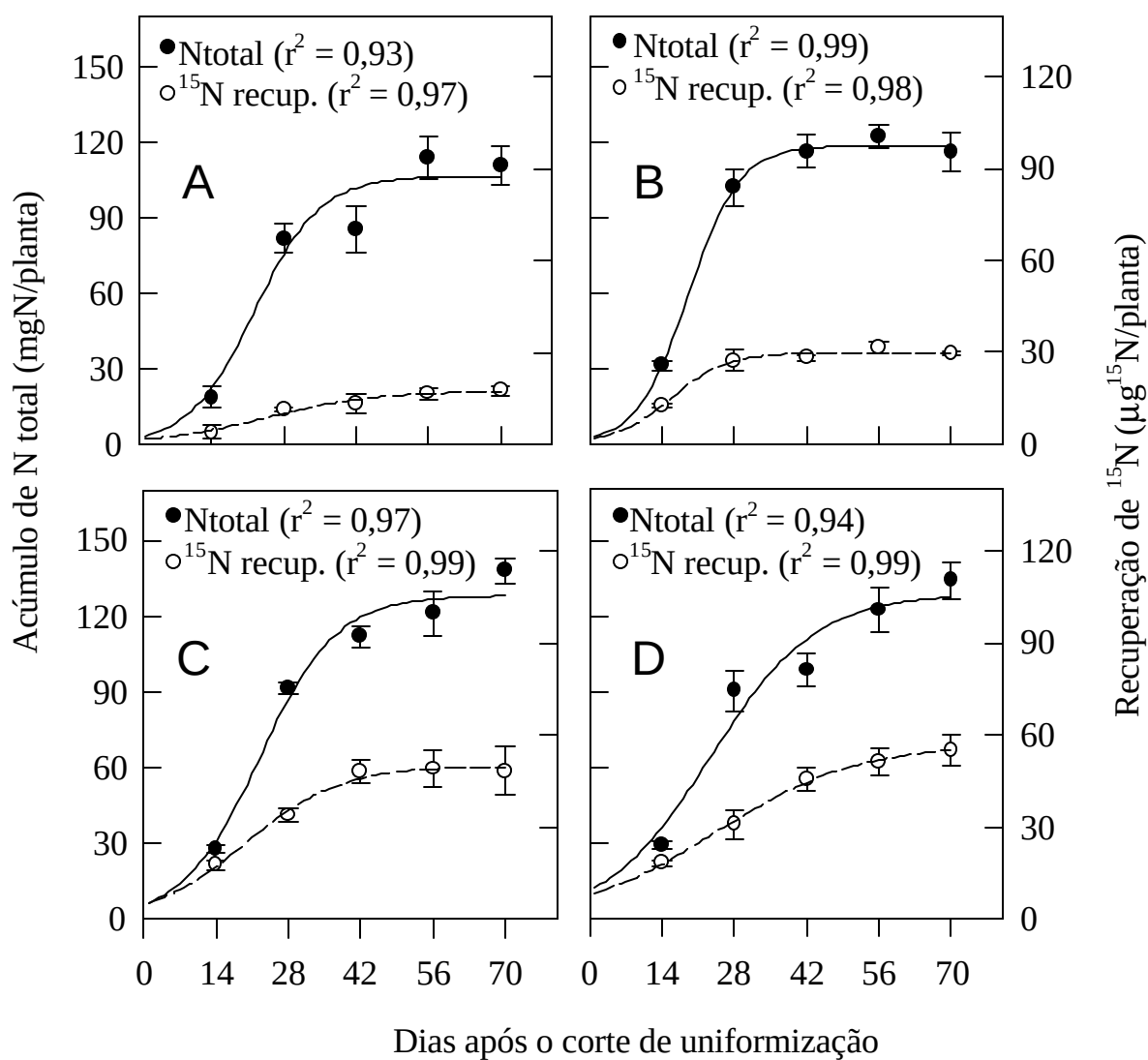


Figura 17. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *D. ovalifolium* inoculado sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média.

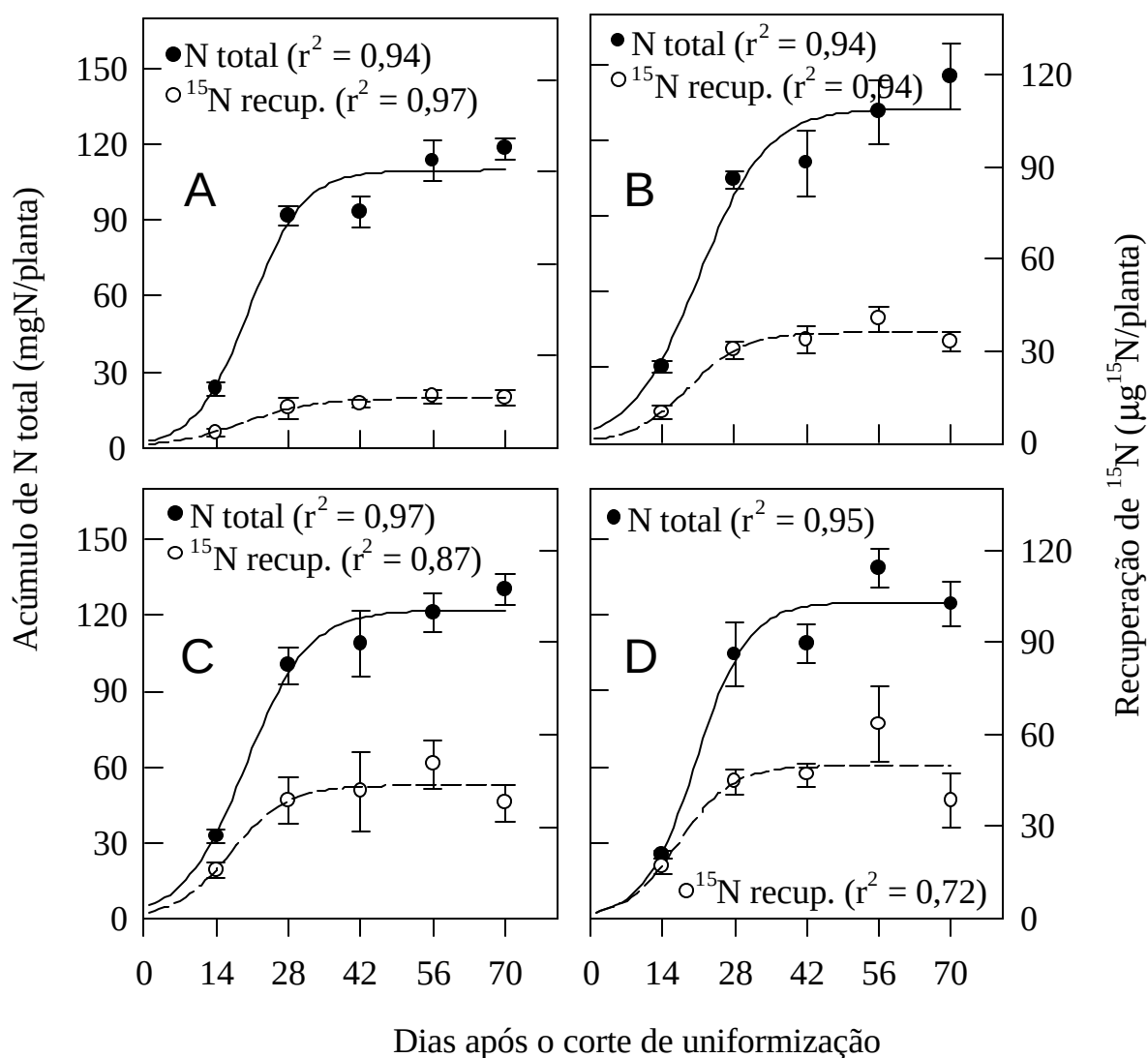


Figura 18. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *D. ovalifolium* não inoculado sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média.

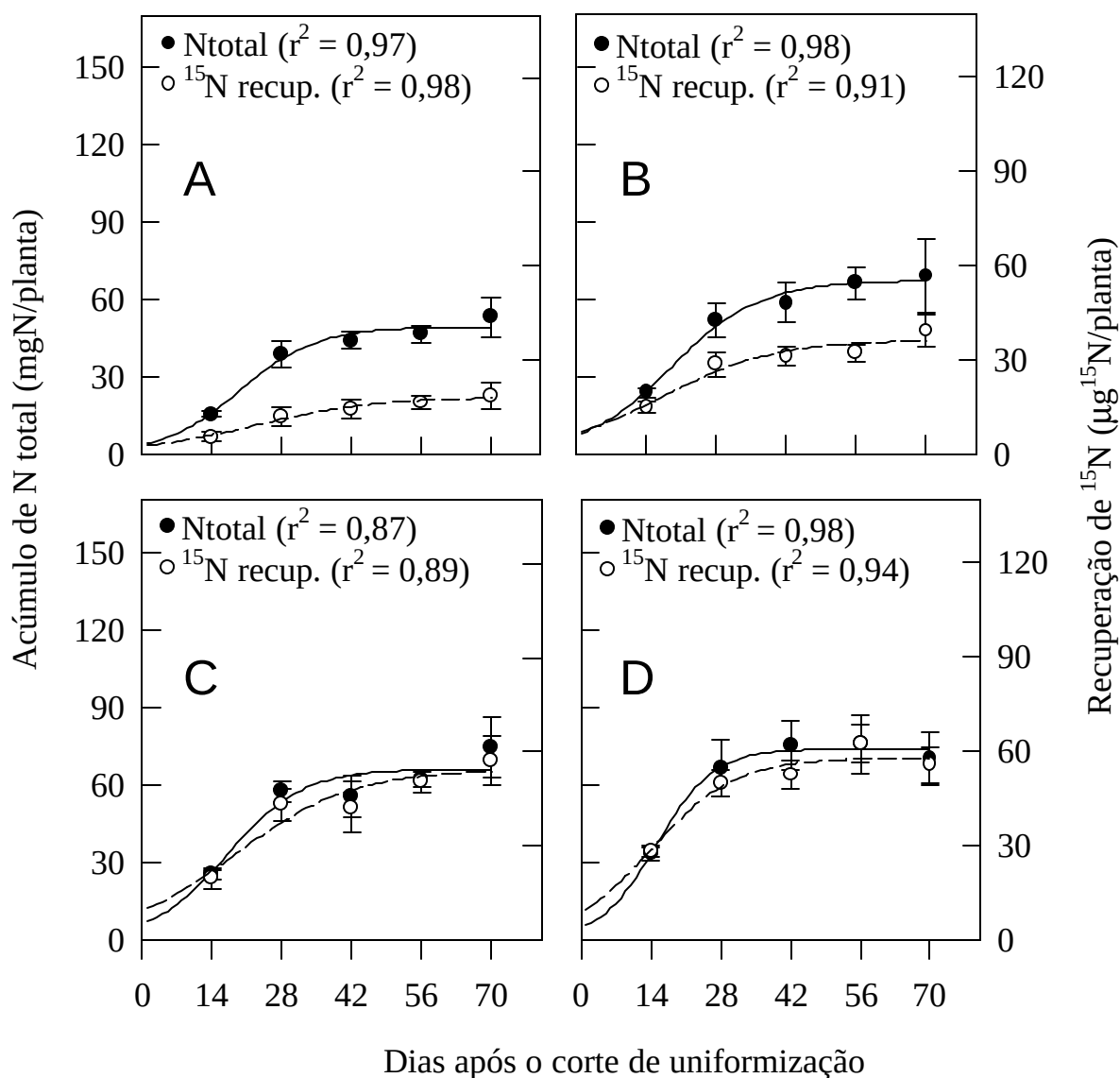


Figura 19. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média.

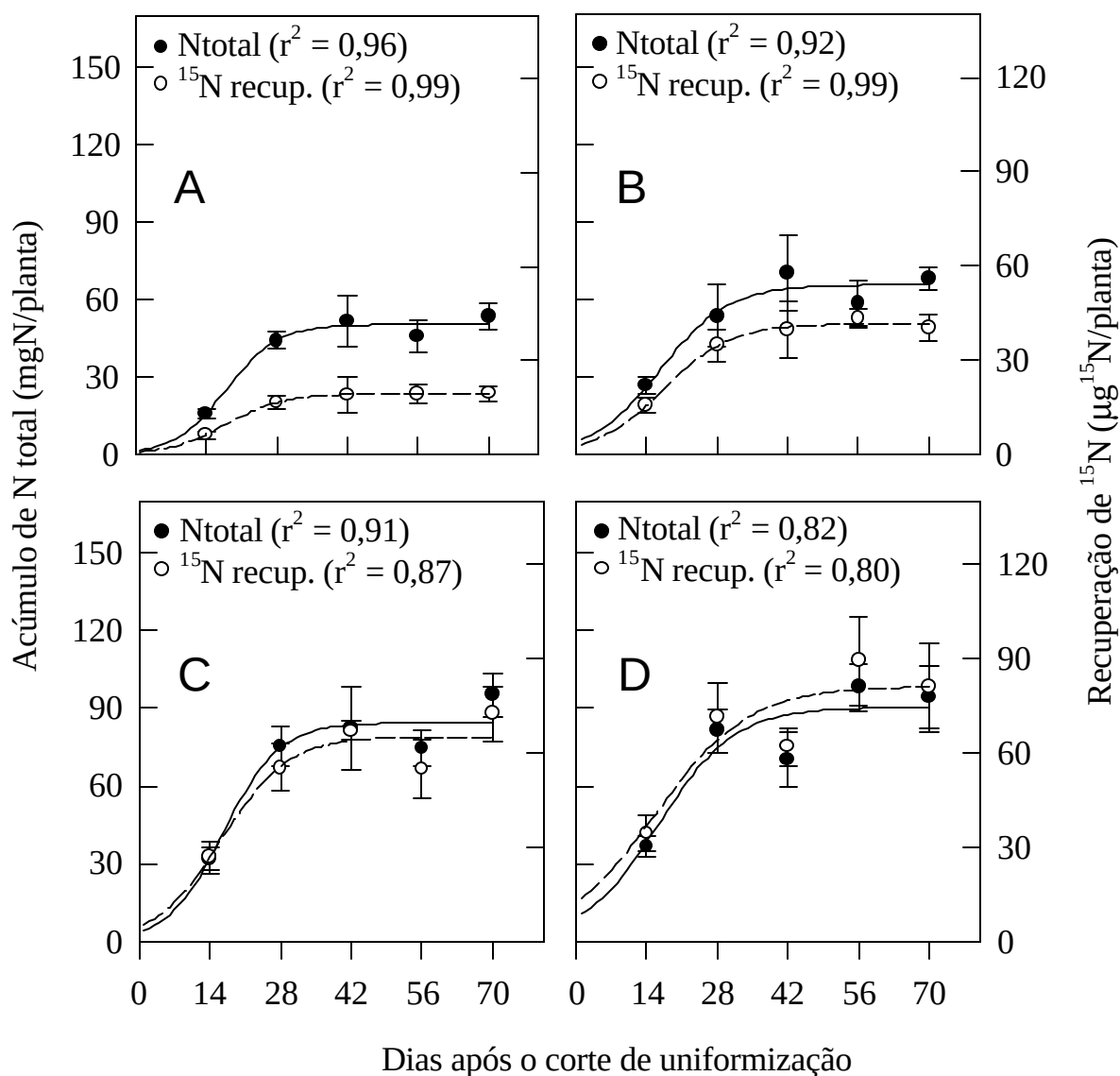


Figura 20. Acúmulo de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  pelo arroz sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%. As linhas representam o resultado do ajuste da equação de acumulação de N (WITTY, 1983). As barras indicam o erro padrão da média.

No tratamento com 0,3% de palha as plantas de *D. ovalifolium* acumularam um pouco mais do que o dobro do total de N acumulado pelas gramíneas (Figuras 17A/18A e 19A/20A). Com a maior oferta de N (maior proporção da palha), a diferença caiu para 40 a 80% a mais de N acumulado por *D. ovalifolium*, no tratamento com 1,2% (Figuras 17D/18D e 19D/20D).

Os coeficientes de determinação obtidos para a simulação do acúmulo de N total situaram-se entre 0,93 e 0,99 para *D. ovalifolium* inoculado; 0,94 e 0,97 para *D. ovalifolium* não inoculado; 0,87 e 0,98 para *P. maximum* e 0,82 a 0,96 para o arroz (Figuras 17, 18, 19 e 20, respectivamente). Para a recuperação de  $^{15}\text{N}$ , os coeficientes de determinação situaram-se entre 0,97 e 0,99 para *D. ovalifolium* inoculado; 0,72 e 0,97 para *D. ovalifolium* não inoculado; 0,89 e 0,98 para *P. maximum* e 0,80 a 0,99 para o arroz. Segundo BODDEY *et al* (1996), a variabilidade dos dados devido a perda de N nas folhas senescentes é uma das causas dos baixos coeficientes de determinação para as simulações de acumulação de N, pois o modelo não considera esta possibilidade. Períodos de estresse hídrico e de temperaturas críticas para o crescimento da planta também podem prejudicar o bom ajuste das curvas de acumulação de N uma vez que estas descrevem um crescimento contínuo (MOHR & SCHOPFER, 1995). Não obstante, em todas as simulações neste trabalho, os ajustes mostraram coeficientes de determinação significativos, na pior das hipóteses ( $r^2 = 0,72$ ), à 5% de probabilidade.

Para testar o modelo de simulação planta-planta (ver Material e Métodos), estimou-se o N acumulado do solo por *P. maximum* a partir dos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  do arroz, e vice-versa. Quando os dados diários de acumulação de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* foram utilizados para estimar o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do N mineral do solo a cada dia, a estimativa do N retirado do solo por arroz mostrou-se bem coerente com a acumulação de N dosada na planta de arroz (Figura 21), com excessão ao tratamento 0,6% de palha onde a estimativa superou o observado (Figura 21B). Quando utilizou-se arroz para simular o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do solo, o resultado foi mais consistente. Neste caso houve sempre uma

subestimação do acúmulo de N por *P. maximum* (Figura 22). BODDEY *et al* (1996) encontraram uma situação semelhante num teste de simulação para soja não-nodulante e trigo. Embora não tenha sido avaliada, deduziu-se que as raízes de trigo deveriam estar explorando o solo a uma profundidade onde o enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do N mineral estava mais diluído em relação a profundidade explorada pela soja não nodulante. O menor enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  estimado pelos dados diários de N total e recuperação de  $^{15}\text{N}$  do trigo produziram uma subestimativa do N acumulado pela soja, sendo observado o contrário quando a soja foi utilizada para estimar o acúmulo de N do trigo. Toda a argumentação utilizada no trabalho de BODDEY *et al* (1996) não pode ser usada diretamente nos dados deste trabalho pois, o experimento foi conduzido em vasos e todo o solo foi marcado uniformemente. Deve-se levar em conta que a variabilidade dos parâmetros analisados pode ter conduzido a curvas que não representam o comportamento esperado.

### 3. Quantificação da FBN para *D. ovalifolium* através da diluição isotópica de $^{15}\text{N}$

As estimativas da FBN para *D. ovalifolium*, inoculado ou não, através da simulação planta-planta (Material e Métodos), para todos os tratamentos de palha são mostrados nas Figuras 23 a 30. Observou-se que a grande contribuição da FBN ocorreu até aos 35 dias após o corte de uniformização, sendo a máxima contribuição ao redor dos 28 dias (Figuras 23 a 30, B e D).

A inoculação de *D. ovalifolium* com estirpes específicas de *Bradyrhizobium* sp. não proporcionou um incremento significativo da contribuição da FBN. Segundo PEOPLES *et al*.

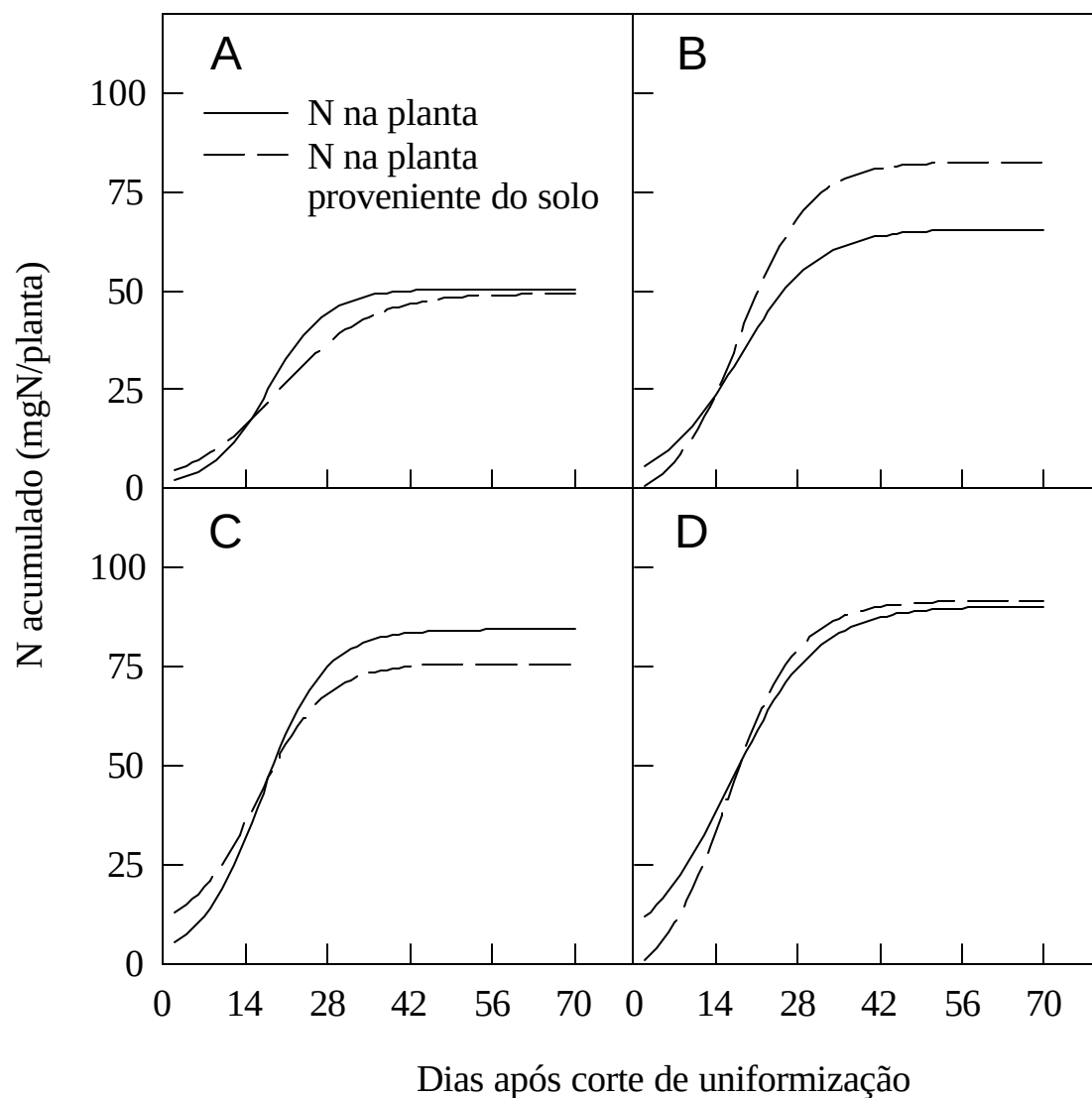


Figura 21. Curva de acúmulo de N total, ajustada aos dados medidos (WITTY, 1983) e curva do N acumulado proveniente do solo, estimada pela simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996), para plantas de arroz sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%.

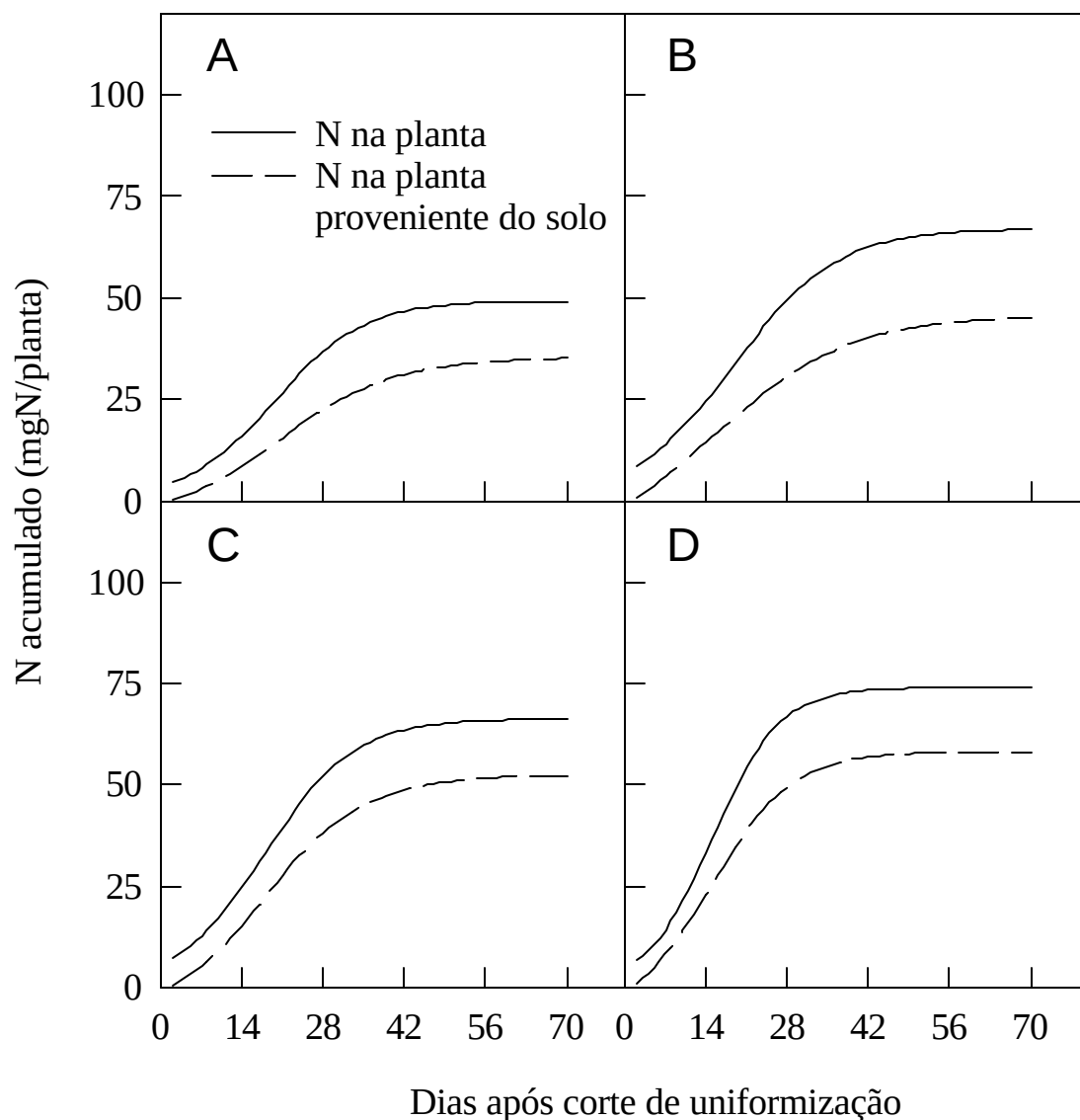


Figura 22. Curva de acúmulo de N total, ajustada aos dados medidos (WITTY, 1983), e curva do N acumulado proveniente do solo, estimada pela simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1996), para plantas de *P. maximum* sob o efeito do tratamento de palha marcada com  $^{15}\text{N}$  adicionada ao solo nas proporções de A - 0,3%; B - 0,6%; C - 0,9% e D - 1,2%.

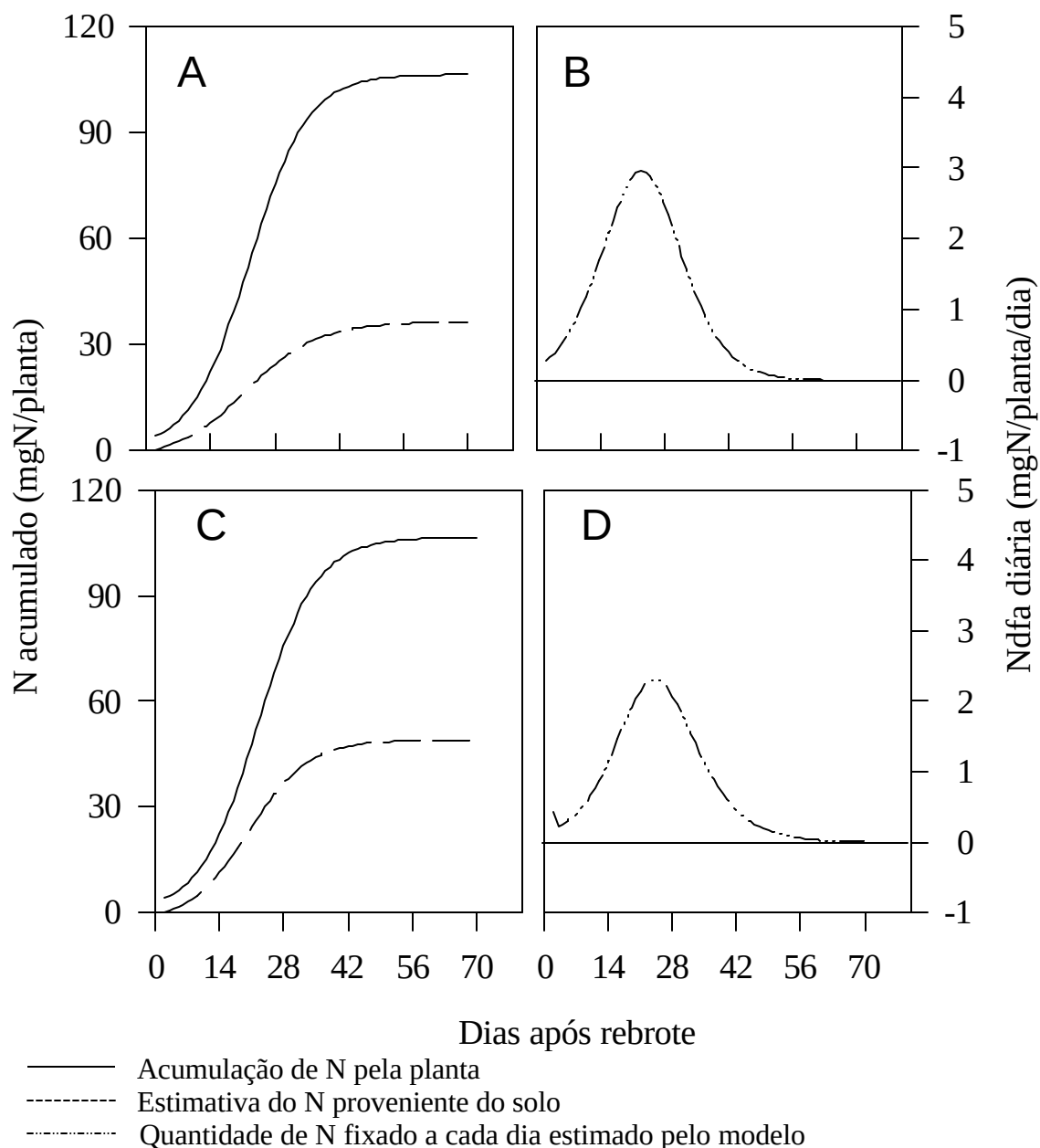


Figura 23. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 0,3% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

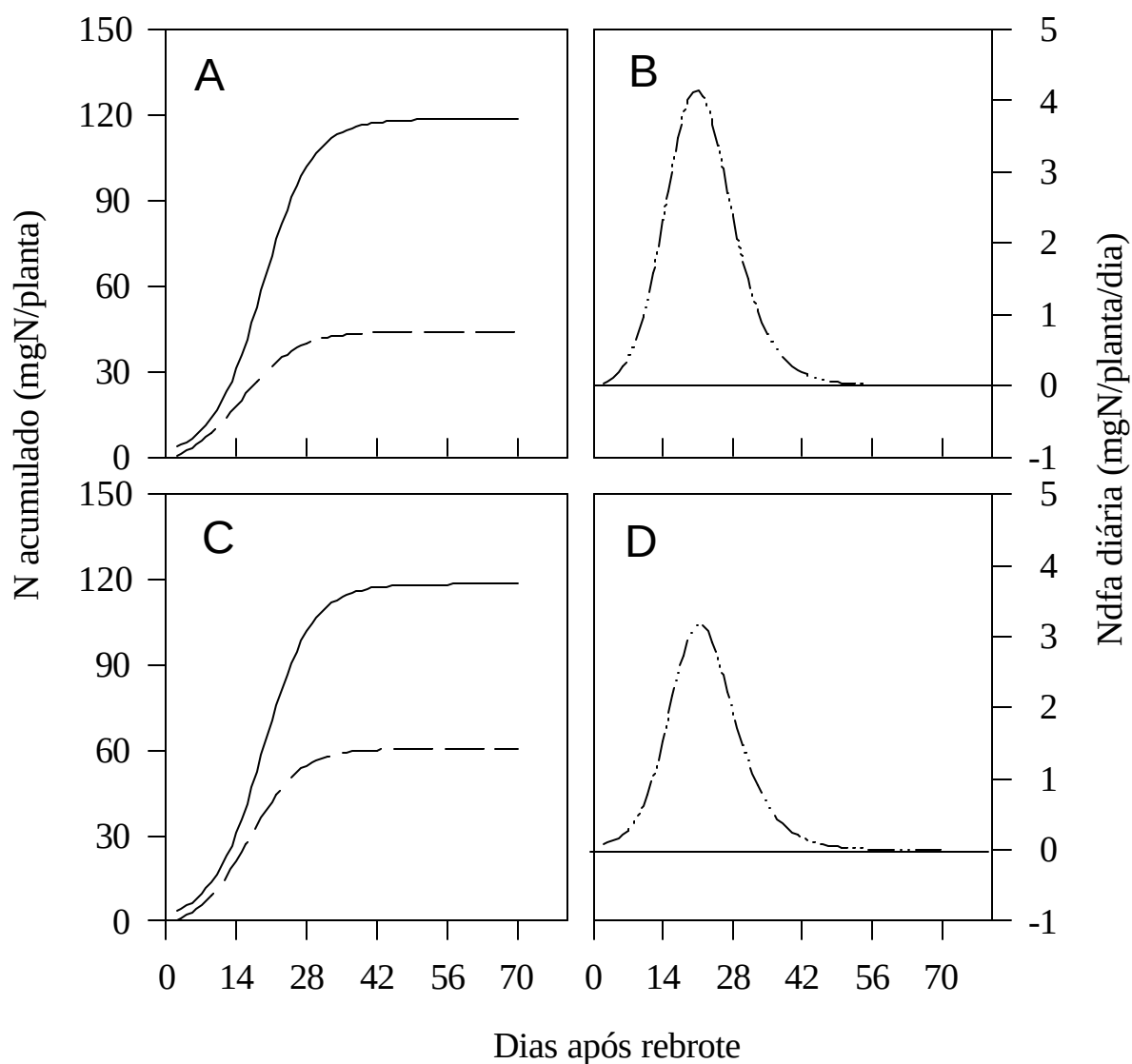


Figura 24. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 0,6% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

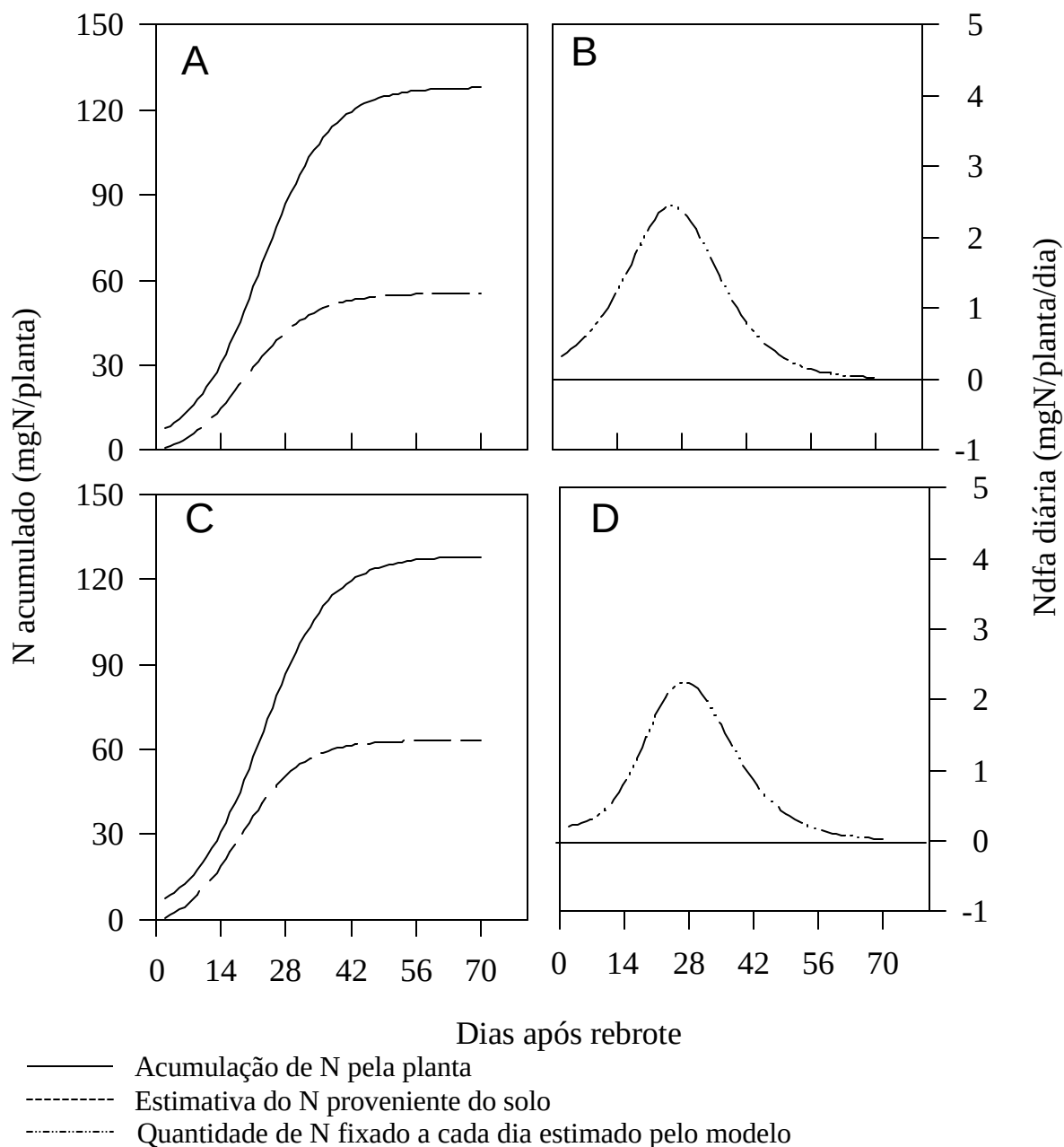


Figura 25. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 0,9% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

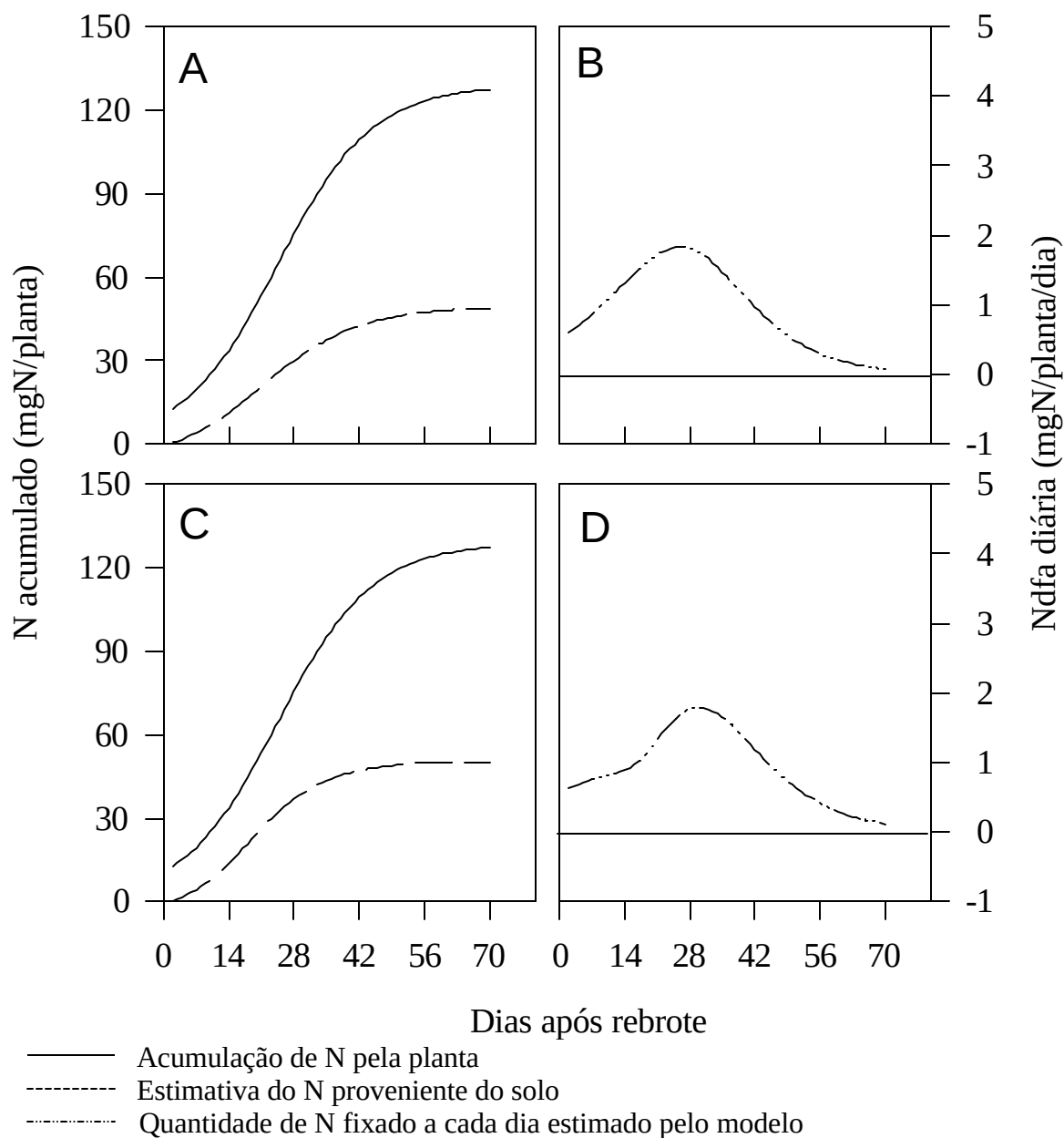


Figura 26. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* inoculado para o tratamento de 1,2% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

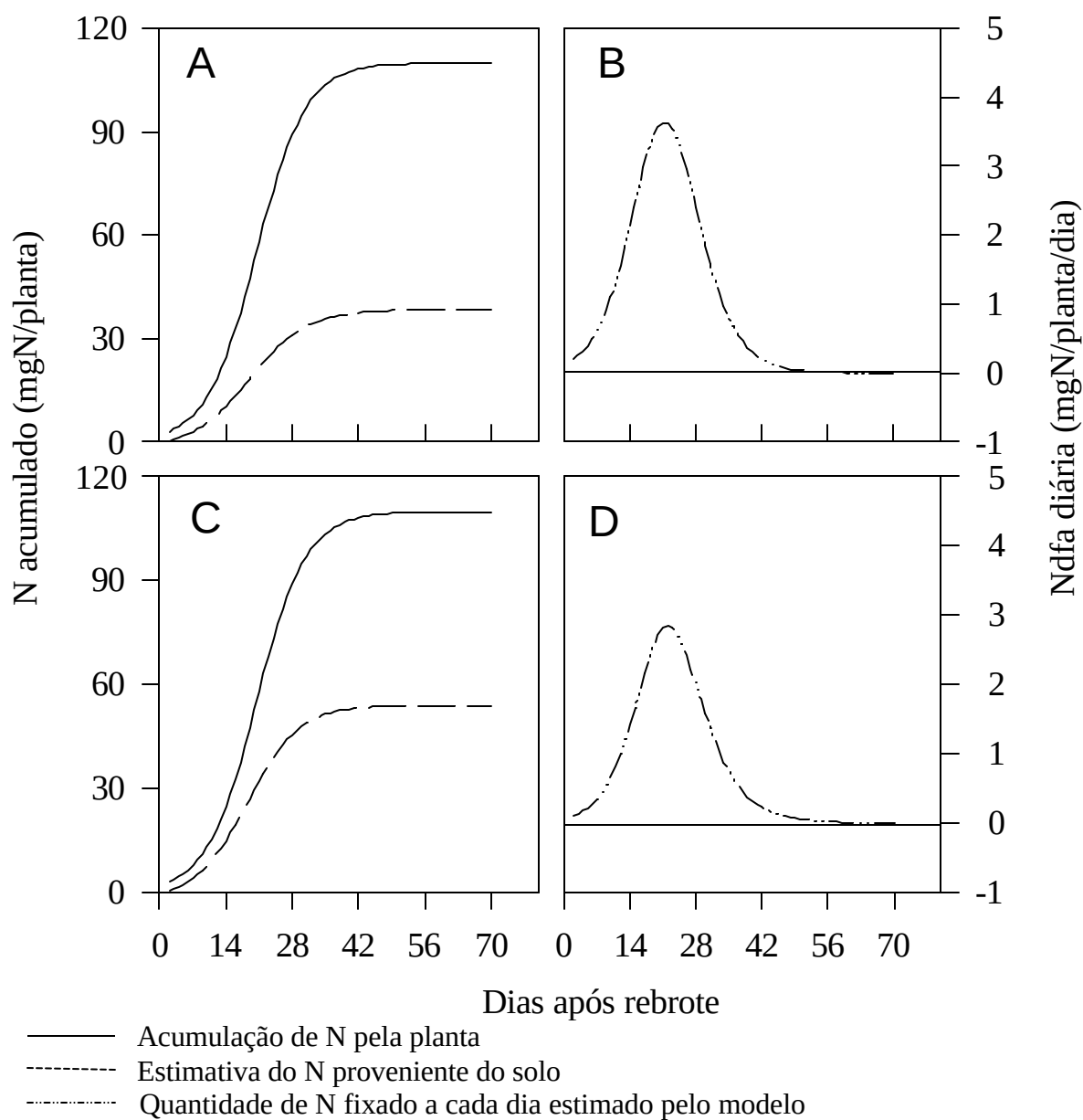


Figura 27. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 0,3% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

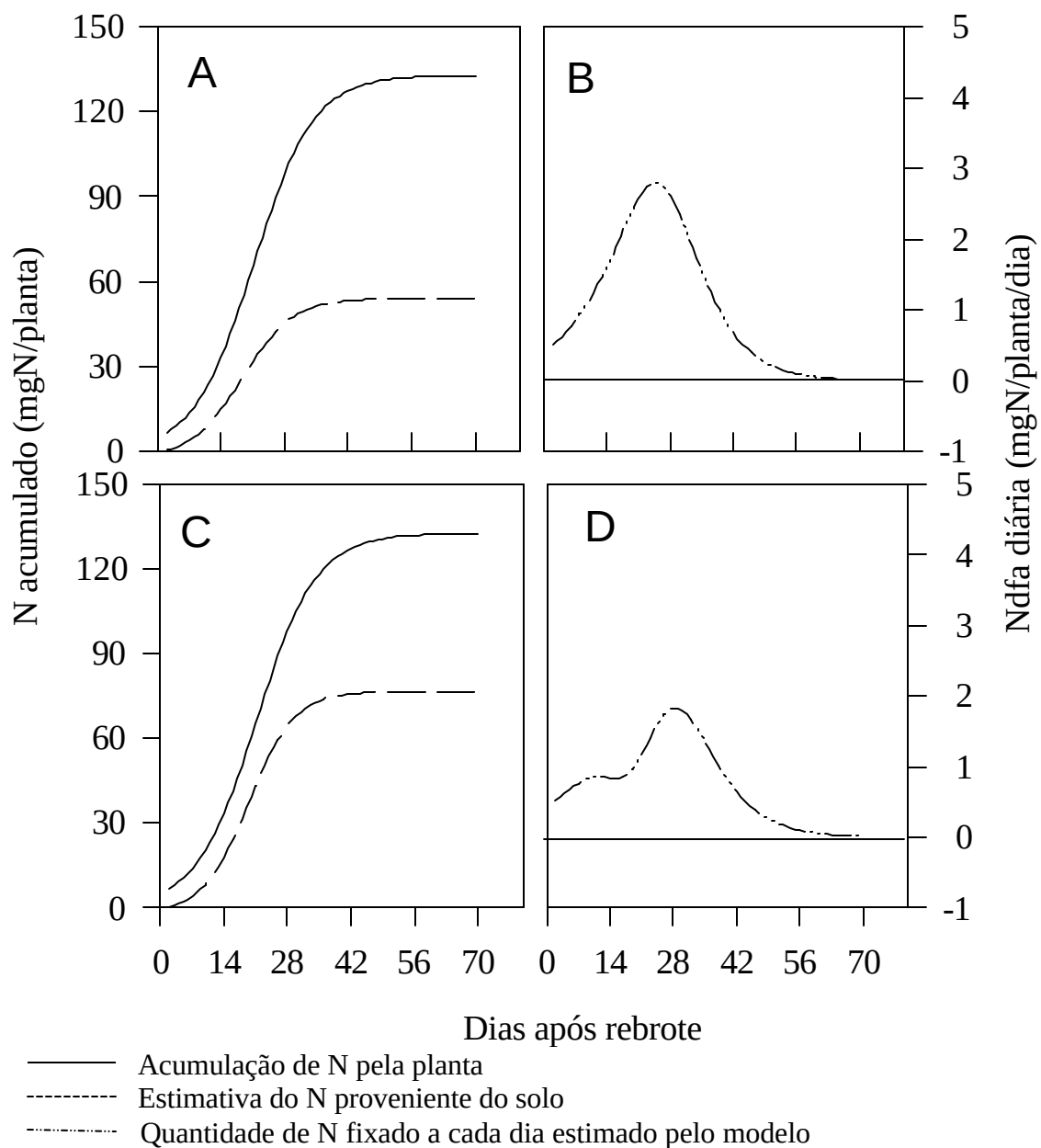


Figura 28. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 0,6% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

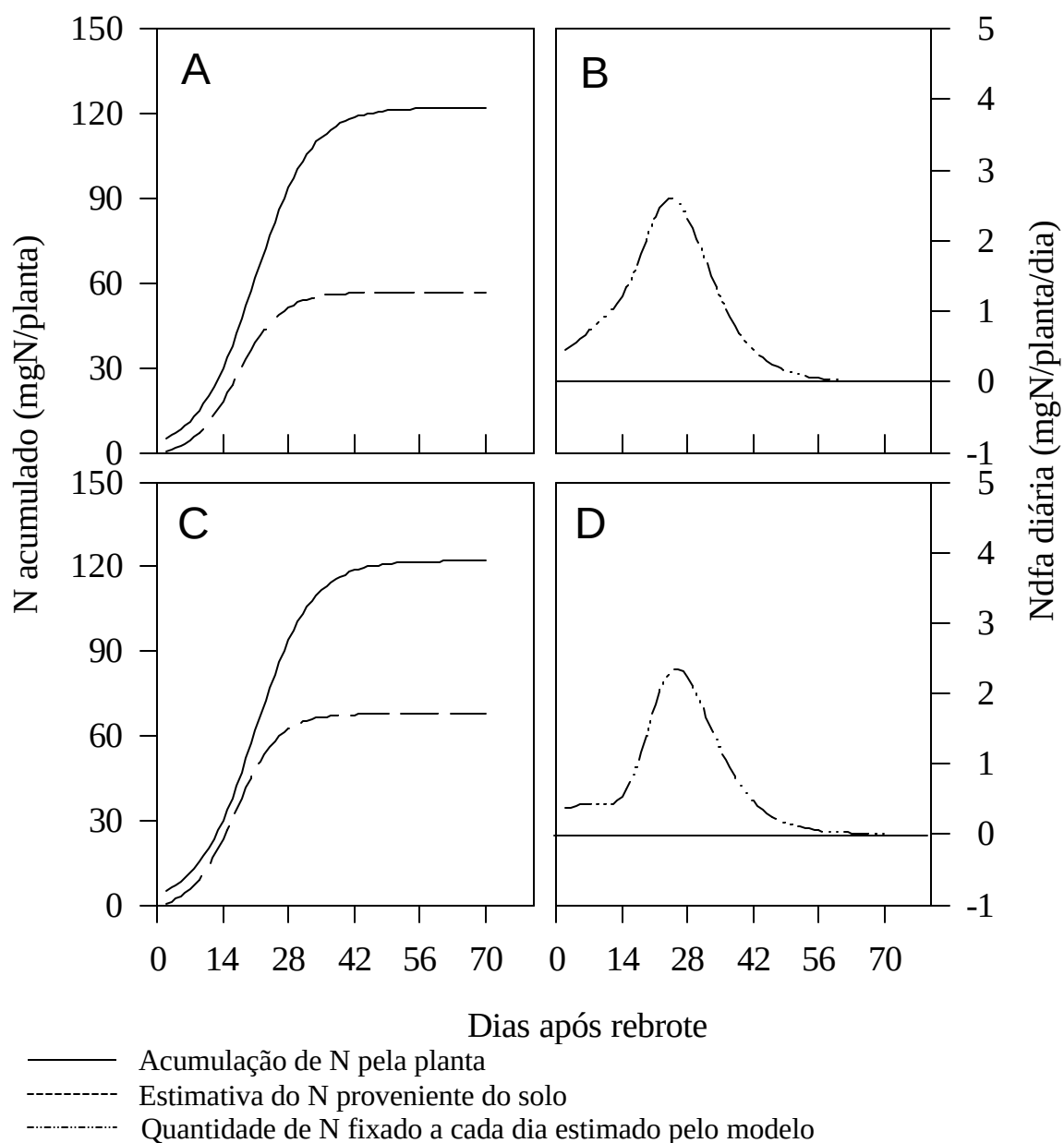


Figura 29. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 0,9% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

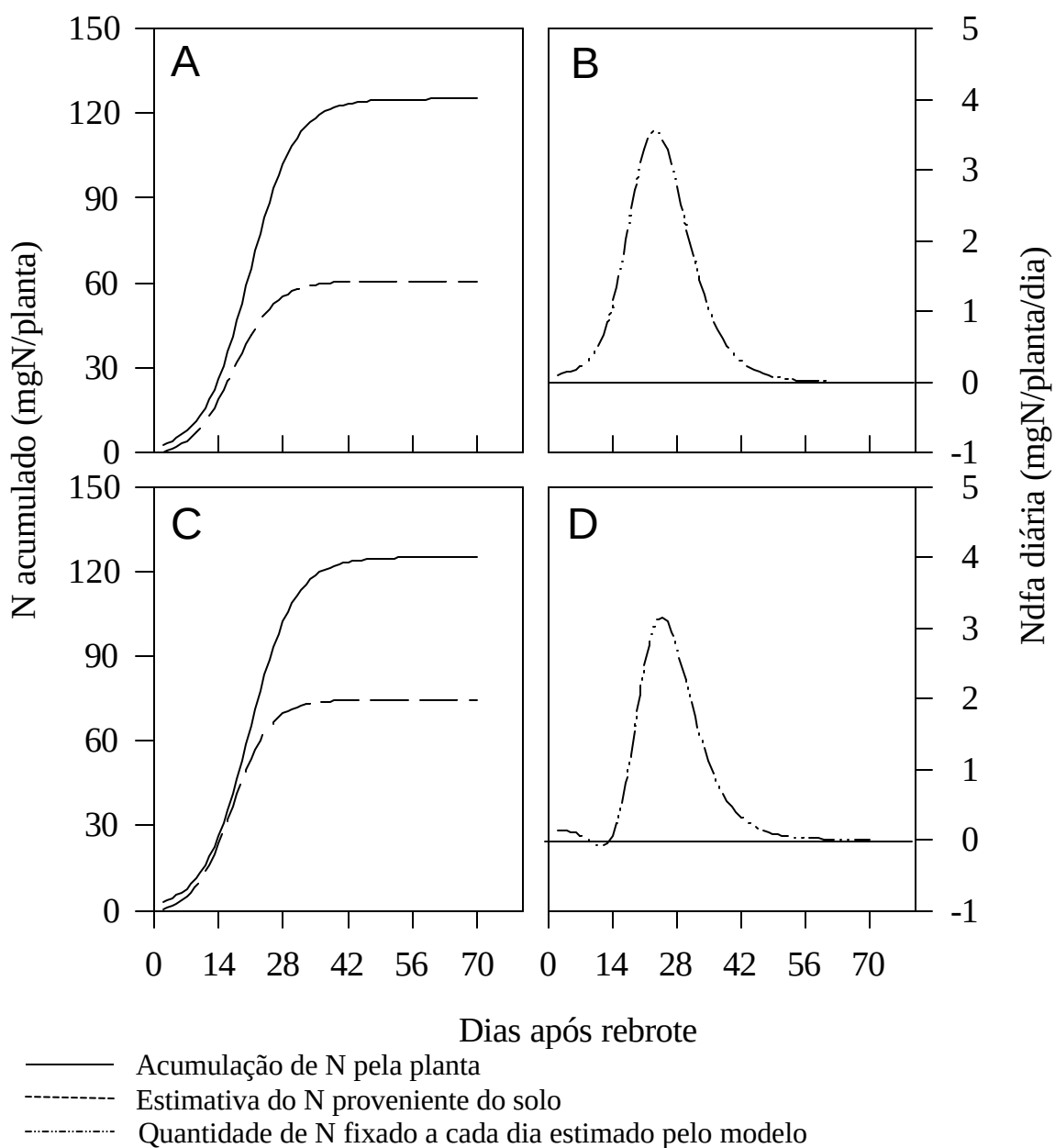


Figura 30. Acúmulo de N total e estimativa do N acumulado proveniente do solo para plantas de *D. ovalifolium* não-inoculado para o tratamento de 1,2% de palha. A estimativa foi baseada nos dados de acumulação diária de N total e  $^{15}\text{N}$  por *P. maximum* (A) e arroz (C). Também são mostrados a quantidade de N derivado da FBN a cada dia com base nos dados de *P. maximum* (B) e arroz (D).

(1989) O gênero *Desmodium* nodula com muitas estirpes de *Bradyrhizobium*, no entanto a simbiose é frequentemente ineficiente (CADISCH *et al.*, 1989 e VIERA-VARGAS *et al.*, 1994).

Embora a inoculação de plantas promiscuas seja recomendada para se aumentar a efetividade da simbiose, a resposta a inoculação só será observada se as estirpes já presentes no solo forem menos competitivas do que as estirpes usadas para a inoculação (DATE, 1991). Outra possibilidade, um pouco remota mas possível, para explicar a falta de resposta a inoculação é a pré-existência das estirpes específicas no solo, uma vez que o solo utilizado foi proveniente de uma área onde se cultivava *D. ovalifolium* há 6 anos.

As estimativas de FBN obtidas utilizando-se arroz como testemunha do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do solo foram as menores e situaram-se numa faixa de 45,5% a 50,7% do total de N acumulado. Já as estimativas com *P. maximum* foram um pouco maiores estando numa faixa de 49,3% a 68,9%.

Pelo teste da simulação feito entre *P. maximum* e arroz (Figuras 21 e 22), foi constatado que a utilização de arroz como testemunha do enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  do solo proporcionou uma subestimativa da acumulação de N por *P. maximum*. A hipótese de uma curva irreal ou para a acumulação de N ou para a recuperação de  $^{15}\text{N}$ , provavelmente pela variabilidade dos dados, pode explicar o estranho desenho das curvas de N proveniente da FBN para *D. ovalifolium* (especialmente Figuras 28 a 30, D). Devido a isso é prudente continuar a discussão dos dados tomando como base apenas os resultados obtidos com *P. maximum* como testemunha.

CADISCH *et al* (1989) encontraram uma contribuição da FBN para *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp., de 44% num tratamento onde não se adicionou ao solo PK e de 70% onde o fertilizante foi adicionado. Como comenta o próprio autor, a resposta a fertilização foi devida basicamente a fertilização com K. Nas condições deste experimento, o solo já apresentava quantidades de nutrientes que não seriam limitantes ao *D. ovalifolium* cv Itabela, que é capaz de atingir máxima produção sob 86% de saturação de Al e 2,6 mg/kg de P. Em

termos comparativos, os valores mais altos da contribuição da FBN observados foram em torno de 60-70% para o tratamento com menor adição de palha (0,3%), chegando a valores próximos a 50% para o tratamento de 1,2% de palha.

A quantificação da FBN pelo método tradicional e estimada para o N acumulado a cada dia foram bem contrastantes (Tabela 4). Novamente se observam estimativas fora da realidade obtidas utilizando-se arroz como testemunha que certamente resultaram de problemas com a curva de acumulação simulada. Nesta tabela observa-se que o incremento da contribuição de N derivado da FBN entre as épocas de colheita obtido a partir do método tradicional (MCAULIFFE *et al*, 1958) não correspondeu ao observado na simulação. Observando-se os dados de quantidade de N fixado a cada dia (Figuras 23 a 30, B), nota-se que a partir dos 35 dias a quantidade de N proveniente da FBN chega a valores bastante baixos, acompanhando a redução do crescimento da planta. Logo a diluição de  $^{15}\text{N}$  na planta que segue com a gradativa entrada de  $\text{N}_2$  fixado (0% átomos  $^{15}\text{N}$  em excesso) é muito baixa após os 35 dias. Isto faz com que a contribuição da FBN integrada por períodos de 14 dias mostrada pelo método tradicional tenda a se reduzir após este período, ou seja, após os 35 dias pouco N é acumulado pela planta porém com alta proporção do N proveniente da FBN. Ainda na Tabela 4, não se observa consistência nas diferenças entre os tratamentos de adição de palha, o que indica que a maior disponibilidade de N devido a este tratamento não foi suficiente para inibir a atividade fixadora. Como mostrado no experimento anterior para *D. ovalifolium* (capítulo 2), existe uma certa quantidade de N que deve estar disponível no solo para que fixação de  $\text{N}_2$  seja afetada sem no entanto se extinguir.

Tabela 4 - Estimativas da contribuição da FBN (% Ndfa) para plantas de *D. ovalifolium* cv Itabela, inoculadas ou não com estirpes específicas de *Bradyrhizobium* sp., utilizando-se o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  tradicional e a simulação planta-planta (BODDEY *et al*, 1986), tendo como testemunha *P. maximum* (PM) cv Centenário ou Arroz (AR).

| <i>D. ovalifolium</i> inoculado |             |      |           |       | Proporção da palha aplicada ao solo |      |           |      |             |      |           |      |             |      |           |      |                        |
|---------------------------------|-------------|------|-----------|-------|-------------------------------------|------|-----------|------|-------------|------|-----------|------|-------------|------|-----------|------|------------------------|
| DAC <sup>1</sup>                | 0,3%        |      |           |       | 0,6%                                |      |           |      | 0,9%        |      |           |      | 1,2%        |      |           |      | PM<br>DMS <sup>2</sup> |
|                                 | Tradicional |      | Simulação |       | Tradicional                         |      | Simulação |      | Tradicional |      | Simulação |      | Tradicional |      | Simulação |      |                        |
|                                 | PM          | AR   | PM        | AR    | PM                                  | AR   | PM        | AR   | PM          | AR   | PM        | AR   | PM          | AR   | PM        | AR   |                        |
|                                 | %Ndfa       |      | %Ndfa     |       | %Ndfa                               |      | %Ndfa     |      | %Ndfa       |      | %Ndfa     |      | %Ndfa       |      | %Ndfa     |      |                        |
|                                 |             |      |           |       |                                     |      |           |      |             |      |           |      |             |      |           |      |                        |
| 14                              | 45,1        | 38,9 | 43,1      | 63,4  | 33,9                                | 29,3 | 34,8      | 52,5 | 19,2        | 25,1 | 25,5      | 40,5 | 27,9        | 33,3 | 35,4      | 52,3 | 12,2*                  |
| 28                              | 64,3        | 60,5 | 57,9      | 70,1  | 43,8                                | 40,0 | 62,8      | 76,1 | 48,6        | 54,2 | 57,9      | 61,4 | 36,8        | 47,2 | 57,9      | 59,4 | 12,7*                  |
| 42                              | 59,4        | 58,3 | 61,9      | 53,9  | 61,8                                | 60,1 | 67,5      | 71,8 | 47,4        | 45,4 | 75,9      | 70,0 | 55,7        | 59,8 | 75,8      | 62,3 | 10,9                   |
| 56                              | 58,9        | 48,4 | 65,2      | 22,9  | 50,9                                | 46,9 | 70,6      | 62,0 | 49,3        | 44,8 | 83,9      | 72,1 | 54,9        | 57,9 | 83,5      | 60,5 | 8,5                    |
| 70                              | 58,3        | 53,1 | 67,7      | -20,8 | 56,6                                | 52,1 | 72,9      | 48,4 | 53,2        | 47,4 | 88,5      | 73,8 | 52,5        | 55,8 | 88,6      | 58,4 | 5,1                    |

| <i>D. ovalifolium</i> não-inoculado |             |      |           |      | Proporção da palha aplicada ao solo |      |           |      |             |      |           |      |             |      |           |      |                    |
|-------------------------------------|-------------|------|-----------|------|-------------------------------------|------|-----------|------|-------------|------|-----------|------|-------------|------|-----------|------|--------------------|
| DAC <sup>1</sup>                    | 0,3%        |      |           |      | 0,6%                                |      |           |      | 0,9%        |      |           |      | 1,2%        |      |           |      | Trad.<br>PM<br>DMS |
|                                     | Tradicional |      | Simulação |      | Tradicional                         |      | Simulação |      | Tradicional |      | Simulação |      | Tradicional |      | Simulação |      |                    |
|                                     | PM          | AR   | PM        | AR   | PM                                  | AR   | PM        | AR   | PM          | AR   | PM        | AR   | PM          | AR   | PM        | AR   |                    |
|                                     | %           |      | %         |      | %                                   |      | %         |      | %           |      | %         |      | %           |      | %         |      |                    |
|                                     |             |      |           |      |                                     |      |           |      |             |      |           |      |             |      |           |      |                    |
| 14                                  | 37,8        | 43,0 | 40,6      | 60,5 | 45,2                                | 41,4 | 23,0      | 43,8 | 33,3        | 38,1 | 13,9      | 31,2 | 20,9        | 26,9 | 21,3      | 27,1 | 10,1*              |
| 28                                  | 58,3        | 63,2 | 58,2      | 69,8 | 40,7                                | 43,9 | 45,2      | 64,8 | 45,8        | 51,8 | 64,5      | 67,5 | 32,9        | 43,9 | 68,5      | 69,6 | 15,3*              |
| 42                                  | 56,5        | 61,4 | 61,9      | 56,0 | 52,8                                | 54,5 | 78,4      | 81,2 | 50,0        | 48,6 | 89,3      | 86,7 | 48,1        | 52,8 | 88,2      | 81,6 | 7,2                |
| 56                                  | 46,1        | 60,2 | 65,8      | 32,9 | 42,8                                | 47,2 | 90,7      | 88,0 | 38,8        | 43,8 | 96,2      | 93,3 | 62,2        | 64,8 | 94,5      | 86,8 | 11,9*              |
| 70                                  | 54,2        | 58,3 | 67,5      | 0,0  | 52,1                                | 56,6 | 95,8      | 92,1 | 55,3        | 61,8 | 98,5      | 96,6 | 61,2        | 63,9 | 97,3      | 90,1 | 8,1                |

<sup>1</sup>Dias após o corte de uniformização; <sup>2</sup>Mínima diferença significativa (P=0,05) para o método tradicional e *P. maximum* como testemunha.

A diminuição da FBN é acompanhada com a diminuição da massa seca de nódulos VARGAS *et al* (1994), o que no experimento em questão ocorreu apenas com a diminuição do crescimento de *D. ovalifolium* e não por um efeito do aumento da proporção da palha.

A máxima quantidade de N derivado da FBN foi observada no mesmo período de máxima acumulação de matéria seca de nódulos (Figura 31). A alta variabilidade nos dados de massa seca de nódulos esconde qualquer diferença significativa entre o fato de se inocular ou não *D. ovalifolium*, embora se observe uma pequena tendência para uma maior quantidade de matéria seca no tratamento inoculado. A matéria seca de nódulos observada neste experimento é bastante alta e parte disto pode ser devida a dificuldade em se separar os pequenos nódulos de *D. ovalifolium* das partículas de solo e raiz. Valores de massa seca de nódulos por planta próximos às 400 mg/planta encontradas na segunda colheita deste experimento somente são esperados em plantas bem noduladas e com nódulos bem maiores como os da soja (PERES *et al*, 1989).

#### Análise de solutos em extratos de caule de *D. ovalifolium* e sua relação com a FBN

Durante as 4 primeiras semanas do experimento, as concentrações de nitrato no extrato variaram de 19,4 e 13,6  $\mu\text{M}$  a 29,1 e 23,2  $\mu\text{M}$ , para *D. ovalifolium* inoculado e não-inoculado, respectivamente. Estes valores caíram para cerca de 0,8  $\mu\text{M}$  na última amostragem. Considerando que por ter sido um experimento conduzido em vasos, a umidade do solo não tenha sido um fator limitante para o transporte dos solutos pela seiva (HERRIDGE, 1982a), os valores encontrados de nitrato no extrato de caule indicam uma maior acumulação desta forma de N nos primeiros 28 dias do experimento, que coincidiu com o período de máxima acumulação de N (Figuras 23 a 30 A e C). Em relação aos tratamentos de adição de palha, os valores médios de concentração de nitrato no extrato também indicaram um efeito positivo da adição de palha na quantidade deste elemento acumulada pela planta, sendo, para *D. ovalifolium* inoculado e não-inoculado, de 8,1 e

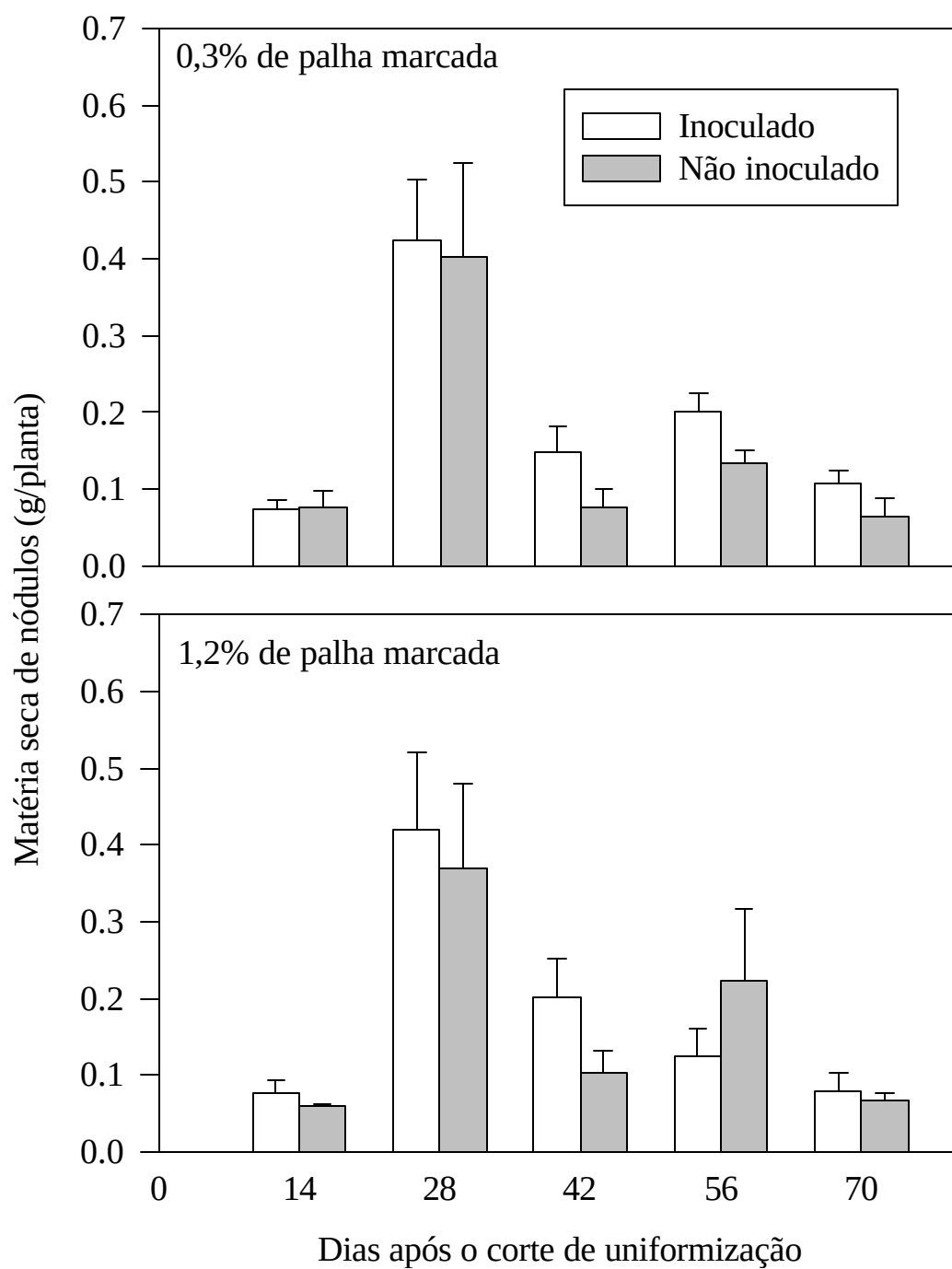


Figura 31. Variação do peso seco de nódulos por planta de *D. ovalifolium*, inoculada ou não, sob o efeito de diferentes tratamentos de palha. As barras indicam o erro padrão da média.

7,0  $\mu\text{M}$ ; 6,8 e 7,9  $\mu\text{M}$ ; 13,9 e 11,2  $\mu\text{M}$  e 9,2 e 9,9  $\mu\text{M}$  para os tratamentos de 0,3%; 0,6%; 0,9% e 1,2% de palha, respectivamente.

A concentração de ureídos manteve-se praticamente constante em torno de 10,0  $\mu\text{M}$  (12,2 a 9,8  $\mu\text{M}$ ), com relação ao volume de extrato, para todos os tratamentos de adição de palha, indicando uma constância na dependência pela FBN entre os tratamentos. Em relação ao tempo, também se observaram maiores valores de ureídos para as primeiras colheitas, porém a variação entre as médias observadas na primeira semana e na última foram pequenas, estando na faixa de 13,7 a 9,1  $\mu\text{M}$ .

Embora os valores absolutos de nitrato e ureídos presentes nos extratos de *D. ovalifolium* tenham sugerido alguns efeitos dos tratamentos, a abundância relativa de ureídos representa o melhor indicativo para se discutir a dependência da planta pela FBN (PEOPLES *et al*, 1989).

Comparando-se os valores de abundância relativa de ureídos com a contribuição diária da FBN para cada tratamento de palha encontraram-se altos coeficientes de determinação, tanto para *D. ovalifolium* inoculado (Figura 32) como para não inoculado (Figura 33). No entanto deve-se ressaltar que uma das razões para os altos valores está na pequena quantidade de pontos para cada comparação e também na pouca representatividade de um largo intervalo de dependência pela FBN. Na maioria das situações, os pontos se agruparam próximo a 100% de contribuição da FBN e apenas 1 ponto com valor mais baixo.

A partir da curva de calibração obtida pelo ensaio em condições controladas (capítulo 2), é possível calcular as contribuições obtidas da FBN (%Ndfa) para *D. ovalifolium* baseando-se na abundância relativa de ureídos. Utilizou-se a função linear uma vez que não se observou nenhuma diferença em relação ao coeficiente de determinação obtido no ajuste quadrático.

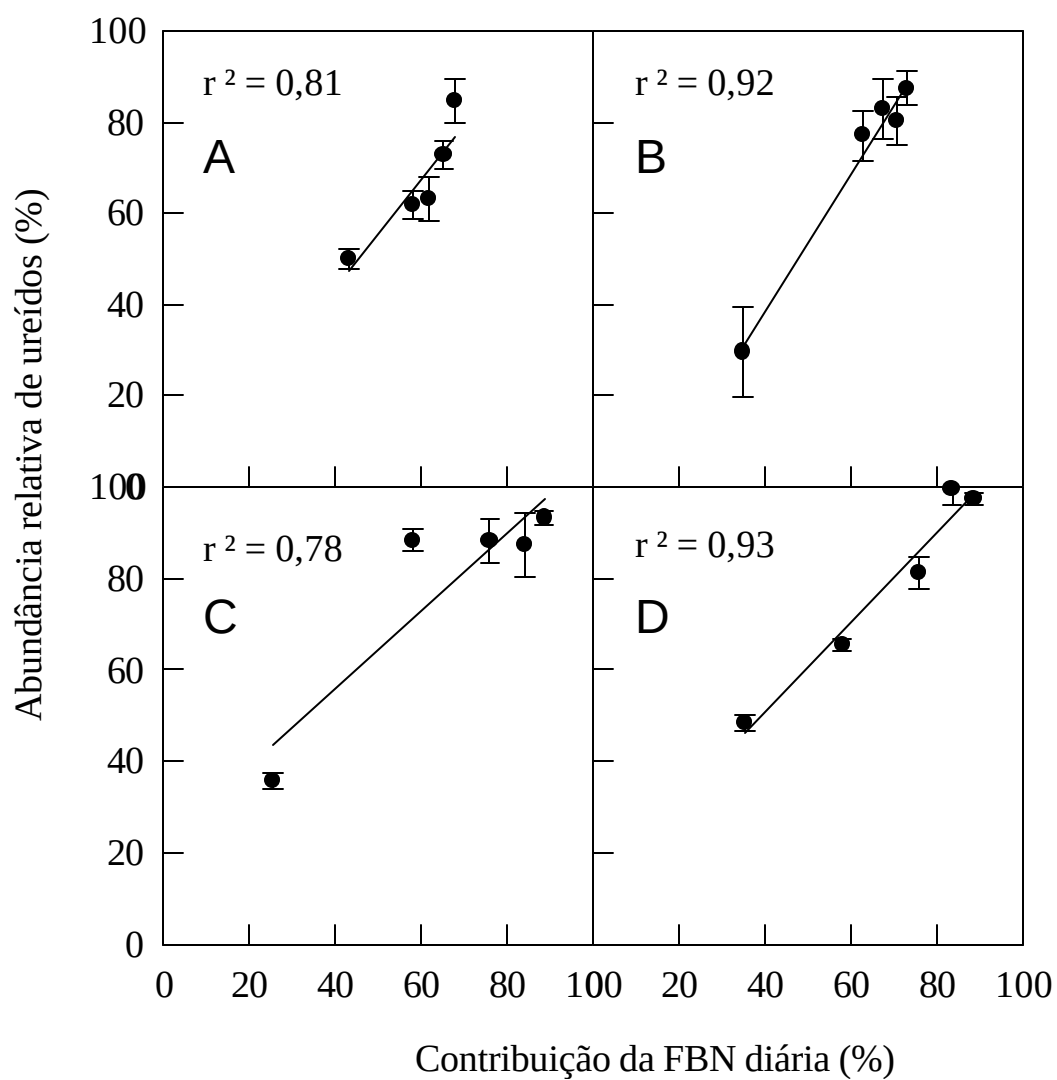


Figura 32. Correlações entre a contribuição diária da FBN e a abundância relativa de ureídos em *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp., obtidas para os tratamentos de palha A - 0,3%; B - 0,6%, C - 0,9% e D - 1,2%. As barras representam o erro padrão da média.

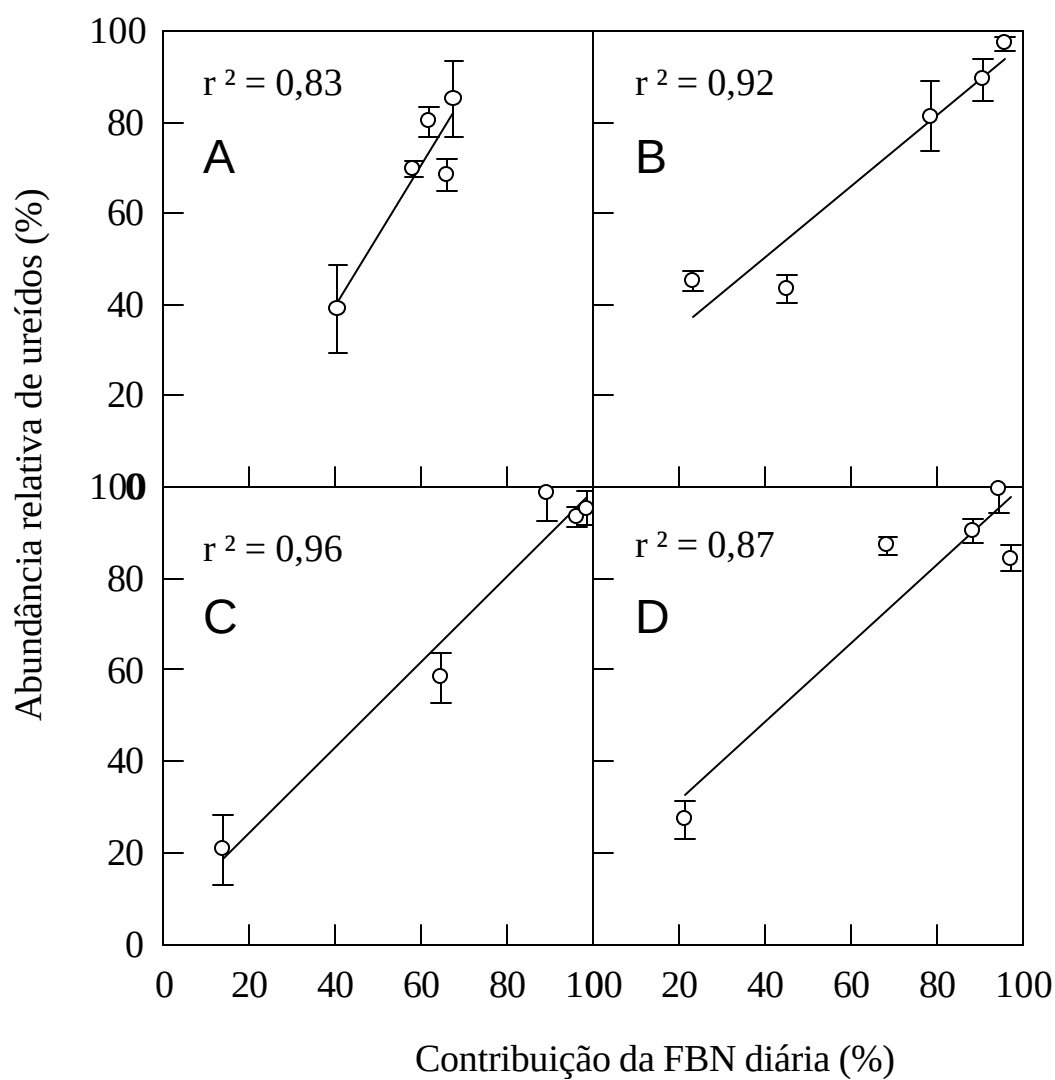


Figura 33. Correlações entre a contribuição diária da FBN e a abundância relativa de ureídeos em *D. ovalifolium*, não inoculado, obtidas para os tratamentos de palha A - 0,3%; B - 0,6%, C - 0,9% e D - 1,2%. As barras representam o erro padrão da média.

Correlacionando-se a contribuição da FBN diária fornecida pela curva de calibração e estimada pela simulação planta-planta, observou-se que tanto para o *D. ovalifolium* inoculado (Figura 34) como para o não inoculado (Figura 35), a técnica de abundância relativa de ureídeos superestimou a contribuição da FBN. Alguns valores de %Ndfa, calculados pela curva de calibração, foram superiores a 100%. A superestimativa do %Ndfa se deve ao fato de que a relação entre ureídeos e FBN foi diferente para as plantas de *D. ovalifolium* crescidas em vasos contendo solo (Figura 36 e 37), ou seja, a curva de calibração obtida em condições controladas não é semelhante a uma curva de calibração obtida em solo. Esta diferença poderia ser justificada por um efeito de estirpe, uma vez que a curva de calibração utilizada foi obtida em substrato contendo areia e solução nutritiva. Nos vasos contendo solo é possível que a estirpe usada como inóculo não tenha sido suficientemente competitiva em relação às estirpes pré-existentes no solo, o que poderia ser a explicação da baixa resposta da nodulação (Figura 31).

NEVES *et al* (1985) mostraram que a composição da seiva de plantas de soja se alterava significativamente dependendo da estirpe que nodulava a planta. A composição de ureídeos compreendeu 64 a 94% do total de N presente na seiva para plantas inoculadas com estirpes que produziam muitos nódulos porém eram ineficientes e 38 a 72% do total de N da seiva para estirpes que produziam poucos nódulos porém eram mais efetivas, embora a dependência pela FBN tenha sido muito semelhante para ambas as simbioses. O efeito da estirpe sobre a composição da seiva, conforme discute HERRIDGE & PEOPLES (1990), pode ser dependente da forma com que se estima a abundância relativa de ureídeos. Estes autores testaram 21 estirpes diferentes de *Rhizobium* e não mostraram qualquer relação entre estirpes mais eficientes e a composição nitrogenada da seiva. A abundância relativa de ureídeos foi calculada pela relação

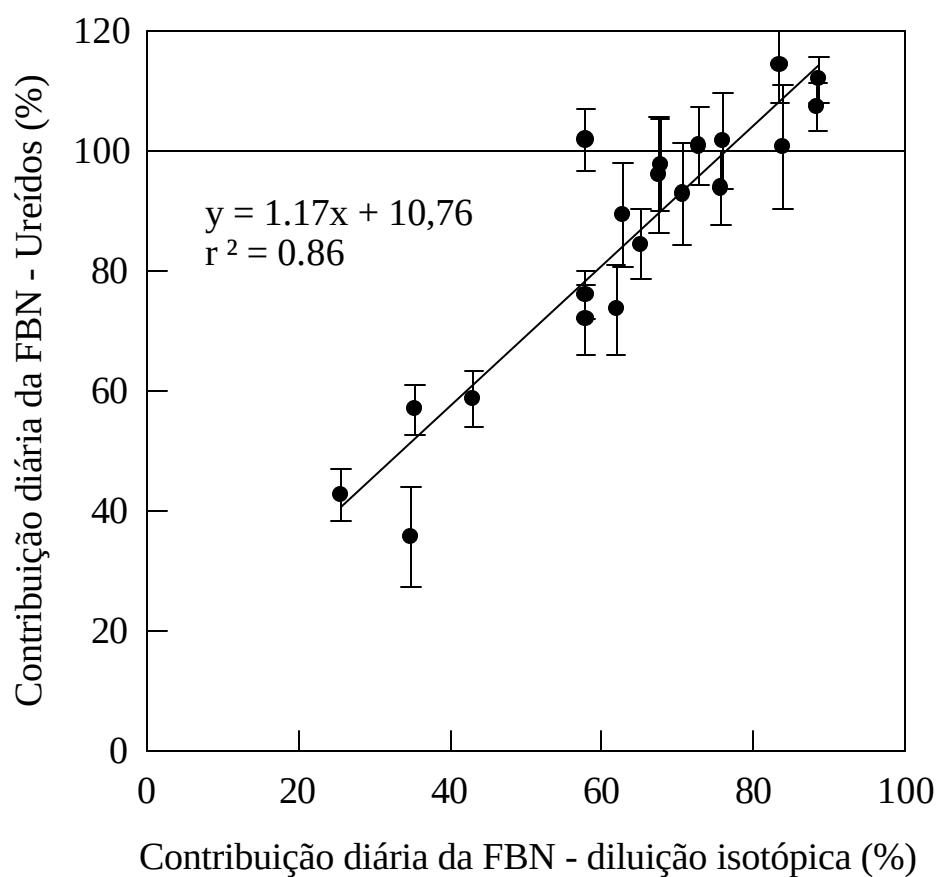


Figura 34. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de abundância relativa de ureídos e pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. As barras representam o erro padrão da média.

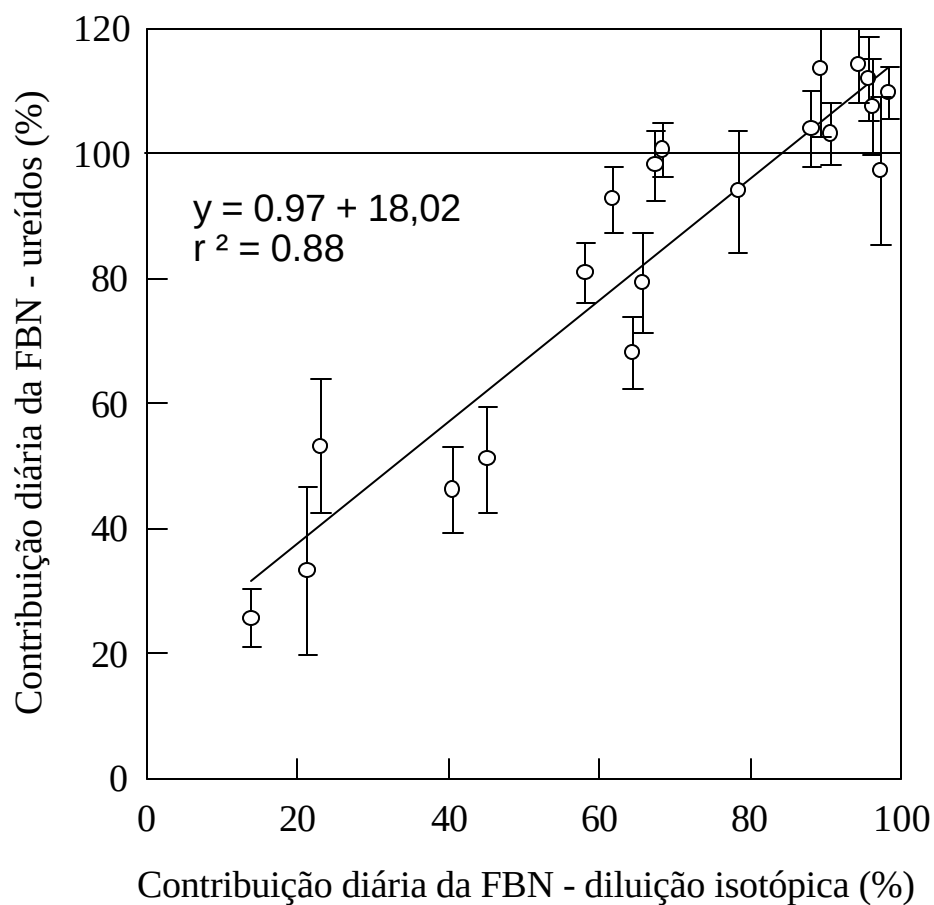


Figura 35. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de abundância relativa de ureídeos e pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em *D. ovalifolium* não inoculado, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. As barras representam o erro padrão da média.

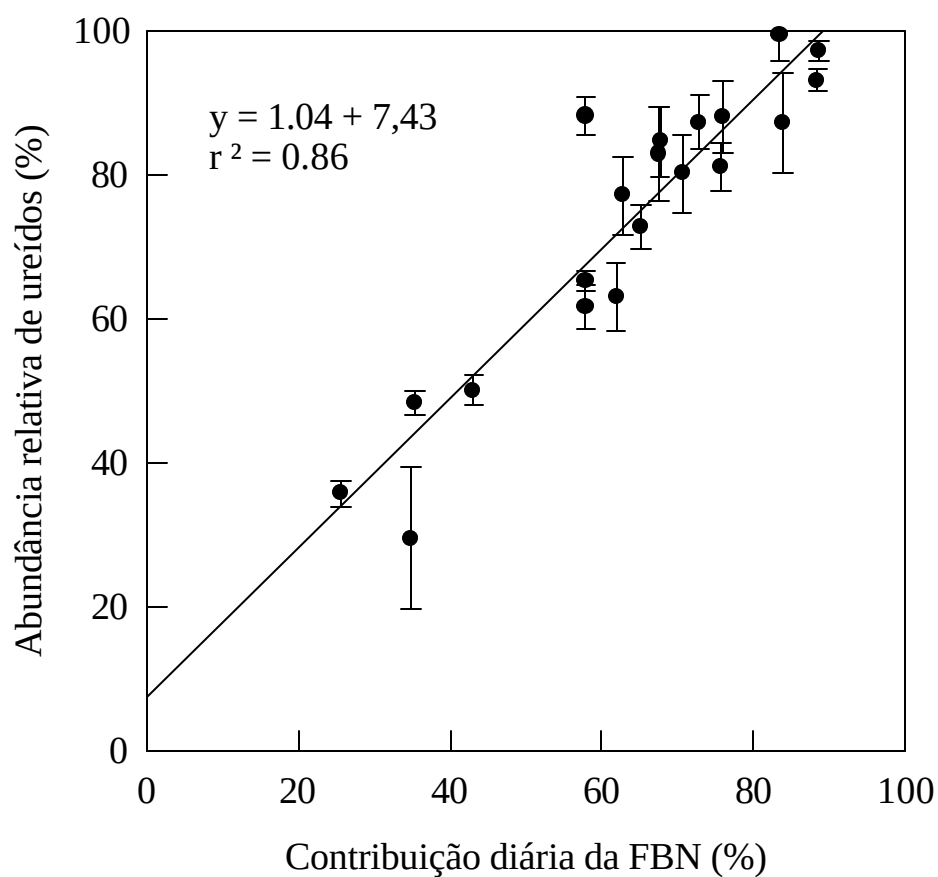


Figura 36. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e valores de abundância relativa de ureídeos para *D. ovalifolium*, inoculado com *Bradyrhizobium* sp, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. As barras representam o erro padrão da média.

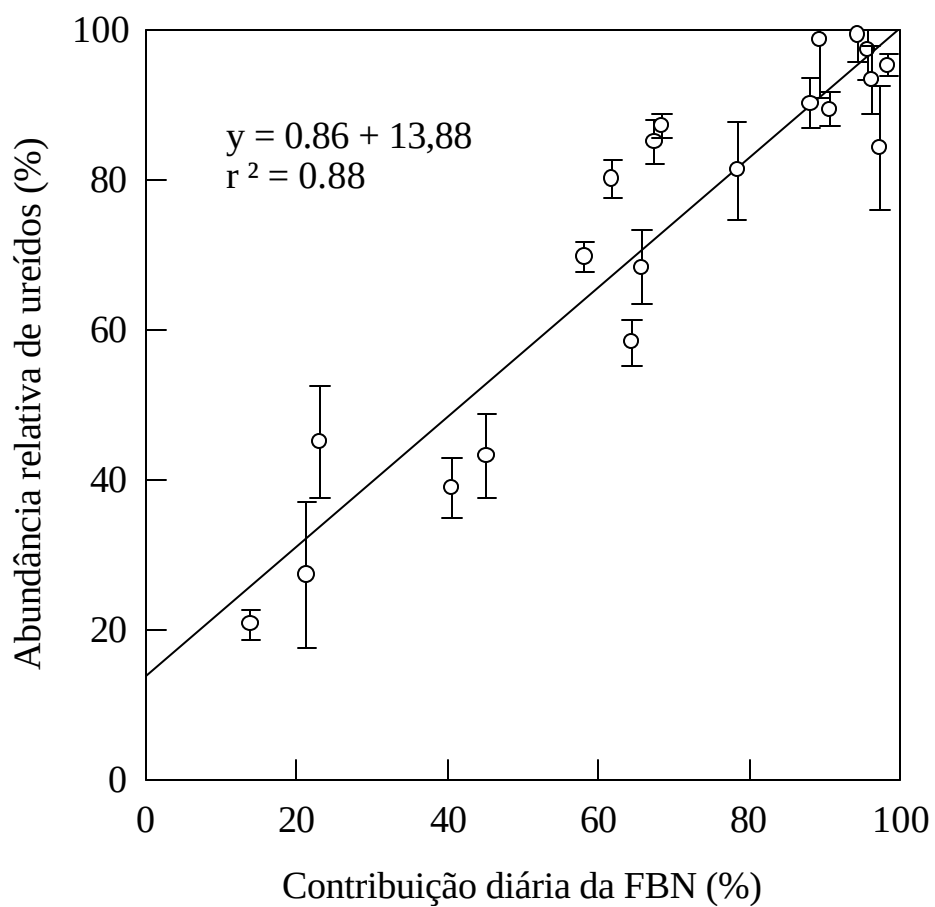


Figura 37. Correlação entre a contribuição diária da FBN estimada pela técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e valores de abundância relativa de ureídeos para *D. ovalifolium* não inoculado, obtida para todos os tratamentos de palha e épocas de colheita. As barras representam o erro padrão da média.

entre ureídos e, ureídos, nitrato e aminoácidos, ao contrário do estimado por NEVES *et al* (1985) que estimaram os ureídos pela relação ureídos sobre N total da seiva, onde se incluem as amidas. Conforme foi demonstrado por MINAMISAWA *et al* (1983), a relação de amidas em relação aos aminoácidos alterou-se em função do tipo de estirpe que nodulava raízes de soja. Ainda, HUNGRIA & NEVES (1987) apresentaram evidências de que existe uma relação inversa entre a eficiência de estirpes que nodulam feijão e a proporção de amidas na seiva xilemática.

Nas investigações que utilizam extratos de caule, a relação utilizada se dá entre ureídos e ureídos e nitrato. Dessa forma, a ausência de amidas na relação para expressar a abundância relativa de ureídos permitiria desprezar o efeito de estirpe, tal como sugerem HERRIDGE & PEOPLES (1990).

Uma outra possibilidade para a superestimação da FBN para *D. ovalifolium* seria a existência de um “background” de ureídos que pode ter se originado de uma fonte diferente da FBN (FUJIHARA *et al*, 1977). RICE *et al* (1990) mostraram haver uma acúmulo de ureído (alantoato) na parte aérea de soja devido ao aumento de fertilizante fornecido como nitrato de amônio. A acumulação de ureído foi cessada com a adição de alopurinol, inibidor da xantina desidrogenase, presente nos nódulos e atua no processo de formação de ureídos. No entanto o tamanho deste efeito é discutível. PEOPLES *et al* (1988) mostraram que o fornecimento de N na forma amoniacal para plantas de guandu (*Cajanus cajan*) inibiam a formação de ureídos tal como o nitrato, com a diferença de que a adição de amônio propiciou um aumento da fração aminoácido.

A aplicação da curva de calibração para estimar a dependência das plantas pela FBN parece funcionar relativamente bem quando o solo apresenta nitrato como forma de N mineral predominante (HERRIDGE *et al*, 1990). Num estudo com plantas de soja, estes autores mostraram uma boa conformidade entre as estimativas de FBN obtidas por abundância relativa de ureídos e pela técnica de variação natural de  $^{15}\text{N}$  (delta  $^{15}\text{N}$ ).

É possível que haja um comprometimento da técnica para determinação de ureídeos em extratos de caule. Como se observou no primeiro capítulo, a coloração amarela do extrato causa uma interferência em baixas concentrações de ureídeos. Conforme a técnica de abundância relativa de ureídeos foi proposta (McCLURE & ISRAEL, 1979), quanto maior a contribuição do N mineral do solo, menor a fração ureído no N total da seiva. Contudo a perda de sensibilidade para baixas concentrações de ureídeos faz com que se chegue a um patamar de absorbância comum a todos os extratos com concentrações inferiores ao limite de sensibilidade. Neste caso, a abundância relativa de ureídeos fica somente dependente da concentração de nitrato no extrato. Neste caso, as diferenças recairiam sobre os menores valores de contribuição da FBN, resultando em maior coeficiente angular da reta de regressão, trazendo maiores erros para a quantificação de valores extremos de FBN.

É possível que a curva de calibração obtida para condições controladas de fertilidade, principalmente em relação as formas de N, seja muito contrastante com o que se observa em solos tropicais sob pastagens. A presença de amônio como uma fonte importante de N para a planta face as condições de baixo pH e baixa fertilidade podem ser fatores importantes para modificar a relação da composição de N da seiva com a dependência do N proveniente da FBN. No entanto, enquanto não se reúnem informações para provar a existência destes efeitos sobre a relação entre a abundância relativa de ureídeos e a contribuição da FBN, a curva de calibração obtida em meio inerte deve ser utilizada para se estimar a FBN em *D. ovalifolium* baseando-se na abundância relativa de ureídeos, tal como recomendado por PEOPLES *et al.*(1989).

***Capítulo 4. Avaliação da técnica de abundância relativa de ureídos em  
Desmodium ovalifolium* cv Itabela, estabelecido no campo.**

## INTRODUÇÃO

Num grande programa para o manejo da FBN, nas regiões da Austrália, Nepal e Paquistão, através de consórcios e rotação de culturas, a técnica de abundância relativa de ureídos foi apontada como ferramenta para avaliar a eficiência do sistema simbiótico da leguminosa assim como os fatores edafoclimáticos que interferem neste processo (HERRIDGE *et al*, 1994). O uso da técnica de abundância relativa de ureídos está relacionado a sua praticidade e possibilidade de ser empregada a qualquer momento para avaliar o desempenho do sistema fixador da leguminosa, ao contrário das técnicas isotópicas que exigem o estabelecimento de áreas enriquecidas com  $^{15}\text{N}$  e testemunhas apropriadas (PEOPLES *et al*, 1989).

Vários estudos tem sido realizados no intuito de se saber o efeito da presença da leguminosa sobre a capacidade produtiva do pasto de gramínea (VALLIS, 1977; CADISCH *et al*, 1994; BODDEY *et al*, 1994). Com respeito ao *D. ovalifolium*, esta leguminosa forrageira tem sido empregada em pastagens de *Brachiaria humidicola*, e as investigações realizadas demonstraram um efeito positivo sobre o ganho de peso animal e sobre o ganho de N do sistema (BODDEY *et al*, 1994). Não obstante, esse aporte de N tem sido considerado com base no total de N acumulado pela leguminosa e pela informação da proporção deste N que é proveniente da FBN. Experimentos em microparcels foram delineados para a aplicação da técnica de diluição

isotópica de  $^{15}\text{N}$  para se obter a maioria desta informação (CADISCH *et al*, 1989; VIERA-VARGAS, 1994). No entanto, uma avaliação *in situ* certamente seria mais adequada, pois estaria considerando também o efeito do pastejo (desfolhamento, excretas etc) sobre a atividade de FBN (GILLER & WILSON, 1993).

O N proveniente da FBN pode se tornar disponível para a gramínea através da decomposição dos resíduos da leguminosa ou de forma mais imediata através das excretas dos animais (THOMAS, 1992; THOMAS *et al*, 1995). Neste sentido, o efeito sazonal sobre a FBN assume especial importância pois ao contrário dos períodos quentes e úmidos, a época fria e/ou de poucas chuvas implica num maior pastejo de leguminosas pois estas representam uma grande parcela da forragem verde em oferta, principalmente em áreas fortemente afetadas com grandes períodos de estiagem (MACEDO, 1995). Por outro lado, em épocas de elevadas temperaturas e precipitação a gramínea retoma seu pleno desenvolvimento e passa a responder pela quase totalidade da dieta dos animais.

Efeitos da temperatura e umidade sobre a atividade das estirpes fixadoras de  $\text{N}_2$ . Dados apresentados por JENSEN (1987) sugeriram que a redução da atividade fixadora observada em plantas de ervilha crescidas no campo estava relacionada a períodos de estresse hídrico. Segundo LAYZELL & MOLONEY (1994) o estresse hídrico pode estar relacionado com deficiência no suprimento de  $\text{O}_2$  para os nódulos, gerada por uma maior resistência a difusão desta substância. Por outro lado aventam-se também as hipóteses de que o estresse hídrico proporcionaria uma diminuição na capacidade respiratória dos bacteróides e também o declínio dos níveis de leghemoglobina (GUERIN *et al*, 1990). Dessa forma o baixo consumo de  $\text{O}_2$  pelos bacteróides poderia justificar uma maior resistência a difusão deste para evitar uma inativação total da nitrogenase.

Com respeito a temperatura, de forma geral o metabolismo dos nódulos aumenta diretamente com a temperatura resultando em  $Q_{10}$  de aproximadamente 2.0 (LAYZELL *et al*, 1983). No entanto uma generalização neste sentido é equivocada pois conforme relatam THOMAS & SPRENT (1984), existe uma diversidade muito grande a nível de espécies e estirpes com respeito a tolerância a várias faixas de temperaturas.

Com relação ao efeito sazonal JENSEN (1987), PEOPLES *et al* (1988), HERRIDGE & PEOPLES (1990) demonstraram que existe uma alteração na relação entre a abundância relativa de ureídos e a proporção do N derivado da FBN. Mais especificamente no período que compreende a floração ao enchimento de grãos, uma mesma abundância relativa de ureídos observada no período vegetativo representa uma maior proporção da FBN.

Para se avaliar a sustentabilidade da pastagem a longo prazo torna-se importante quantificar a contribuição da fixação biológica de  $N_2$  (FBN) à leguminosa, e portanto o ingresso de nitrogênio ao sistema solo/planta/animal.

Como visto anteriormente, a técnica de abundância relativa de ureídos representa uma alternativa quase que única para se avaliar a contribuição da FBN para leguminosas que já se encontram em sistemas estabelecidos.

O único estudo onde se aplicou a técnica de abundância relativa de ureídos para quantificação da FBN em condições de campo foi o publicado por HERRIDGE *et al* (1990). Foi demonstrado para soja, uma alta correlação entre a contribuição da FBN obtida pela abundância relativa de ureídos, com base na curva de calibração obtida por HERRIDGE & PEOPLES (1990), e a contribuição estimada pela técnica de abundância natural de  $^{15}N$  ( $\delta^{15}N$ ). Concluíram ser a técnica de abundância relativa de ureídos bastante sensível e prática para se determinar a contribuição da FBN para soja em condições de campo.

Nos capítulos anteriores desta tese, as altas correlações obtidas com as curvas de calibração que relacionaram a abundância relativa de ureídeos em extratos de caule e a contribuição da FBN por diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  para *D. ovalifolium*, crescido em vasos em casa de vegetação, sugerem que a contribuição da FBN para esta espécie também pode ser obtida de forma simples e rápida. No entanto, conforme discutido anteriormente, a presença de interferências para quantificar baixas concentrações de ureídeos nos extratos de caule de *D. ovalifolium* implica em possíveis erros na obtenção da curva de calibração em areia.

Dessa forma, objetivou-se aplicar a técnica de abundância relativa de ureído, a partir das curvas de calibração obtidas em areia e em solo e em uma primeira etapa comparar as estimativas obtidas com a contribuição da FBN estimada por diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . Posteriormente avaliou-se a contribuição mensal da FBN, através do *D. ovalifolium*, para um pasto consorciado de *Brachiaria humidicola* e *D. ovalifolium*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Comparação métodos (ureídos x $^{15}\text{N}$ )

O experimento foi instalado na Estação de Zootecnia do Extremo Sul da Bahia (CEPLAC). O solo correspondia a um podzólico vermelho-amarelo, apresentando pH - 5,5; C - 12,3 g/kg; N total - 0,92 g/kg; Al - 0,1 cmol/kg, Ca+Mg - 3,7 cmol/kg; P (Mehlich I) - 3 mg/kg e K - 119 mg/kg. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 5 repetições. Cada bloco correspondeu a uma área de 54 m<sup>2</sup> (7,2 x 7,5m), sendo o plantio feito em sulcos distanciados 20cm um do outro. O bloco foi composto pelas espécies *D. ovalifolium* cv Itabela, *Brachiaria humidicola* e *Panicum maximum* cv KK16, as duas gramíneas como testemunhas não fixadoras de N<sub>2</sub>. As espécies foram estabelecidas em 3 faixas em cada parcela. Após o estabelecimento das plantas (20 dias após o plantio) foi feito um corte de uniformização e foi adicionado sulfato de amônio marcado com  $^{15}\text{N}$  (0,1g  $^{15}\text{N m}^{-2}$ ) misturado com sacarose numa relação C:N de 10:1, para proporcionar uma liberação lenta do  $^{15}\text{N}$  a fim de se obter uma marcação mais estável do solo (GILLER & WITTY, 1987).

Uma primeira avaliação foi feita no mês de julho, 60 dias após a adição de fertilizante marcado com  $^{15}\text{N}$ . As plantas sofreram um novo corte e após 5 semanas fez a colheita. A parte aérea das plantas teve seu material separado em colmos e folhas. Da mesma maneira, uma nova amostragem foi realizada no mês de janeiro para se avaliar a FBN no verão.

Na amostra do material secado e moído dos colmos de *D. ovalifolium*, foi determinada a concentração do  $\text{N-NO}_3^-$  e N-Ureído conforme capítulos 1, e ainda feitas as análises de enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  para quantificação da FBN pelo método tradicional de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (capítulo 2).

## 2. Avaliação sazonal da FBN

O principal objetivo deste experimento foi o de mostrar o quanto é prática a aplicação da técnica de análise de solutos do extrato de caule (seiva) para a quantificação da FBN em sistemas já estabelecidos no campo.

Para este experimento, foi utilizada uma área de pastagem de *B.humidicola/D. ovalifolium* em piquetes, já estabelecida desde 1988, onde vem se avaliando vários parâmetros zootécnicos da forragem. O experimento é composto de piquetes cuja área é suficiente para proporcionar 3 diferentes taxas de lotação animal (2, 3 e 4 animais/ha) e com 3 repetições.

Próximo aos piquetes se encontra uma estação meteorológica de onde foram tomados dados de precipitação e temperaturas (máxima, mínima e média) mensais.

Nos meses que compõem final de inverno, primavera e verão, foram avaliados a proporção de leguminosa no pasto e a proporção de ureídos nos extratos de caule. Para a avaliação deste último parâmetro, utilizou-se a curva de calibração obtida em areia, uma vez que este é o processo padrão recomendado para a aplicação da técnica de abundância relativa de ureídos.

A colheita do material da leguminosa foi feito juntamente com as amostragens para determinação da propoção da leguminosa no pasto. O material colhido sofreu o mesmo tratamento do descrito no capítulo 2 e 3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.Comparação métodos (ureídos x $^{15}\text{N}$ )

Os resultados de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  mostraram uma contribuição da FBN para o *D. ovalifolium* que variou ao redor de 52% em janeiro e de 30 a 40% em julho, dependendo da gramínea usada como testemunha (Tabela 5).

A quantificação da FBN em condições de campo, tomando como base a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  mostrou que, nas referidas condições, *D. ovalifolium* não apresenta uma grande dependência desta fonte de N (Tabela 5), confirmando observações anteriores (CADISCH *et al.*, 1989; VIERA-VARGAS, 1994). Embora a quantificação da FBN estimada pela curva de calibração obtida em areia tenha mostrado a mesma tendência das estimativas de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  estes foram superestimados se comparados ao método isotópico. Já as estimativas obtidas pelo método de abundância relativa de ureídos, através das curvas de calibração determinadas para o solo, inoculado ou não com *Bradyrhizobium* sp, forneceram estimativas da FBN muito próximas das estimativas obtidas por diluição isotópica.

Tabela 5 - Contribuição da FBN segundo o método de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e o de abundância relativa de ureídeos, cujas curvas de calibração foram obtidas em cultivo em areia (capítulo 2) ou em solo (capítulo 3). Neste último caso sob inoculação ou não com *Bradyrhizobium* sp. Médias de 5 repetições.

| Mês de Amostragem | % Ndfa                                |                                 |             |               |
|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-------------|---------------|
|                   | Diluição isotópica de $^{15}\text{N}$ | Abundância Relativa de Ureídeos |             |               |
|                   |                                       | Curva areia                     | Curva solo  |               |
|                   |                                       |                                 | inoculado   | não inoculado |
| Janeiro           | 53,0 (9,2) <sup>a</sup>               | 71,8 (14,1)                     | 52,1 (12,3) | 55,5 (11,3)   |
|                   | 52,6 (10,7) <sup>b</sup>              |                                 |             |               |
| Julho             | 30,4 (9,8) <sup>a</sup>               | 49,2 (12,6)                     | 32,9 (10,7) | 32,1 (9,5)    |
|                   | 40,6 (7,2) <sup>b</sup>               |                                 |             |               |

Valores entre parênteses correspondem ao erro padrão da média.

<sup>a</sup> *B. humidicola* como planta controle.

<sup>b</sup> *P. maximum* como planta controle.

Neste ponto, surge uma dúvida. Se a técnica de abundância relativa de ureídeos é pontual uma comparação única entre estas estimativas e as obtidas por diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , que é um método que integra toda a atividade de fixação de N durante o período de estudo, seria um equívoco. No capítulo 2 e 3 foi possível mostrar que para *D. ovalifolium* existe uma estreita relação entre a abundância relativa de ureídeos e as estimativas pontuais da fixação biológica do N a partir de uma integração entre modelos de simulação e a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ . Também pode-se notar que para a maioria dos casos estudados (capítulos 2 e 3), parece existir uma certa relação entre os dados integrados e os dados pontuais, embora não se tenha medido este efeito. Ainda HERRIDGE & PEOPLES (1990) obtiveram excelentes coeficientes de correlação entre as determinações pontuais da abundância relativa de ureídeos e a proporção de N derivado da FBN integrados em períodos de 7 dias. Tais fatos sugerem que para períodos de avaliação não muito prolongados e sem grandes estresses de origem climática, é possível que a abundância relativa de ureídeos permaneça dentro de um patamar mais ou menos constante e permita refletir de forma integrada a proporção de N derivado da FBN dentro deste período, tal como foi observado por HERRIDGE *et al* (1990).

Com base no suposto acima, a curva de calibração obtida para solo parece ser a mais adequada para se determinar a proporção do N derivado da FBN presente em plantas de *D. ovalifolium*. A inoculação não propiciou grandes diferenças nas estimativas uma vez que ambas as curvas para solo, inoculado ou não, foram muito semelhantes. No entanto, as informações obtidas no experimento em areia (capítulo 2) não podem ser desprezadas uma vez que seguem procedimentos já aplicados com sucesso para várias espécies (PEOPLES *et al*, 1988; HERRIDGE & PEOPLES, 1990; HERRIDGE *et al*, 1996).

## 2. Avaliação sazonal da FBN

A proporção de *D. ovalifolium* no material em oferta de durante os meses de agosto a Fevereiro de 1995 esteve ao redor de 30% da matéria seca nos piquetes com a menor taxa de lotação (2 animais/ha), mostrando uma tendência a ser menor na maior taxa de lotação (4 animais/ha).

Não se observaram efeitos significativos da taxa de lotação sobre as estimativas de FBN. A contribuição da FBN para o *D. ovalifolium* (Figura 38B) esteve ao redor de 50% durante grande parte do período avaliado, com exceção do encontrado no mês de agosto quando a estimativa do %Ndfa foi de 35%. A baixa FBN coincidiu com a fase reprodutiva do *D. ovalifolium*, que para as condições da região, tem suas sementes amadurecidas no final de agosto. A queda na atividade da FBN tem sido observada no período de enchimento de sementes para espécies leguminosas não forrageiras (JENSEN, 1987), e uma forte hipótese para tal fato é a escassez de fotossintatos nos nódulos ocasionada pelo dreno para o enchimento das sementes (PEAT *et al.*, 1981). Não obstante, JENSEN (1987) sugere também que a queda nas taxas de FBN possam estar relacionadas a períodos de poucas chuvas. Com base nos dados de precipitação média mensal (Figura 38C), pode-se observar também que as menores estimativas de %Ndfa estão associadas a períodos de baixa precipitação, sendo que a redução da FBN observada em janeiro e fevereiro não acompanhou a forte redução das chuvas.

Quanto a temperatura (Figura 38A) as menores contribuições foram observadas nos períodos mais frios o que concorda com o discutido por LAYZELL & MOLONEY (1994). No período mais quente, onde se observou maior escassez de chuvas, o regime de temperaturas mais quentes parece ter sido importante para atenuar os efeitos de estresse hídrico sobre o sistema fixador.

Por outro lado, deve-se considerar que a baixa contribuição da FBN para este período pode ser apenas um artefato da curva de calibração empregada que foi obtida somente para o período de desenvolvimento vegetativo desta espécie.

Este experimento permitiu demonstrar a aplicabilidade da técnica de abundância relativa de ureídos para sistemas estabelecidos e a sua melhor utilização para *D. ovalifolium* dependerá de estudos direcionados a intervalos de tempo entre amostragens e curvas de calibração para a fase reprodutiva desta espécie.

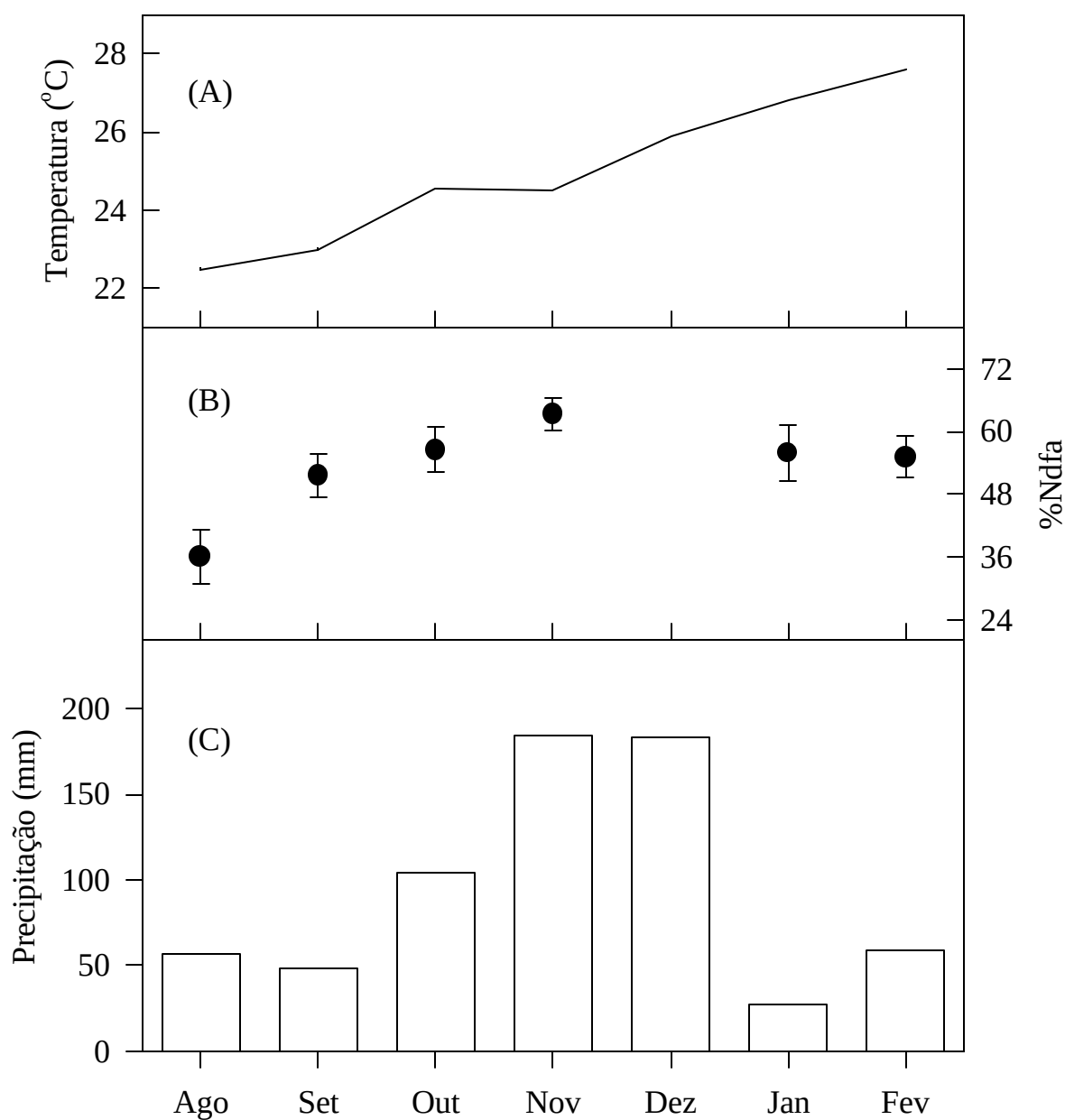


Figura 38. Médias mensais de temperatura (A) e precipitação (C), registradas na Estação de Zootecnia do Extremo Sul da Bahia (ESSUL/CEPLAC), e estimativas da contribuição da FBN (%Ndfa) para *D. ovalifolium* (B), obtidas através da técnica de análise de ureídos em extratos de caule segundo a equação:  $\%Ndfa = 0.0013(ARU)^2 + 0.7544(ARU) + 0.2764$ , onde (ARU) significa a abundância relativa de ureídos no extrato de caule.

## CONCLUSÕES GERAIS

- A análise de nitratos em extratos de colmos de *D. ovalifolium* através da metodologia de fluxo contínuo reduziu significativamente as interferências do extrato quando se inseriu a coluna de resina trocadora de anions no sistema de análise em fluxo.
- A análise de ureídos em extratos de caule de *D. ovalifolium* através da reação Rimini-Schryver sofre interferência da matriz do extrato, porém o efeito não é aditivo. Se seguido o protocolo especificado neste trabalho a metodologia oferece sensibilidade a pelo menos 10 nmoles de alantoína por mL de extrato.
- A avaliação durante o dia da abundância relativa de ureídos indica que este parâmetro é bastante estável durante o período de 7:00h as 19:00 para *D. ovalifolium*.
- A abundância relativa de ureídos em extratos de colmos de *D. ovalifolium* cv Itabela está diretamente relacionada com a proporção do N derivado da FBN acumulado a cada dia.

- O emprego da curva de calibração de abundância relativa de ureídos obtida em areia para quantificação da FBN para *D. ovalifolium* produziu valores mais altos do que a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ .
- A contribuição da FBN para *D. ovalifolium*, tanto cultivado em vasos ou diretamente no campo esteve em torno de 50%, tendendo a diminuir nos períodos mais frios e secos.
- A técnica de abundância relativa de ureídos foi promissora para quantificar a contribuição da FBN em *Desmodium ovalifolium* estabelecido no campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS M.A. & ATTIWILL P.M. (1986) Nutrient cycling and nitrogen mineralization in eucalypt forests of south-eastern Australia. II. Indices of nitrogen mineralization. *Plant Soil*, v.92, p.341-362.
- ALVES B.J.R. (1992) Avaliação da mineralização do N do solo in situ. Tese de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí, RJ, 155 p.
- ALVES B.J.R., URQUIAGA S., CADISCH G., SOUTO C.M. & BODDEY R.M. (1992) In situ estimation of soil nitrogen mineralization. In. Dynamics of Soil Organic Matter in Relation to Sustainability of Tropical Agriculture. (K. Mulonguy & R. Merckx, eds). Sayce Publishing, Exeter, UK.
- ALVES B.J.R., RESENDE C. DE P., RESENDE A. S., BODDEY R.M. & URQUIAGA S. (1995) Uso da incubação *in situ* no estudo da mineralização do N do solo: Uma possibilidade para a estimativa da contribuição da FBN em condições de campo. In: Anais do Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Viçosa, Minas Gerais.
- APP A.A., WATANABE I., ALEXANDER M., VENTURA W., DAEZ C., SANTIAGO T. & DE DATTA S.K. (1980) Non symbiotic nitrogen fixation associated with the rice plant in flooded soils. *Soil Sci.* 130:283-287.

- BLOOM A.J. (1994) Crop Acquisition of ammonium and nitrate. In: Physiology and Determination of Crop Yield, Boote *et al* Eds. p. 303-309. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Winsconsin.
- BLOOM A.J., CALDWELL R.M., FINAZZO J., WARNER R.L. & WEISSBART J. (1989) Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. *Plant Physiol.* 91:352-356.
- BLOOM A.J., SUKRAPANNA S. & WARNER R.L. (1992) Root respiratory associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99:1294-1301.
- BODDEY R.M., CHALK P.M., VICTORIA R.L., MATSUI E. & DÖBEREINER J. (1983) The use of  $^{15}\text{N}$  dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. Batatais. *Can. J. Microbiol.* 29:1036-1045.
- BODDEY R.M. (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6:209-266.
- BODDEY R.M., URQUIAGA S. & NEVES M.C.P. (1990) Quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to field-grown grain legumes - A strategy for the practical application of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. *Soil Biol. Biochem.* 22:649-655.
- BODDEY R.M., RESENDE C. DE P., PEREIRA J.M., CANTARUTTI R.B., ALVES B.J.R., FERREIRA E., RICHTER M., CADISCH G. & URQUIAGA S. (1994) The nitrogen cycle in pure grass and grass/legume pastures: evaluation of pasture sustainability. In: Nuclear Techniques in Soil-Plant Studies for Sustainable Agriculture and Environmental Preservation. p. 309-319. Vienna, Austria: FAO/IAEA.
- BODDEY R.M., OLIVEIRA, O.C.DE, ALVES B.J.R. & URQUIAGA S. (1995) Field application of the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. *Fertilizer Research.* 42:77-87.
- BODDEY R.M., MÜLLER S. & ALVES B.J.R. (1996) Estimation of biological  $\text{N}_2$  fixation to two *Phaseolus vulgaris* genotypes using simulation of plant nitrogen uptake from  $^{15}\text{N}$  labelled soil. *Fert Res* (no prelo).

- BOSATTA E. & BERENDSE, F. (1984) Energy or nutrient regulation of decomposition: implications for the mineralization-immobilization response to perturbations. *Soil Biol. Biochem.*, 16: 63-67.
- BREMNER J.M. (1965) Inorganic nitrogen. In: C.A. Black *et al* (eds) *Methods of Soil Analysis*. Part II. Agronomy no 9. pp 1179-1237. American Society of Agronomy, Madison WI.
- BREMNER J.M. & MULVANEY C.S. (1982) Nitrogen-total. In: *Methods of Soil Analysis*. Monograph n9(2). Page *et al* Eds. American Society of Agronomy, madison Wisconsin. p 643-672.
- BURRIS R.H. (1975) The acetylene reduction technique. In: *Nitrogen fixation by free-living microorganisms*. D.P. Stewart ed. International Biological Programme. v6, p. 249-258. Cambridge Univ. Press., New York.
- CADISCH G., SYLVESTER-BRADLEY R. & NÖSBERGER J. (1989)  $^{15}\text{N}$ -based estimation of nitrogen fixation by eight tropical forage legumes at two levels of P:K supply. *Field Crops Research*. 22: 181-194.
- CADISCH G., SCHUNKE R.M. & GILLER K.E. (1994) Nitrogen cycling in a pure grass pasture and a grass-legume mixture on a red latosol in Brazil. *Tropical Grasslands*, 28:43-52.
- CATALDO D.A., HAROON M., SCHRADER L.E. & YOUNGS V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6:71-80.
- CHALK P.M. (1985) Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution; an appraisal of techniques involving  $^{15}\text{N}$  enrichment and their applications. *Soil Biol. Biochem.* 17:389-410.
- DANSO S.K.A. (1988) The use of  $^{15}\text{N}$  enriched fertilizers for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture* (D.P. Beck & L.A. Materon) pp 345-358. Martinus Nijhoff, Dordrecht, Netherlands.
- DATE R.A. (1991) Nodulation success and persistence of recommended inoculum strains for subtropical and tropical forage legumes in northern Australia. *Soil Biol. and Biochem.* 23: 533-541.

- DATTA D.B., TRIPLETT E.W. & NEWCOMB E.H. (1991) Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications of the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:4700-4702.
- DELWICHE C.C. & STEYN P.L. (1970) Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environ. Sci. Tech.* 4:929-935.
- DE-POLLI H., MATSUI E., DÖBEREINER J. & SALATI E. (1977) Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by  $^{15}\text{N}_2$  incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 9:119-121.
- FERREIRA E., ALVES B.J.R., URQUIAGA S. & BODDEY R.M. (1995a) Perdas de N derivado das fezes bovinas depositadas na superfície do solo. *Anais XXXII Congresso Anual de Soc. Bras. Zootecnia*. 17-21 Julho. pp. 125-126.
- FERREIRA E., RESENDE A.S., ALVES B.J.R., BODDEY R.M. & URQUIAGA S. (1995b) Destino do  $^{15}\text{N}$  urina bovina aplicado na superfície de um solo podzólico descoberto, ou sob cultura de *Brachiaria brizantha*. *Anais XXXII Congresso Anual de Soc. Bras. Zootecnia*. 17-21 Julho. pp. 109-110.
- FRANCO A.A., SOUTO S.M. & DÖBEREINER J. (1972) Fontes de nitrogênio para capim pangola. *Pesqu. Agrop. Bras.* 7:7-12.
- FRIED M., DANSO S.K. & ZAPATA F. (1983) The methodology of measurement of  $\text{N}_2$  fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. *Can. J. Microbiol.* 29: 1053-1062.
- FUJIHARA S., YAMAMOTO K. & YAMAGUCHI M. (1977) A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. *Plant Soil*. 48: 233-238.
- GARCIA R. (1986) Banco de proteína. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Pastagens/Oitavo Simpósio sobre manejo de Pastagem*. (Peixoto *et al.* Eds). 06 a 10 de Outubro de 1986. p. 79-100. Piracicaba, São Paulo.
- GIBSON A.H. (1980). Methods for legumes in glasshouses and controlled environment cabinets. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Ed. F.J. Bergersen. J. Wiley & Sons. Chichester, UK. p 139-184.
- GILLER K.E. & WITTY J.F (1987). Immobilized  $^{15}\text{N}$ -fertilizer sources improve the accuracy of field estimates of  $\text{N}_2$ -fixation by isotope dilution. *Soil Biol. Biochem.* 19:459-463.

- GILLER K.E. & WILSON K.F. (1993) Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CAB International. Wallingford, Oxon UK. 313 p.
- GINÉ M.F., BERGAMIN FILHO H., ZAGATTO E.A.G. & REIS B.F. (1980) Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 114: 191-197.
- GOODMAN P.J. & COLLISON M. (1986) Effect of three clover varieties on growth,  $^{15}\text{N}$  uptake and fixation by ryegrass/white clover mixtures at three sites in Wales. *Grass For. Sci.* 41:191-198.
- GOYAL S.S. & HUFFAKER R.C. (1984) Nitrogen toxicity in plants. In: Nitrogen in Crop Production. Hauck R.D. Ed. p. 97-118. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin.
- GRAHAM T.W.G., MYERS R.J.K., DORAN J.W., CATCHPOOLE V.R. & ROBBINS G.B. (1985). Pasture renovation: The effect of cultivation on the productivity and nitrogen cycling of a Buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) pasture. *Proc. XV Int. Grassl. Congr.*, pp. 640-642. Kyoto, Japan.
- HAMILTON S.D., SMITH C.J., CHALK P.M. & HOPMANS P. (1992) A model based on measurement of soil and plant  $^{15}\text{N}$  enrichment to estimate  $\text{N}_2$  fixation by soybean (*Glycine max* L. Merrill) grown in pots. *Soil Biol Biochem.* 24:71-78.
- HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K. & BURNS R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for  $\text{N}_2$ -fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- HARPER J.E. (1994) Nitrogen metabolism. In: Physiology and Determination of Crop Yield, Boote *et al* Eds. p. 285-302. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
- HARPER J.E. & GIBSON A.H. (1984) Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. *Crop Science.* 25: 797-801.
- HENZELL E.F., MARTIN A.E., ROSS P.J. & HAYDOCK K.P. (1968) Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. IV. Uptake of nitrogen from labelled plant material by rhodes grass and siratro. *Aust. J. Agric. Res.* 19:65-77.
- HERRIDGE D.F. (1982a) Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70:1-6.

- HERRIDGE D.F. (1984) Effects of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root bleeding and vacuum-extracted exudates of soybean. *Crop Science*, 25: 173-179.
- HERRIDGE D.F. & PEOPLES M.B. (1990) Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by  $^{15}\text{N}$  methods. *Plant Physiol.* 93:495-503.
- HERRIDGE D.F., BERGERSEN F.J. & PEOPLES M.B. (1990) Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural  $^{15}\text{N}$  abundance methods. *Plant Physiol.* 93:708-716.
- HERRIDGE D.F., O CONNELL P. & DONNELLY K. (1988) The xylem ureide assay of nitrogen fixation: Sampling procedures and sources of error. *J. Exp. Bot.* 39:12-22.
- HERRIDGE D.F., MARCELLOS H., FELTON W., SCHWENKE G.D., ASLAM M., ALI S., SHAH Z., SHAH S., MASKEY S., BHATTARI S., PEOPLES M.B. & TURNER G.L. (1996) Management of legume  $\text{N}_2$  fixation in cereal systems.: A research programme for the rain fed areas of Pakistan, Nepal and Australia. In: *Nuclear Techniques in Soil-Plant Studies for Sustainable Agriculture and Environmental Preservation*. p. 237-250. Vienna, Austria: FAO/IAEA
- HERRIDGE D.F., PALMER B., NURHAYATI D.P. & PEOPLES M.B. (1996) Evaluation of the xylem ureide method for measuring  $\text{N}_2$  fixation in six tree legume species. *Soil Biol. and Biochem.* 28: 281-290.
- HORIE T. (1995) Crop ontogeny and development. In: *Physiology and Determination of Crop Yield*, K.J. BOOTE *et al* Eds. ASA, CSSA, SSSA, Madison WY. p. 153-180.
- HUNGRIA M. & NEVES M.C.P. (1987) Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil* 103: 111-121.
- JENSEN E.S. (1987) Seasonal patterns of growth and nitrogen fixation in field-grown pea. *Plant Soil* 101:29-37.
- JUNK G. & SVEC H.J. (1958) The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 14:234-243.

- KISSEL D.E., SANDER D.H. & ELLIS JR. R. (1985) Fertilizer-plant interactions in alkaline soils. In: *Fertilizer Technology and Use*. O.P. ENGELSTAD Ed., 3a edition, SSSA, Madison, WI. p 153-196.
- LAYZELL D.B. & MOLONEY A.H.M. (1994) Dinitrogen fixation. In: *Physiology and Determination of Crop Yield*, Boote *et al* Eds. p. 311-335. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Winsconsin
- LIAO C.F.H. (1981) Devarda's alloy method for total nitrogen determinations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45: 852-855.
- MACEDO, M.C.M. (1995) Pastagens no ecossistema Cerrados: pesquisa para o desenvolvimento sustentável. In: *Simpósio sobre Pastagens nos Ecossistemas Brasileiros: Pesquisas para o Desenvolvimento Sustentável* (RP de Andrade, A de O Barcellos & CMC da Rocha) p. 28-62. Sociedade Brasileira de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- MARIOTTI A., MARIOTTI F., CHAMPIGNY M.L., AMARGER N. & MOYSE A. (1982) Nitrogen isotope fractionation associated with nitrato reductase activity and uptake of  $\text{NO}_3^-$  by pearl millet. *Plant Physiol.* 69:880-887.
- MCAULIFFE C., CHAMBLEE D.S., URIBE-ARANGO H. & WOODHOUSE W.W. (1958) Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by  $^{15}\text{N}$ . *Agron. J.* 50:334-337.
- McCLURE P.R. & ISRAEL D.W. (1979) Transport of nitrogen in xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* 64: 411-416.
- McCLURE P.R., ISRAEL D.W. & VOLK R.J. (1980) Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of  $\text{N}_2$  fixation in soybeans. *Plant Physiol.* 66:720-725.
- MEEKS J.C., WOLK C.P., SCHILLING N., SHAFFER P.W., AVISSAR Y. & CHIEN W.S. (1978) Initial organic products of fixation of ( $^{13}\text{N}$ ) dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). *Plant Physiol.* 61: 980-987.
- MINAMISAWA K., ARIMA Y. & KUMAZAWA K. (1983) Transported of fixed nitrogen from soybean nodules inoculated with  $\text{H}_2$ -uptake positive and negative *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Sci. Plant Nutr.* 29: 85-92.

- MIRANDA C.H.B., URQUIAGA S. & BODDEY R.M. (1990) Selection of ecotypes of Panicum maximum for associated biological nitrogen fixation using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. *Soil Biol. Biochem.* 22:657-663.
- MINCHIN F.R., SHEEHY J.E. & WITTY J.F. (1986) Further errors in the acetylene reduction assay: effect of plant disturbance. *J. Exp. Botany.* 37:1581-1591.
- MOHR H. & SCHOPFER P. (1995) *Plant Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. 629 p.
- NASCIMENTO JR. D. (1986) Espécies disponíveis, fixação de nitrogênio e problemas fisiológicos para o manejo de consorciação. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Pastagens/Oitavo Simpósio sobre manejo de Pastagem*. (Peixoto *et al.* Eds). 06 a 10 de Outubro de 1986. p. 389-412. Piracicaba, São Paulo.
- NEVES M.C.P. & HUNGRIA M. (1987) The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 6:267-321.
- NEVES M.C.P., DIDONET A.D., DUQUE F.F. & DÖBEREINER J. (1985) *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Botany.* 36:1179-1192.
- OAKS A.M., POULLE M., GOODFELLOW V.J., CASS L.A. & DEISING H. (1988) The role of ammonium and nitrate ions and light on the induction of nitrate reductase in maize leaves. *Plant Physiol.* 88:1067-1072.
- PATE J.S., ATKINS C.A., WHITE S.T., RAINBIRD R.M. & WOO K.C. (1980) Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide producing grain legumes. *Plant Physiol.* 65:961-965.
- PATE J.S., UNKOVICH M.J., ARMSTRONG E.L. & SANFORD P. (1994) Selection of reference plants for  $^{15}\text{N}$  natural abundance assessment of  $\text{N}_2$  fixation by crop and pasture legumes in south-west Australia. *Austr. J. Agric. Res.* 45:133-147.
- PATTERSON T.G., GLENISTER, R & LA RUE T.A. (1982) Simple estimate of ureides in soybean tissue. *Anal. Biochem.* 119:90-95.
- PATTERSON T.G. & LA RUE T.A. (1983) Nitrogen fixation ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) and ureide content of soybeans: ureides as an index of fixation. *Crop Sci.* 23:825-831.

- PEOPLES M.B., PATE J.S., ATKINS C.A. & BERGERSEN F.J. (1986) Nitrogen nutrition and xylem sap composition of peanut (*Arachis hypogaea* L. cv Virginia Bunch). *Plant Physiol.* 82: 946-951.
- PEOPLES M.B., HEBB D.M., GIBSON A.H. & HERRIDGE D.F. (1988) Development of the xylem ureide assay for the measurement of nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) *J. Exp. Bot.* 40:535-542.
- PEOPLES M.B., FAIZAH A.W., RERKASEM B. & HERRIDGE D.F. (1989) Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. ACIAR Monograph No. 11. 76p. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- PEOPLES M.B., ATKINS C.A., PATE J.S., CHONG K., FAIZAH A.W., SURATMINI P., NURHAYATI D.P., BAGNALL D.J. & BERGERSEN F.J. (1991) Re-evaluation of the role of the ureides in the xylem transport of nitrogen in *Arachis* species. *Physiol. Planta.* 83:560-567.
- PEREIRA, J.M., BODDEY R.M. & RESENDE C. DE P. (1995) Pastagens no ecossistema Mata Atlântica: pesquisa para o desenvolvimento sustentável. In: Simpósio sobre Pastagens nos Ecossistemas Brasileiros: Pesquisas para o Desenvolvimento Sustentável (RP de Andrade, A de O Barcellos & CMC da Rocha) p.94-146. Sociedade Brasileira de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- PEREIRA, J.M., NASCIMENTO JR. D., SANTANA J.R., CANTARUTTI, R.B. & LEÃO, M.I. (1992) Teor de proteína bruta e digestibilidade in vitro de matéria seca de forragem disponível e da dieta selecionada por bovinos em pastagem de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickt, em monocultivo ou consorciado com leguminosas, submetidas a diferentes taxas de lotação. *R. Soc. Bras. Zootecn.* 21:104-117.
- PERES J.R.R., SUHET A.R. & VARGAS M.A.T. (1989) Estabelecimento de *B. japonicum* num solo de Cerrado pela inoculação de sementes de arroz. *R. Bras. Ci. Solo.* 13: 35-39.
- RAISON R.J., CONNELL M.J. & KHANNA P.K. (1987) Methodology for studying fluxes of soil mineral-N in situ. *Soil Biol. Biochem.* 19:521-530.
- RENNIE R.J. (1985) Theoretical errors in sequential N-15 labelling of soil to estimate N<sub>2</sub> fixation by isotope dilution. *Crop Science* 25: 891.

- RENNIE R.J. (1986) Advantages and disadvantages of nitrogen-15 isotope dilution to quantify dinitrogen fixation in field-grown legumes - A critique. *In*. Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification. Soil Sci. Soc. Amer. Spec. Publ. No.18, pp 43-58. Amer. Soc. Agron. Madison, Wisconsin, USA.
- RENNIE D.A., PAUL E.A. & JOHNS L.E. (1976) Natural  $^{15}\text{N}$  abundance of soil and plant samples. *Can. J. Soil Sci.* 56:43-50.
- RERKASEM B., RERKASEM K, PEOPLES M.B., HERRIDGE D.F. & BERGERSEN F.J. (1988) Measurement  $\text{N}_2$  fixation in maize (*Zea mays* l.) - ricebean (*Vigna umbellata* [thunb.] Ohwi and Ohashi) intercrops. *Plant and Soil* 108:125-135.
- REYNOLDS P.H.S., BOLAND M.J., BLEVINS D.G., RANDALL D.D. & SCHUBERT K.R. (1982) Ureide biogenesis in leguminous plants. *TIBS*, October, 366.
- RICE C.F., LUKASZEWSKY K.M., WALKER S., BLEVINS D.G., WINKLER R.G. & RANDALL D.D. (1990) Changes in ureides synthesis, transport and assimilation following ammonium nitrate fertilization of nodulated soybeans. *J. Plant. Nutr.* 13: 1539-1553.
- ROBBINS G.B., BUSHELL J.J., & MCKEON P.K. (1989) Nitrogen immobilization in decomposing litter contributes to productivity decline in ageing pastures of green panic (*Panicum maximum* var. trichoglume). *J. Agric. Sci.* 113: 401-406.
- RUSCHEL A.P., VICTORIA R.L., SALATI E. & HENIS Y. (1978) Nitrogen fixation in sugar cane (*Saccharum officinarum* l.). *In*: Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria. *Bull Ecol. (stockholm)* 26:297-300.
- RUZICKA J. & HANSEN E.H. (1980) Flow injection analysis. Principles, applications and trends. *Anal. Chim. Acta.* 114:19-44.
- SAH, R.N. (1994) Nitrate-nitrogen determination - A critical review. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25:2841-2869.
- SANCHEZ P.A. & COCHRANE T.T. (1980) Soil constraints in relation to major farming systems in tropical America. *In* Priorities for Alleviating Soil Related Constraints. pp. 107-140. *Int. Rice Res. Inst., Los Baños, Philipinnes.*

- SHEARER G. & KOHL D.H. (1986) N<sub>2</sub>-fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:699-756.
- SHEARER G., KOHL D.H. & CHIEN S.H. (1978) The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:899-905.
- SMETHURST P.J. & NAMBIAR E.K.S. (1989) An appraisal of the in situ soil-core technique for measuring nitrogen uptake by a young *Pinus radiata* plantation. *Soil Biol. Biochem.*, v.21, n.7, p.939-942.
- SMITH C.J., CHALK P.M., HAMILTON S.D., & HOPMANS P. (1992) Estimating N<sub>2</sub> fixation by field-grown lupins (*Lupinus angustifolius* L.) using soil and plant <sup>15</sup>N enrichment. *Biol. Fert. Soils.* 13:235-241.
- SPRENT J.I. & SPRENT P. (1990) Nitrogen fixing organisms; pure and applied aspects. London. Chapman and Hall ed. 256 pág.
- STEELE K.W. & VALLIS I. (1988) The nitrogen cycle in pastures. In *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems.* (J. Wilson, ed.), pp. 274-291, C.A.B. International, Wallingford, Oxon., UK.
- TA T.C. & FARIS M.A. (1987a) Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant Soil* 98:265-274.
- TA T.C. & FARIS M.A. (1987b) Effects of alfalfa proportions and clipping frequencies on timothy-alfalfa mixtures. II. Nitrogen fixation and transfer. *Agron. J.* 79:820-824.
- THOMAS R.J. (1992) The role of the legume in the nitrogen cycle of productive and sustainable pastures. *Grass Forage Sci.* 47:133-142.
- THOMAS R.J. & ASAKAWA N.M. (1993) Nitrogen fixation by three tropical forage legumes in an acid-soil savannah of Latin America. In: *new Horizons in Nitrogen Fixation* (Palacios *et al*, eds) p. 750. Kluwer Academic Pubs. Netherlands.
- THOMAS R.J., RONDON M.A., ALARCON H.F. & ASAKAWA N.M. (1995) Nitrogen fixation and recycling by forage legumes in an acid-soil savannah. *Proceedings of International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics- The role of Biological Nitrogen Fixation.* 10-11. Angra dos reis, Rio de Janeiro.

- UNKOVICH M.J., PATE J.S., SANFORD P. & ARMSTRONG E.L. (1994) Potential precision of the  $\delta^{15}\text{N}$  natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in south-west Australia. *Austr. J. Agric. Res.* 45:119-132.
- URQUIAGA S., CRUZ K.H.S. V. & BODDEY R.M. (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56:105-114.
- VALLIS I., HAYDOCK K.P., ROSS P.J. & HENZELL E.F. (1967) Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pastures. III. The uptake of small additions of  $^{15}\text{N}$ -labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville lucerne. *Aust. J. Agric. Res.* 18:865-877.
- VALLIS I., HENZELL E.F. & EVANS T.R. (1977) Uptake of soil nitrogen by legumes in mixed swards. *Aust. J. Agric. Res.* 28:413-425.
- VAN BERKUM P. & SLOGER C. (1983) Autoanalytical procedure for the determination of allantoin and allantoic acid in soybean tissue. *Plant Physiol.* 73:511-513.
- VAN KESSEL C., ROSKOSKI J.P. & KEANE K. (1988) Ureide production by  $\text{N}_2$ -fixing and non- $\text{N}_2$ -fixing leguminous trees. *Soil Biol. Biochem.* 20:891-897.
- VAN RAIJ B. (1991) Fertilidade do solo e adubação. Ass. Bras. Pesq. Pot. e Fosf. Editora Agronômica Ceres LTDA. Inst. Agron. Campinas. Piracicaba SP. 343 p.
- VARGAS M.A.T., SUHET A.R., MENDES I.C., PERES J.R.R. (1994) Fixação Biológica de Nitrogênio em Solos de Cerrados. EMBRAPA, CPAC/SPI. Brasília, 83 p.
- VIERA-VARGAS, M.S., OLIVEIRA O.C. DE, SOUTO C.M., CADISCH G., URQUIAGA S. & BODDEY R.M. (1994) Use of different  $^{15}\text{N}$  techniques to quantify the contribution of biological nitrogen fixation to legumes. *Soil Biol. Biochem.* 34:125-131.
- VOSE P.B. & VICTORIA R.L. (1986) Re-examination of the limitations of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. In: *Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Denitrification* Soil Sci. Soc. Amer. Spec. Publ. No.18, pp 23-41. Amer. Soc. Agron. Madison, Wisconsin, USA.
- WALLACE, A. (1971) The competitive chelation hypothesis of lime induced chlorosis. In: *Regulation of the micronutrient status of plants by chelating agents and other factors*. A. Wallace ed. 230-239. Los Angeles, USA.

- WITTY J.F. (1983) Estimating N<sub>2</sub>-fixation in the field using <sup>15</sup>N-labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biol. Biochem.* 15:631-639.
- WITTY J.F. & MINCHIN F.R. (1988) Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. In: Beck, D.P. and Materon L.A. ed. *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*. p. 331-344. Dordrecht, Netherlands.
- YEMM E.W. & COCKING E.F. (1955) The determination of aminoacids with ninhydrin. *Analyst.* 80:209-213.
- YONEYAMA T. (1984a) Partitioning and metabolism of nitrogen supplied as nitrate, amidas and allantoin to detached vegetative shoots of soybean via tranpiration stream. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30:333.
- YONEYAMA T. (1984b) Partitioning and metabolism of nitrate, asparagine and allantoin in the soybean shoots at the grain filling stage. *Soil Sci. Plant Nutr.* 30:583-587.
- YOSHIDA T. & YONEYAMA T. (1980) Atmosphere dinitrogen fixation in the flooded rice rhizosphere as determined by the <sup>15</sup>N isotope technique. *Soil Sci. Plant Nutr.* 26:551-554.
- YOUNG E.G. & CONWAY, C.F. (1942) On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.* 142:839-853.
- ZIMMER A.H. & CORREA E.S. (1983) A pecuária nacional, uma pecuária de pasto? In: *Anais do Encontro sobre Recuperação de Pastagens*. Paulino V.T. *et al* Eds. pp- 1-25. Nova Odessa, São Paulo.