

# **PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ACÚMULO DE NUTRIENTES POR LEGUMINOSAS ANUAIS CULTIVADAS EM UM SOLO ÁCIDO**

**Ana Carolina Ferreira**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientação

**Prof. Manuel Ângelo Rosa Rodrigues - IPB**

Coorientação

**Prof.<sup>a</sup>. Margarida Maria Pereira Arrobas Rodrigues - IPB**

**Prof.<sup>a</sup> Nilvania Aparecida de Mello – UTFPR**

**Bragança**

**2022**

ANA CAROLINA FERREIRA

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ACUMULAÇÃO DE NUTRIENTES  
POR LEGUMINOSAS ANUAIS CULTIVADAS EM UM SOLO ÁCIDO

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agroecologia no âmbito da dupla diplomação com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Ângelo Rosa Rodrigues.

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Margarida Maria Pereira Arrobas Rodrigues.

Prof.<sup>a</sup> Dra. Nilvania Aparecida de Mello.

BRAGANÇA

2022

*Dedico este trabalho, com todo meu amor, aos meus pais, Liliani e Maurício Ferreira*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por abençoar a minha vida e de minha família. Por nos dar saúde, discernimento, nos acolher nos momentos bons e nos difíceis, iluminando nossos caminhos e nossas escolhas.

Aos meus pais Liliani e Mauricio, por me apoiarem nas minhas decisões, me dando todo o suporte necessário para que eu pudesse trilhar o meu caminho e os meus sonhos. Por todo amor, conselhos e cuidados, sem vocês nada disso poderia ser realizado.

Agradeço as minhas amigas Mariah, Jaqueline, Isadora, Kelly e ao meu amigo Cristiano, por viver esse momento tão importante, se tornando parte da minha família. Obrigada por todo o apoio, amor e cumplicidade durante essa fase tão importante, vocês me ajudaram a tornar esse momento possível.

Agradeço a minha amiga Giovana, por caminhar comigo desde o primeiro dia da graduação, por acreditar no meu potencial e por crescer pessoal e profissionalmente por todos esses anos ao meu lado. Você me inspira, e eu sou grata por esse apoio.

Ao meu companheiro Filipe C., por todo apoio, carinho e ajuda durante a execução desse trabalho. Agradeço pelas amizades feitas nessa etapa, Marcelo, Gabriel L., Elias, Maria Eduarda, Ana Flávia e todos que fizeram parte desse grupo. Obrigada por todos os momentos, e por todo o suporte, vocês estarão sempre no meu coração e nas minhas memórias.

Agradeço aos meus orientadores Prof. Dr. Manuel Ângelo Rodrigues, Prof. Dra. Margarida Arrobas e Prof. Dra. Nilvania Aparecida de Mello, pela orientação, apoio e atenção nessa etapa importante para o meu crescimento profissional e pessoal, para a realização desse projeto.

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Instituto Politécnico de Bragança pela oportunidade de realizar o programa de dupla diplomação e realizar esta dissertação. Agradeço ao laboratório de solos da Escola Superior Agrária, e todos que me auxiliaram para realizar a parte prática desse projeto.

Por fim, a todos que de alguma forma agregaram para que este trabalho fosse concluído, meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Na agricultura atual, o manejo integrado e uso eficiente de insumos agrícolas são exemplos de estratégias para maior otimização e produção de alimentos. No contexto global, além da disponibilidade de água, o nitrogênio (N) é o elemento nutricional que mais limita o crescimento e desenvolvimento das plantas. As leguminosas têm um papel relevante nos ecossistemas agrícolas, pois proporcionam uma maior quantidade de massa vegetal quando cultivadas em solos pobres, devido a associações simbióticas que formam com microrganismos fixadores de N. Desse mutualismo resulta uma maior disponibilidade de N para as leguminosas e para outras culturas não leguminosas cultivadas em consórcio ou que lhes sucedam na rotação. Assim, as leguminosas são cultivadas por todo o mundo com o objetivo de reduzir o uso de fertilizantes sintéticos, contribuindo para a manutenção e aumento da fertilidade do solo. Neste trabalho, estudou-se o potencial de produção de biomassa e de acumulação de nitrogênio e outros nutrientes nos tecidos de seis espécies de leguminosas anuais cultivadas para promoção da adubação verde em uma área de olival de sequeiro com solo ácido. O experimento a campo foi instalado na freguesia de Pinelo, no município de Vimioso, nordeste de Portugal. O ensaio consistiu em sete parcelas com uma área de 300 m<sup>2</sup>, onde se semearam aveia (*Avena sativa* L., cv. Boa Fé), como testemunha, trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*, cv. Campeda), duas tremocilhas (*Lupinus luteus*, cvs. Nacional e Mister), duas favas (*Vicia faba*, cvs. Vesúvio e Favel) e tremoceiro azul (*L. angustifolius*, cv. Karo). O experimento a campo conduziu a resultados difíceis de interpretar, em que algumas plantas devido ao frio e/ou à excessiva acidez do solo originaram uma produção de biomassa muito baixa e não compatível com uma nodulação adequada. Para tentar isolar a causa do insucesso foi instalado um experimento em vasos usando o solo do olival e o trevo subterrâneo, cv. Campeda, como planta teste. Este ensaio decorreu nas estufas do Instituto Politécnico de Bragança. O ensaio consistiu em cinco tratamentos, correspondentes à aplicação de calcário, fósforo, boro, calcário + fósforo + boro (controlo+) e testemunha (controlo-), e quatro repetições. As plantas foram coletadas e levadas para estufa de secagem regulada a 70 °C até atingirem peso constante, sendo posteriormente pesadas, moídas e analisadas para a composição elementar dos seus tecidos. As tremocilhas, cvs. Nacional e Mister e o tremoceiro azul, cv. Karo, apresentaram os maiores valores de matéria seca, assim como o maior acúmulo de nitrogênio, se revelando as mais promissoras para adubação verde, constituindo-se como uma importante fonte de nitrogênio para a cultura principal e para a melhoria da fertilidade do solo. No experimento em vasos, o tratamento com fósforo originou maior produção de biomassa e boa nodulação. A aplicação de calcário também se mostrou efetiva na nodulação, mas não estimulou a produção de biomassa como a aplicação de fósforo. Este resultado parece indicar que o principal problema do solo do olival para o crescimento das leguminosas pode não ter sido o pH, mas talvez a reduzida disponibilidade em fósforo.

**Palavras-chave:** agricultura sustentável; fixação biológica de nitrogênio; adubação verde; solo ácido; *Vicia faba*; *Lupinus luteus*; *Trifolium subterraneum*

## ABSTRACT

In current agriculture, the integrated management and efficient use of agricultural inputs are examples of strategies for greater optimization and food production. In the global context, in addition to water availability, nitrogen (N) is the nutritional element that most limits plant growth and yield. Legumes play an important role in agricultural ecosystems, as they provide a greater amount of plant mass when grown in poor soils, due to symbiotic associations they form with N-fixing microorganisms. This mutualism results in a greater availability of N for legumes and others non-leguminous crops grown in intercropping or succeeding them in rotation. Thus, legumes are grown all over the world with the aim of reducing the use of synthetic fertilizers, contributing to the maintenance and increase of soil fertility. In this work, we studied the potential for biomass production and accumulation of nitrogen and other nutrients in the tissues of six species of annual legumes grown to promote green manure in a rainfed olive grove with acidic soil. The field experiment was installed in the parish of Pinelo, in the municipality of Vimioso, northeast of Portugal. The experiment consisted of seven plots with an area of 300 m<sup>2</sup>, where oat (*Avena sativa* L., cv. Boa Fé), as a control, subterranean clover (*Trifolium subterraneum*, cv. Campeda), two yellow-lupines (*Lupinus luteus*, cvs. Nacional and Mister), two fava beans (*Vicia faba*, cvs. Vesúvio and Favel) and blue lupine (*L. angustifolius*, cv. Karo). The field experiment led to difficult to interpret results, in which some plants, due to the cold and/or excessive soil acidity, resulted in a very low biomass production that was not compatible with adequate nodulation. To try to isolate the cause of failure, an experiment was installed in pots using olive grove soil and subterranean clover, cv. Campeda, as a test plant. This study took place in a greenhouse of the Instituto Politécnico de Bragança. The experiment consisted of five treatments, corresponding to the application of limestone, phosphorus, boron, limestone + phosphorus + boron (control+) and control (control-), and four replicates. The plants were collected and taken to a drying oven regulated at 70 °C until they reached constant weight, being later weighed, ground and analyzed for the elemental composition of their tissues. The yellow-lupines, cvs. Nacional and Mister, and the blue lupine, cv. Karo, presented the highest dry matter values, as well as the highest nitrogen accumulation, proving to be the most promising for green manure, constituting an important source of nitrogen for the main crop and for the improvement of soil fertility. In the pot experiment, the phosphorus treatment resulted in higher biomass production and good nodulation. Limestone application was also effective in nodulation but did not stimulate biomass production as did phosphorus application. This result seems to indicate that the main problem of the olive grove soil for the growth of legumes may not have been the pH but perhaps the reduced availability of phosphorus.

**Key words:** sustainable agriculture; biological nitrogen fixation; green manures; acid soil; *Vicia faba*; *Lupinus luteus*; *Lupinus angustifolium*; *Trifolium subterraneum*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo global do nitrogênio (adaptado de Martins et al., 2003) .....	16
<b>Figura 2:</b> Nódulos em raízes de trevo subterrâneo, cv. Campeda .....	18
<b>Figura 3:</b> Imagem do local de implantação do experimento (Google Earth, 2022). ..	25
<b>Figura 4:</b> Imagem do local de implantação do experimento em estufa (Google Earth, 2022). .....	26
<b>Figura 5:</b> Amostras com 0,10 g de óxido de cálcio. ....	30
<b>Figura 6:</b> Produção de massa seca nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	33
<b>Figura 7:</b> Concentração de nitrogênio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	33
<b>Figura 8:</b> Concentração de fósforo nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	34
<b>Figura 9:</b> Concentração de potássio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	35
<b>Figura 10:</b> Concentração de cálcio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	35
<b>Figura 11:</b> Concentração de magnésio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	36
<b>Figura 12:</b> Concentração de boro nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	37
<b>Figura 13:</b> Concentração de ferro nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	37
<b>Figura 14:</b> Concentração de manganês nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	38
<b>Figura 15:</b> Concentração de zinco nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	39
<b>Figura 16:</b> Concentração de cobre nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	39
<b>Figura 17:</b> Acúmulo total de nitrogênio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	40

<b>Figura 18:</b> Acúmulo total de fósforo nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	41
<b>Figura 19:</b> Acúmulo total de potássio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	41
<b>Figura 20:</b> Acúmulo total de cálcio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	42
<b>Figura 21:</b> Acúmulo total de magnésio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	43
<b>Figura 22:</b> Acúmulo total de boro nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	43
<b>Figura 23:</b> Acúmulo total de ferro nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	44
<b>Figura 24:</b> Acúmulo total de manganês nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	45
<b>Figura 25:</b> Acúmulo total de zinco nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	45
<b>Figura 26:</b> Acúmulo total de cobre nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias. ....	46
<b>Figura 27:</b> Matéria seca produzida no experimento em vasos em função dos tratamentos fertilizantes. Nas colunas, letras iguais reportam resultados sem diferenças significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ) para um dado tecido vegetal (minúsculas) ou para a matéria seca total (maiúsculas). As barras de erro reportam o erro padrão das médias. ....	47
<b>Figura 28:</b> Número de nódulos por vaso em função dos tratamentos fertilizantes. Nas colunas, letras iguais reportam resultados sem diferenças significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). As barras de erro reportam o erro padrão das médias.....	47
<b>Figura 29:</b> Número de nódulos por planta no experimento em vasos em função dos tratamentos fertilizantes. Nas colunas, letras iguais reportam resultados sem diferenças significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). As barras de erro reportam o erro padrão das médias. ....	48

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Concentração de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados. 49

**Tabela 2:** Concentração de boro, ferro, manganês, zinco e cobre na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados.....50

**Tabela 3:** Acúmulo total de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados. 51

**Tabela 4:** Acúmulo total de boro, ferro, manganês, zinco e cobre na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados.....51

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO AS PLANTAS E AO SOLO	14
3.2 CICLO NITROGÊNIO	16
3.2.1 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO	17
3.2.2 Organismos fixadores de nitrogênio	17
3.2.2.1. Diazotrofos simbióticos	18
3.2.2.2. Diazotrofos associativos	19
3.2.2.3. Diazotrofos de vida livre	19
3.2.3. AMONIZAÇÃO	20
3.2.4. NITRIFICAÇÃO	20
3.2.5. DESNITRIFICAÇÃO	21
3.3. ADUBAÇÃO VERDE COM LEGUMINOSAS	21
3.4. LEGUMINOSAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	23
3.5. PERDAS DE NITROGÊNIO EM AGROECOSSISTEMAS	23
3.5.1 Impactos ambientais	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	25
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.3. INSTALAÇÃO E MANUTENÇÃO DO EXPERIMENTO	27
4.3.1. Instalação do experimento	27
4.3.2. Manutenção dos ensaios	28
4.4. COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS	28
4.5. ANÁLISES LABORATORIAIS	29

4.5.1. Determinação do nitrogênio	29
4.5.2. Determinação de boro	29
4.5.3 Determinação de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês	30
4.7. ANÁLISE DE DADOS	31
5. RESULTADOS	32
5.1. EXPERIMENTO A CAMPO	32
5.1.1. Evolução da produção de matéria seca	32
5.1.2. Concentração de nutrientes nos tecidos	33
5.1.3. Acumulação total de nutrientes nos tecidos	40
5.2. EXPERIMENTO EM VASOS	46
5.2.1. Produção de matéria seca	46
5.2.2. Número de nódulos no sistema radicular	47
5.2.3. Concentração de nutrientes nos tecidos	48
5.2.4. Acúmulo total de nutrientes nos tecidos vegetais	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS	56

## 1. INTRODUÇÃO

Na agricultura atual, o manejo integrado e uso eficiente de insumos agrícolas são exemplos de estratégias para maior otimização e produção de alimentos, identificando os elementos essenciais para o desenvolvimento das plantas, bem como eliminar ou diminuir os fatores que podem comprometer esse desenvolvimento.

No contexto global, além da disponibilidade de água, o nitrogênio (N) é o elemento nutricional que mais limita o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois faz parte da composição de biomoléculas como adenosina trifosfato (ATP), clorofilas, proteínas, entre outras (Bredemeier & undstock, 2000). Grande parte dos solos carecem desse elemento. Desde o início do uso de fertilizantes nitrogenados se registrou um desenvolvimento agrícola de suma importância para a alimentação humana, contribuindo para a expansão populacional, tendo a síntese da amônia pelo processo Haber-Bosch e a sua comercialização sido um processo determinante (Garcia; Cardoso; Santos, 2013).

Todavia, o uso de fertilizantes nitrogenados podem causar poluição ambiental devido às transformações do N no solo. Os problemas ambientais mais relevantes do uso pouco apropriado de N decorrem da volatilização de amônia, da lixiviação de nitratos e da desnitrificação. A volatilização de amônia e a lixiviação de nitratos podem causar a eutrofização de cursos de água, lagos e oceanos, enquanto a desnitrificação pode originar importantes gases de estufa como os óxidos de N (NO<sub>x</sub>). Por outro lado, o uso ineficiente do N aumenta os custos de produção ao agricultor (Li, 2009).

Outro fator importante na agricultura é o carbono (C), esse elemento se encontra na atmosfera, na biomassa vegetal e animal, bem como nos solos, sedimentos, ambientes aquáticos, entre outros. O elemento se faz importante aos seres vivos por estar presente na constituição das moléculas orgânicas. As práticas agrícolas contribuem para o sequestro de C que, assim, pode trazer benefícios, como a restauração de solos degradados, otimização da produção agrícola, redução da poluição, diminuição da erosão e escoamento de nutrientes e aumento da atividade microbiana e da biodiversidade do solo (Artuzo, 2022).

O uso incorreto de insumos e práticas agrícolas que degradam o solo e diminuem sua capacidade de produção ocorrem com frequência, se tornando necessário utilizar de conhecimentos e práticas que diminuam essa insustentabilidade e que garantam o futuro das

próximas gerações. Assim, estratégias como o uso de leguminosas na agricultura, destinadas a adubação verde, podem se tornar uma opção viável economicamente, ao substituírem ou diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados. As leguminosas, sendo plantas que contribuem significativamente na fixação de N e sequestro de C no solo, se utilizadas corretamente, podem melhorar as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e diminuir efeitos poluentes da fertilização química, promovendo uma agricultura mais sustentável.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho estuda-se o potencial de produção de biomassa e acumulação de nitrogênio e outros nutrientes nos tecidos de seis espécies de leguminosas anuais cultivadas para adubação verde em um olival de sequeiro instalado em um solo ácido. O experimento inicial a campo conduziu a resultados difíceis de interpretar, em que algumas plantas devido ao frio e/ou à excessiva acidez do solo originaram uma produção de biomassa muito baixa e não compatível com uma nodulação adequada. Assim, para tentar isolar a causa do insucesso de crescimento de algumas leguminosas, estabeleceu-se um segundo objetivo que consistiu em um experimento em vasos usando o solo do primeiro experimento, onde avaliou-se a produção de biomassa e a nodulação de trevo subterrâneo, cv. Campeda, após a aplicação de calcário, fósforo, boro, calcário+fósforo+boro e uma modalidade testemunha.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica são apontados os dados teóricos sobre os temas estudados nesta dissertação, para maior compreensão da pesquisa, tal qual, explicitar a necessidade desse estudo, sua importância e para auxiliar na interpretação dos resultados.

#### 3.1 IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO AS PLANTAS E AO SOLO

O  $N_2$  é um nutriente que suma importância para todos os seres vivos, sua dinâmica viabiliza o desenvolvimento na produção primária em agroecossistemas aquáticos e terrestres, está presente no solo, ar e água. Sua importância se dá por estar presente em proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes celulares (Vieira, 2017). Por isso é considerado um dos elementos minerais mais importantes para determinar a produtividade agrícola, dessa forma o torna assimilável para os seres vivos, sendo de suma importância para dar continuidade a vida no planeta (Garcia; Cardoso; Santos, 2013).

Sendo uma molécula estável seu desempenho químico é baixo nesse estado, com exceção na termosfera, em altitudes maiores que 90 km, onde pode ser fotolizada ou ionizada (Martins et al, 2003). As formas quimicamente reativas são o  $N_2O$ , NO, dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ) e amônia ( $NH_3$ ), estes, podem contribuir para problemas ambientais, tais como, chuva ácida, poluição atmosférica, aerossóis atmosféricos e a redução da camada de ozônio (Rocha & Cardoso, 2021).

Dentro dos processos biológicos da planta o  $N_2$  atua com um papel importante e um dos mais essenciais para a saúde e crescimento da planta, sua forma biologicamente disponível é quando está ligado ao C, oxigênio (O) ou hidrogênio (H), e essas ligações o fazem ser conhecido como N reativo (Garcia; Cardoso; Santos, 2013). Sua dinâmica na biosfera engloba a fixação de  $N_2$ , mineralização, nitrificação, desnitrificação, e oxidação anaeróbia do amônio (Hayatsu et al., 2008).

Esses processos são principalmente intermediados pelos microrganismos encontrados no solo, este elemento entra na biosfera por fixação química e biológica do  $N_2$  e é removido da mesma pela desnitrificação (Rincón et al., 2008).

Dentro dos processos citados é importante ressaltar que essa dinâmica sofreu alterações significativas nas últimas décadas (Galloway & Cowling, 2002), com isso os processos antropogênicos são atualmente os responsáveis por mais da metade no  $N_2$  fixado nos ecossistemas terrestres (Nevison & Holland, 1997; Galloway & Cowling, 2002).

No fluxo geral no globo terrestre em teragramas por ano pode-se classificar os fatores desse fluxo com a fixação natural de  $N_2$  no solo, com cerca de 110 Tg ano<sup>-1</sup>, as fixações antropogênicas, sendo estas a fixação industrial (135 Tg ano<sup>-1</sup>), fixação agrícola (46 Tg ano<sup>-1</sup>) e queima de combustíveis fósseis (25 Tg ano<sup>-1</sup>), desse total 100 Tg são desnitrificadas e retornam à atmosfera e cerca de 69 Tg são transferidas com a terra que vai para o oceano, também há a fixação marinha (140 Tg ano<sup>-1</sup>), como também a desnitrificação marinha (238 Tg ano<sup>-1</sup>) (Vieira, 2017).

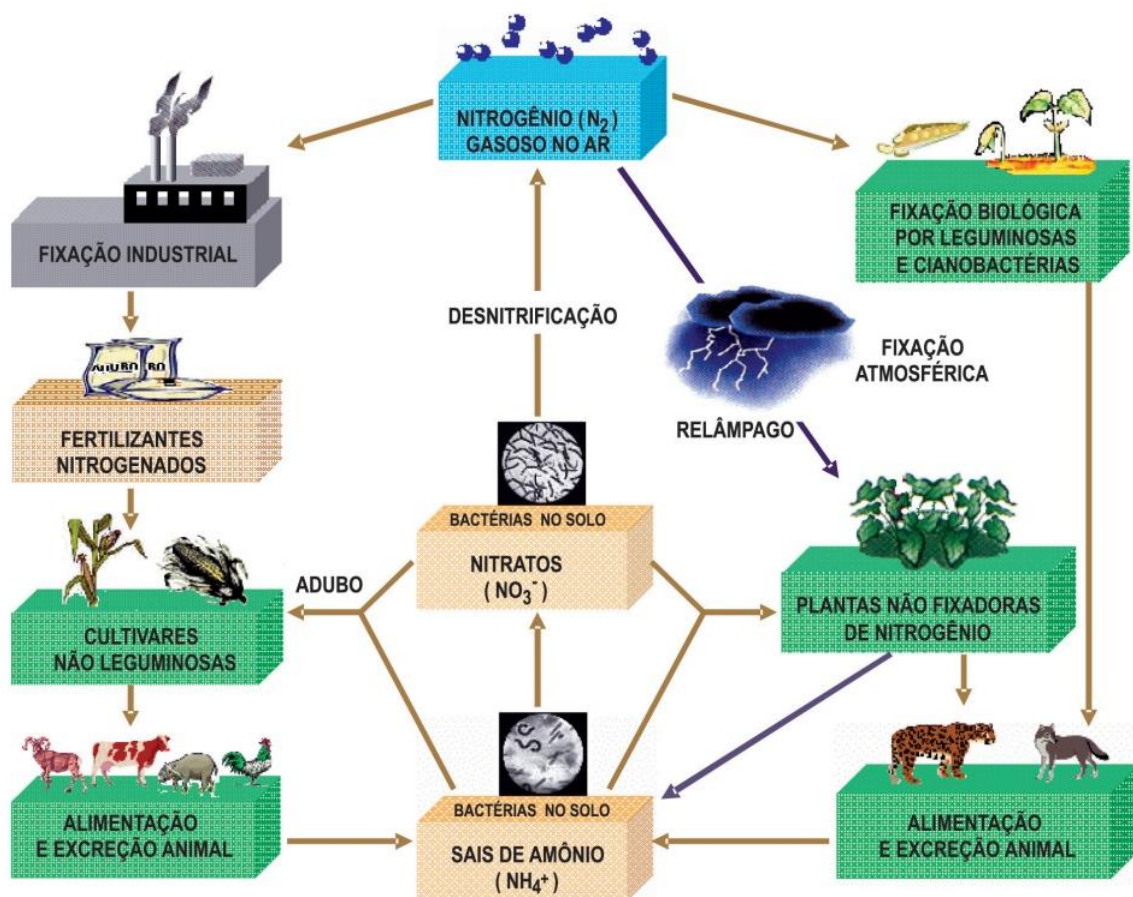
Apesar de sua abundância na litosfera e atmosfera, é um dos fatores mais limitantes nas plantas, isso ocorre devido a forma em que ele está presente, no caso  $N_2$ , e a maioria dos microrganismos não conseguem utilizá-lo dessa forma, pela decorrência da ligação tripla ( $N\equiv N$ ), e que por ter grande estabilidade, sua assimilação pelos seres vivos fica limitada e requer que o  $N_2$  seja transformado para que se facilite sua assimilação (Marin et al., 1999). A ligação tripla deixa a molécula inerte, sendo assim, se necessita de quantidades significativas de energia para quebrá-la e assim possibilitar que seus átomos se combinem com outros átomos.

Das quantidades de  $N_2$  no solo, pode-se classificar entre a forma orgânica (95%) e as inorgânicas minerais ( $NH_4^+$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3^-$ ), que mesmo em menor percentagem no solo tem grande importância para a nutrição das plantas. O  $N_2$  se faz assim um elemento muito versátil, pois, dentro da fração orgânica e inorgânica há compostos solúveis e outras com relativa insolubilidade, algumas com mobilidade e outras imóveis, bem como algumas estão disponíveis para as plantas e outras não (Vieira, 2017).

## 3.2 CICLO NITROGÊNIO

Ao que se refere ao ciclo do N, este é um dos mais complexos e de grande importância entre os ciclos globais, sendo um processo dinâmico de câmbio de N entre a atmosfera, a matéria orgânica e compostos orgânicos. Quaisquer processos que resultem na transformação desse elemento em outros compostos são intitulados de fixação de nitrogênio. Nessa transformação, muitas bactérias convertem essa partícula gasosa a  $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$  por redução catalisada por enzimas, esse processo é denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), e representa 90% de toda a fixação de origem natural (Martins et al, 2003).

Os processos desses ciclos são divididos em etapas, sendo esses, fixação, amonização, nitrificação e desnitrificação, esses processos podem ser vistos na figura abaixo.



**Figura 1:** Ciclo global do nitrogênio (adaptado de Martins et al., 2003).

### 3.2.1 FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

Nesse período do ciclo, ocorre a fixação do  $N_2$ , essa fixação é a redução do  $N_2$  da atmosfera em  $NH_4^+$  (Dobereiner, 1984). Essa ação é realizada principalmente por organismos diazotróficos, como exemplo as bactérias do gênero *Rhizobium*, e arqueas, que conseguem fixar o  $N_2$ , estabelecendo um mutualismo com plantas leguminosas, e transformando essa molécula em  $NH_3$ . É importante ressaltar que existe também a fixação física do N, onde essa transformação pode ocorrer por fenômenos físicos, como relâmpagos e faíscas elétricas, porém essa conversão é muito baixa (Martins et al., 2003).

### 3.2.2 Organismos fixadores de nitrogênio

A FBN, é um processo que ocorre por microrganismos presentes no solo, esses processos de fixação são realizados por uma variedade de bactérias que possuem nitrogenases, que são enzimas que quebram a ligação tripla do  $N_2$  e produzem  $NH_4^+$  (Rincón et al., 2008).

Esses organismos são importantes para a otimização na agricultura, pois com sua ação na decomposição de matéria orgânica, há a liberação de nutrientes e energia, além de liberarem substâncias que contribuem na agregação do solo, no crescimento das plantas e na incorporação de nutrientes, como o N através da FBN, esses microrganismos o captam na forma gasosa presente no ar e o tornar assimilável para as plantas, e utilizam da enzima nitrogenase (Sousa, 2019).

Essas bactérias são conhecidas como rizóbios, elas trabalham em simbiose com as plantas, mas especificamente em suas raízes, ficando hospedadas em estruturas chamadas de nódulos, nas raízes, como mostra na figura 2 e esses rizóbios são variáveis de acordo com a planta hospedeira (Felix, et al., 2009).



**Figura 2:** Nódulos em raízes de trevo subterrâneo, cv. Campeda

Os organismos responsáveis pela fixação de  $N_2$  são procariotos, sendo muitos heterótrofos, sendo assim, precisam de C reduzido, via indireta da energia solar e que requer da simbiose com hospedeiros eucariotos, esses organismos podem ser de vida livre, e dessa forma competem com outros por matéria orgânica, há também os autótrofos, estes reduzem o gás carbônico ( $CO_2$ ) na presença de luz (Marin et al., 1999).

As bactérias diazotróficas podem ser simbióticas obrigatórias, tendo uma simbiose com o hospedeiro e podendo formar estruturas diferenciadas conhecidas como nódulos, associativas, contribuindo para o desenvolvimento da planta sem formar estruturas diferenciadas, ou endofíticas, que tem uma associação de simbiose mutualística, habitando no interior dos tecidos vegetais sem causar danos as plantas, ou podem ser de vida livre sendo não simbiótica. Tem-se representadas pelo *Rhizobium* e *Frankia* para as obrigatórias, as *Cyanobacteria*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* entre as associativas ou endofíticas e *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* e *Xanthobacter*, entre os não simbióticos (Rincón et al., 2008).

#### 3.2.2.1. Diazotrofos simbióticos

A ação de fixar N<sub>2</sub> simbioticamente é realizada por diferentes grupos de microrganismos, e que conseqüentemente, pode ocorrer a formação de estruturas diferenciadas, quando os rizóbios se associam com leguminosas, há a formação de nódulos, esses organismos adentram as raízes das plantas de zonas temperadas e tropicais e formam essas estruturas (Marin et al., 1999).

Se sabe hoje de cinco gêneros da família *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*. Vale ressaltar que fatores abióticos podem limitar a fixação de N<sub>2</sub>, sendo estes a acidez do solo, o tipo de solo, textura, composição, temperatura, umidade e metais pesados, além disso, essas bactérias são aeróbicas, gram-negativas, móveis, com temperatura ideal para o crescimento de 25 °C a 30 °C e pH entre 6 e 7 (Junior et al., 2008).

#### 3.2.2.2. Diazotrofos associativos

Nesse grupo, esses organismos são subdivididos em dois, sendo estes, os endofíticos facultativos, que colonizam a rizosfera, como também o interior das raízes, e os endofíticos obrigatórios, que colonizam apenas o interior das raízes, esses organismos utilizam de diferentes estratégias e mecanismos de ação na sua interação com a planta (Baldani et al., 1997).

Como exemplos desses microrganismos facultativos tem-se o gênero *Azospirillum*, que são predominantemente endófitos facultativos, e que colonizam plantas de diferentes habitats como, milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, gramíneas forrageiras, encontra-se hoje espécies, como, *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense* e *A. largomobile*. Já os diazotrofos endofíticos obrigatórios, pode-se citar como alguns exemplos, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus spp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia spp.* (Moreira et al., 2010).

#### 3.2.2.3. Diazotrofos de vida livre

A maioria dessas bactérias são heterotróficas, ou seja, precisam de uma fonte de C utilizável para fixar o  $N_2$ , com exceção de bactérias fotossintéticas e cianobactérias, essas bactérias de vida livre são capazes de fixar o  $N_2$ , e assim, colaboram para a incorporação deste ao solo, além de decompor a matéria orgânica no solo e contribuir na ciclagem dos elementos (Mesquita, 2019). Uma das vantagens é que esses organismos conseguem fixar esse nutriente em zonas quentes e permanentemente úmidas, as regiões tropicais podem chegar a  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $N_2$ , e nas zonas temperadas somente alguns quilos por hectare (Sousa, 2019).

### 3.2.3. AMONIZAÇÃO

Nesta etapa, acontece um processo enzimático que converte o N orgânico em  $NH_3$ , os organismos fixadores utilizam do C como fonte de energia, assim, o N encontrado no solo é em sua maioria, vinda de matéria orgânica decomposta, pois os microrganismos decompositores começam a atuar nessa biomassa e liberar o  $NH_3$  no ambiente. Quando o  $NH_3$  combina com moléculas de água ocorre a transformação do mesmo em hidróxidos de amônio ( $NH_4OH$ ), que irão se ionizar e produzir  $NH_4^+$  e hidroxilas ( $OH^-$ ) (Santos, s.d.).

### 3.2.4. NITRIFICAÇÃO

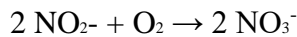
No processo de nitrificação, a  $NH_3$  é oxidada, essa reação ocorre por bactérias específicas e acontece em dois processos, primeiro, sendo transformada em nitrito ( $NO_2^-$ ) pela ação bioquímica de bactérias, como exemplo as do gênero *Nitrossomonas*, em seguida, o  $NO_2^-$  é transformado em nitrato ( $NO_3^-$ ) e é realizada por bactérias como a do gênero *Nitrobacter*, e ambos os gêneros citados só realizam essa atividade bioquímica se houver O dissolvido, sendo assim, são aeróbios obrigatórios (Bueno, 2011).

Os processos podem ser descritos como:

Nitrosação:



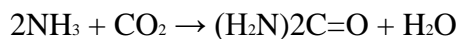
Nitração:



### 3.2.5. DESNITRIFICAÇÃO

Nessa etapa, quando a quantidade de O no solo reduz, a nitrificação da amônia começa a ser interrompida, e ocorre o processo inverso (Toma, 2015). Ocorre a redução biológica do  $\text{NO}_3^-$  para o  $\text{N}_2$ , utilizando-se do material orgânico como redutor, é realizada por bactérias anaeróbias facultativas. Esse processo de desnitrificação pode liberar  $\text{N}_2\text{O}$ , que reduz a camada de ozônio e tem influência no aquecimento global.

Ela ocorre a partir da reação de  $\text{NH}_3$  com  $\text{CO}_2$ :



### 3.3. ADUBAÇÃO VERDE COM LEGUMINOSAS

O termo adubação verde se refere a uma prática agrícola que utiliza de espécies vegetais tanto anuais como perenes com o objetivo de aumentar a capacidade produtiva do solo, onde estas cobrem o solo por um determinado período, e após, são roçadas e incorporadas ou se mantêm em cobertura sobre o solo.

A utilização das leguminosas atua com um papel mais relevante que outras espécies pois estas proporcionam uma maior porcentagem de massa vegetal ao solo e formam associações simbióticas com microrganismos fixadores de N, esse mutualismo resulta em um fornecimento maior de N para a cultura principal, assim gera um maior interesse econômico da parte dos agricultores, dessa forma essa prática agrícola contribui para a redução de insumos

como os fertilizantes minerais nitrogenados e pode ser utilizada como uma estratégia para a redução de custos na produção (Espindola et al., 2005).

Além da maior disponibilidade de N, o uso dessas leguminosas afeta a disponibilidade de outros nutrientes, como por exemplo, ao incrementar essas plantas ao solo consequentemente haverá um aumento do teor de matéria orgânica, dessa forma pode se reduzir a retenção de fósforo (P) na superfície dos minerais de argila, que aumentará a disponibilidade desse nutriente às plantas (Arrobas et al., 2013). Outro fator importante é a ciclagem de nutrientes, pois, suas raízes atingem camadas mais profundas do solo, conseguindo absorver os nutrientes dessas camadas e as liberando com a decomposição dos resíduos após seu corte (Favero et al., 2000).

Outro problema que ocorre na agricultura é o processo de erosão, causado pela exposição do solo às chuvas, que consequentemente pode trazer o encrostamento da camada superficial, bem como a formação de sulcos e voçorocas, esse processo de degradação do solo influencia para a destruição do potencial biológico das terras, esse processo é conhecido como desertificação. A utilização de adubos verdes contribui para a preservação da estrutura física do solo, diminuindo as perdas de nutrientes, água e preservando a estrutura do solo pelos teores elevados de matéria orgânica, afetando positivamente na estabilidade de agregados, atuando como agentes ligantes em conjunto com os minerais de argila, esse efeito causa a redução da densidade do solo pela a decomposição de resíduos, consequentemente a liberação dos compostos orgânicos melhora a porosidade do solo, que irá melhorar e aumentar a infiltração da água (Espindola et al., 2005).

Além desses fatores, há também a influência na fauna do solo, que com a adubação verde melhora e aumenta os organismos edáficos benéficos, visto que, essas plantas são fonte de energia e nutrientes e criam um ambiente propício para esses organismos, estes influenciarão no maior aproveitamento da reciclagem dos nutrientes, tornando mais eficientes os fertilizantes aplicados ao solo. Em destaque entre esses organismos, pode-se citar os rizóbios, que se associam às raízes das leguminosas em um processo simbiótico, proporcionando a FBN esse elemento é fixado e transferido para as leguminosas, e em mutualismo essas plantas fornecem os carboidratos produzidos para essas bactérias como fonte de energia (Espindola et al., 2005).

No sentido fitopatogênico, as leguminosas herbáceas apresentam resultados positivos no controle de doenças radiculares, com efeitos antagônicos e alelopáticos, como exemplo, o

controle de nematoides, usando leguminosas do gênero *Crotalaria* no controle de *Meloidogyne* spp. (Charchar et al., 2009).

No momento atual, a utilização de monoculturas favorece o aparecimento e a propagação de plantas invasoras, que afeta diretamente na produtividade, por consequência da competição entre essas plantas e as culturas de valor econômico. Seu controle ocorre principalmente com o uso de produtos químicos sintéticos. Diante disso, as plantas usadas na adubação verde podem contribuir para o controle dessas plantas indesejadas, tendo em vista que algumas delas causam efeitos alelopáticos durante sua decomposição e podem ter maior eficiência na competição por recursos como água, luz e nutrientes (Espindola et al., 2005).

### 3.4. LEGUMINOSAS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

Além dos benefícios citados na agricultura e para o meio ambiente, as leguminosas são plantas de grande importância na alimentação e na saúde da população, pois além de devolver o N ao solo, são plantas que contêm um teor de proteína elevado, composto de extrema importância para a manutenção dos seres vivos (Brezeanu, 2022; Reckling et al., 2016).

### 3.5. PERDAS DE NITROGÊNIO EM AGROECOSSISTEMAS

O N presente nos adubos não possui eficiência total na absorção e exportação pelas plantas, parte desse nutriente é perdido por carreamento superficial, lixiviação do solo, volatilização como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2$  ou óxido de nitrogênio no caso da desnitrificação.

#### 3.5.1 Impactos ambientais

Ao longo da história, o ser humano começou a evoluir nas estratégias pela busca de alimento, pois, eram essencialmente caçadores e coletores, mas a cerca de 10.000 anos atrás a

espécie *Homo sapiens* começou a cultivar seus alimentos e a praticar o que conhecemos como agricultura (Feldens, 2018), com o aumento populacional ao longo dos séculos, foi se tendo a necessidade de praticar novas técnicas e estratégias para atender a demanda de alimentos.

Com isso, a oferta de N nas plantas se dava até então através da FBN, e até a metade do século XX somente esse processo era capaz de alimentar cerca de 2 bilhões de pessoas, que era a população mundial da época, mas em 1889 o conhecido Sir William Crookes indicou que esse nutriente estava diminuindo dentro da produção agrícola, com isso, em 1909 o alemão Fritz Haber criou o processo Haber-Bosch, que consiste na síntese de  $\text{NH}_3$  a partir do  $\text{N}_2$ , sob pressão e temperatura elevadas, e que em 1930, Carl Bosch aprimorou esse processo, o tornando mais seguro e permitindo sua comercialização em nível industrial (Martinelli, 2007).

Com o uso dos insumos nitrogenados, parte desse nutriente é absorvido pelas plantas, outra parte volta para a atmosfera no seu estado gasoso por volatilização de  $\text{NH}_3$ , bem como, há a transformação de  $\text{NO}_3^-$  em um gás de efeito estufa, sendo esse o  $\text{N}_2\text{O}$ , sendo este gás quase 300 vezes mais severo que o  $\text{CO}_2$ , nos danos causados na camada de ozônio (Martins et al., 2013).

Ocorre outro dano ambiental onde o  $\text{NO}_3^-$  pode ser lixiviado para os lençóis freáticos e rios, sendo uma das causas dos problemas ambientais gerados por esses adubos, suas perdas e baixa eficiência quando aplicados nas lavouras, cerca de quase 50% da quantidade aplicada é perdida. Uma das consequências da lixiviação e concentração excessiva desse nutriente nas águas superficiais é o fenômeno da eutrofização, causado pela concentração excessiva de N no meio aquático que gera um crescimento da biota aquática, como a produção de algas até um ponto em que esse crescimento cessa e as mesmas morrem, a partir disso organismos decompositores utilizam do  $\text{O}_2$  presente nessas águas, no processo de decomposição, e por consequência, há a mortalidade dos seres aquáticos que precisam do  $\text{O}_2$  para sua manutenção, como também limita o uso da água para diversas atividades (Bertol et al., 2005; Rockström, 2009).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

No âmbito deste estudo foram realizados dois experimentos. Um experimento em campo e um experimento em vasos. O experimento de campo foi realizado em Pinelo, no concelho de Vimioso, e o experimento em vasos foi realizado nas estufas do Instituto Politécnico de Bragança.

### 4.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento de campo foi instalado na freguesia de Pinelo, no município do Vimioso, nordeste de Portugal, onde o ensaio foi realizado em uma área de olival em sequeiro, as coordenadas são latitude  $41^{\circ}39'22.44''N$  e longitude  $6^{\circ}33'29.91''W$  e 622 metros de altitude (Figura 3).



**Figura 3:** Imagem do local de implantação do experimento (Google Earth, 2022).

As condições meteorológicas dessa região têm como características o início do verão no final do mês de junho, terminando em setembro, a umidade nessa região no mês de janeiro

fica próximo a 84% e a menor taxa é em agosto com cerca de 46%, dos meses que mais se tem dias chuvosos é em agosto com uma média de 10,87 dias e o menor em julho com 3,17 dias.

O clima é quente e temperado, sendo o verão pouco pluvioso, e o inverno com taxas maiores de pluviosidade, o clima é classificado como Csb (clima temperado com verão seco e suave). A temperatura média é de 12,6 °C, sendo a temperatura média no mês mais quente de 21,9 °C (julho) e no mais frio (janeiro) de 4,6 °C. A pluviosidade média anual é de 682 mm, onde no mês mais chuvoso (outubro) a média é de 100 mm e no mais seco (julho) de 17 mm. Em relação as horas de sol, julho é o mês com mais tempo de sol, sendo de 12,27 horas que somam um total de 380,44 horas, já em janeiro é o menor tempo de exposição do sol sendo de 4,17 horas e totalizando 129,16 horas de sol no mês (Climate-data.org, 2022).

O experimento realizado em estufa, está localizado nas estufas do Instituto Politécnico de Bragança (figura 4), região de Trás-os-Montes, nordeste de Portugal, onde foram instalados em vasos em um ambiente controlado, com coordenadas de 41°47'48.68"N de latitude, 6°45'42.63"W de longitude e 681 metros de altitude.



**Figura 4:** Imagem do local de implantação do experimento em estufa (Google Earth, 2022).

## 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento a campo foi dividido em sete parcelas com uma área de 300 m<sup>2</sup>, onde respectivamente foram semeados aveia (*Avena sativa* L.) como testemunha, trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum*, cv. Campeda), duas tremocilhas (*Lupinus luteus*, cvs. Nacional, e Mister), duas favas (*Vicia faba*, cvs. Vesúvio e Favel) e tremoceiro azul (*L. angustifolius*, cv. Karo).

Para a condução do segundo experimento utilizaram-se vasos com capacidade para 3 kg de solo. Foram estabelecidos cinco tratamentos, Calcário, Fósforo, Boro, Calcário + Fósforo + Boro e testemunha, sem fertilização (Controlo-). Os tratamentos tiveram 4 repetições, totalizando 20 vasos. Foi usado calcário calcítico, com valor neutralizante de 80%, aplicado na dose de 10 g/vaso. O fósforo foi aplicado em solução nutritiva, na forma de ácido ortofosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), em uma concentração de 28,5 g H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> L<sup>-1</sup> e na dose de 15 mL vaso<sup>-1</sup>. A solução foi corrigida a pH 6 com hidróxido de sódio. O boro foi aplicado na forma de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), aplicando 0,003 g vaso<sup>-1</sup>.

## 4.3. INSTALAÇÃO E MANUTENÇÃO DO EXPERIMENTO

### 4.3.1. Instalação do experimento

Para uma obtenção mais completa de dados a respeito da absorção de nutrientes, foram instalados dois experimentos, como anteriormente referido. O primeiro foi realizado a campo, na região de Pinelo, em uma área de olival de sequeiro onde foram utilizadas seis leguminosas e uma gramínea como testemunha, para medir o potencial de absorção de nitrogênio em condições naturais. Já o segundo, foi utilizada apenas uma leguminosa (*T. subterraneum*, cv. Campeda) que foi instalada em estufa, com clima controlado e doses de nutrientes reguladas, a fim de medir a produção de biomassa e N fixado após aplicação dos tratamentos referidos no ponto anterior.

No experimento a campo as leguminosas foram semeadas dia 15 de outubro de 2021, sem adubação. Posteriormente, foram coletadas amostras para avaliar a produtividade de matéria seca e o acúmulo dos nutrientes pela parte aérea das plantas em diferentes estádios fenológicos.

O solo é derivado de xisto, apresenta textura franco-arenosa e  $pH_{H_2O}$  de 5,06. O teor de matéria orgânica é baixo (0,54%), o valor de P extraível muito baixo e o de K elevado, com 14 mg  $P_2O_5$   $kg^{-1}$  e 119 mg  $K_2O$   $kg^{-1}$ , respectivamente, quando determinados pelo método Egner-Riehm.

No experimento em vasos foi utilizado o solo do experimento a campo, tendo origem na camada arável (0-20 cm). O solo foi primariamente, peneirado para retirar as pedras de maiores dimensões. A semeadura ocorreu no dia 3 de maio de 2022, e seguiu-se até dia 11 de julho de 2022 onde foi feita a coleta das amostras para a análise e a contagem de nódulos por planta e por vaso.

#### 4.3.2. Manutenção dos ensaios

No experimento a campo as plantas se desenvolveram conforme as condições climáticas naturais, sem a adição de manejos como, rega, adubação e eliminação de plantas espontâneas. O experimento em vasos foi irrigado na semeadura e colocadas tampas para cobrir a terra, para manter a umidade e favorecer a germinação. Após 3 dias, com as plantas germinadas, foi monitorado diariamente e ajustada a rega conforme a necessidade, pelo estado hídrico aparente das plantas e do solo.

#### 4.4. COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS

A campo, a primeira coleta foi realizada no dia 4 de março de 2022 e, consecutivamente, nos dias 24 de março de 2022, 14 de abril de 2022 e 30 de abril de 2022. Foram retiradas três amostras de cada espécie estudada a cada coleta, em seguida as amostras foram para uma estufa de ventilação forçada Memmert, regulada a uma temperatura de 70 °C até a massa constante.

Após secagem as amostras foram pesadas para determinação da massa seca e moídas para posteriormente se realizarem as análises químicas elementares.

#### 4.5. ANÁLISES LABORATORIAIS

São descritos a seguir os procedimentos realizados para as determinações da composição elementar nos tecidos vegetais.

##### 4.5.1. Determinação do nitrogênio

Para a determinação de N no material vegetal utilizou-se do método Kjeldahl, que é composto de três fases, sendo essas, digestão, destilação e titulação. O princípio desse método é que o  $\text{N}^{\text{NH}_4^+}$  que é produzido na digestão com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  é destilado em meio fortemente alcalino. O íão  $\text{NH}_4^+$  condensado é coletado em uma solução de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e titulado com solução de HCl (Meneghetti, 2018).

O processo inicia com a pesagem de 1 g de amostra de material vegetal para tubos de digestão e adiciona-se 15 ml de ácido sulfúrico concentrado (95-97%) e duas pastilhas de selênio como catalizador. Em seguida, as amostras são aquecidas a 400 °C por 60 minutos para a oxidação das amostras. Após a digestão, as amostras seguem para o equipamento Kjeltac TM 8400 Autoanalyser FOSS, onde ocorre a destilação, e o  $\text{NH}_3$  é transportado numa corrente de vapor para uma solução de ácido bórico com indicadores. O processo segue com a titulação com uma solução de HCl para quantificar o N (Bremner, 1996).

##### 4.5.2. Determinação de boro

Para realizar esta análise, pesou-se 1 g de amostra para cadinhos, em seguida, adicionou-se 0,10 g de cálcio. A amostra é então homogeneizada e sofre incineração a 500 °C

e as cinzas são diluídas com 10 ml de ácido sulfúrico 0,5 M. Após 30 minutos faz-se a filtração da suspensão, e posteriormente é transferida uma alíquota de 1 ml para tubos de 10 ml. Adiciona-se uma solução de azometina-H que promove o desenvolvimento de uma cor amarela cuja intensidade depende da concentração em boro na amostra. A concentração é avaliada em um espectrofotômetro, onde essa amostra absorve a luz na região de 460 nm (Temminghoff e Houba, 2004).



**Figura 5:** Amostras com 0,10 g de óxido de cálcio.

#### 4.5.3 Determinação de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês

A determinação destes elementos é feita após mineralização das amostras feita por um equipamento de digestão por micro-ondas (*MARS, CEM Corporation*). Para cada amostra pesa-se 0,25g para tubos de digestão e são adicionados 10 mL de ácido nítrico. Os tubos são fechados e levados para digestão durante um período de 30 minutos a uma temperatura de 120 °C. Após esse tempo, a solução resultante foi diluída em água deionizada até 50 mL. É nesta solução que os nutrientes são determinados. Para o fósforo (P), foi utilizado o método azul de molibdênio, usando ácido ascórbico como redutor. No processo desenvolve-se uma coloração azul e a intensidade dessa coloração é proporcional à concentração de P (Temminghoff e Houba, 2004).

O P foi determinado utilizando um espectrofotômetro GENESYS com um comprimento de onda de 882 nm. Os demais elementos são determinados em um equipamento de absorção atômica Perkin Elmer.

#### 4.7. ANÁLISE DE DADOS

Os dados de campo foram organizados pelas médias dos tratamentos e desvios padrão. Os dados do experimento em vasos foram submetidos a análise de variância. Quando se observaram diferenças significativas as médias foram separadas pelo teste de Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

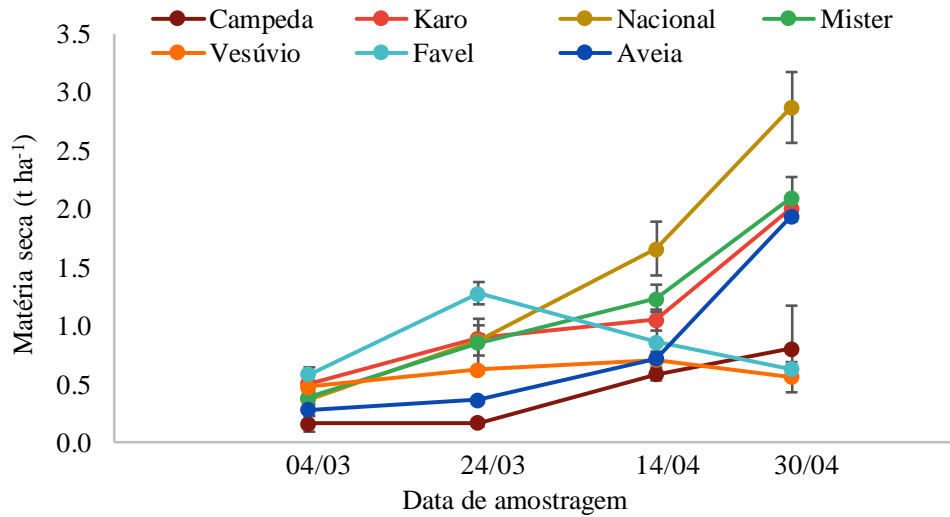
## 5. RESULTADOS

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir das amostras coletadas em campo e nos vasos. Os dados de campo mais importantes são a produção de matéria seca, a concentração de nutrientes nos tecidos e o total acumulado nos tecidos de cada um dos nutrientes. Do experimento em vasos são mostrados a produção de matéria seca, a concentração de nutrientes e o total acumulado nos tecidos, bem como a biomassa radicular e o número de nódulos por planta.

### 5.1. EXPERIMENTO A CAMPO

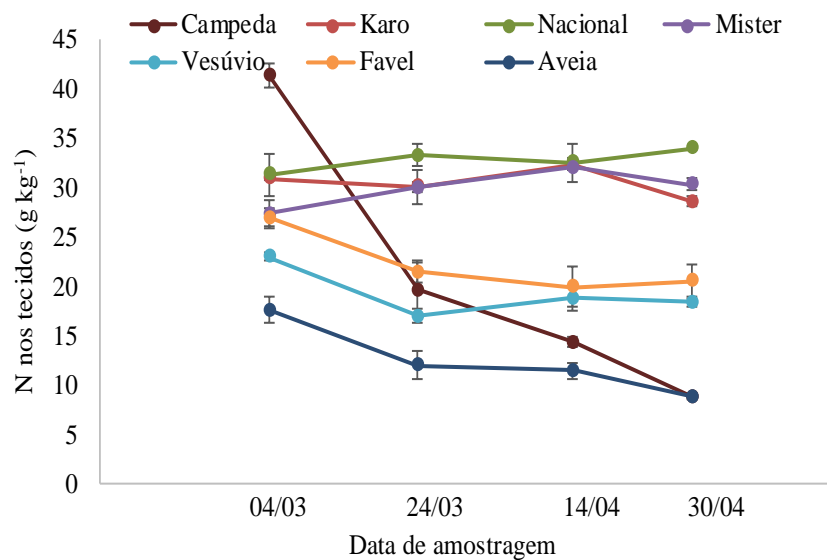
#### 5.1.1. Evolução da produção de matéria seca

Na figura 6 apresenta-se a produção de matéria seca de todas as espécies/variedades nas quatro amostragens realizadas. A tremocilha, cv. Nacional, atingiu o valor mais elevado ( $2,87 \text{ t ha}^{-1}$ ) na última data de amostragem em 30 de abril. A tremocilha, cv. Mister ( $2,09 \text{ t ha}^{-1}$ ), o tremoceiro de folha estreita, cv. Karo ( $2,00 \text{ t ha}^{-1}$ ), registraram valores próximos dos da aveia ( $1,94 \text{ t ha}^{-1}$ ). As favas apresentaram valores muito baixos na última amostragem ( $0,56$  a  $0,63 \text{ t ha}^{-1}$ ) e inferiores ao do trevo subterrâneo, cv. Campeda ( $0,80 \text{ t ha}^{-1}$ ), mostrando necroses nas bordas dos folíolos aparentemente causadas pelo frio ou por forte desequilíbrio nutricional. Os tremoceiros mostraram tendência crescente até à última amostragem, o que deixa supor que o pico de máxima produção de biomassa ainda não tinha sido atingido.



**Figura 6:** Produção de massa seca nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

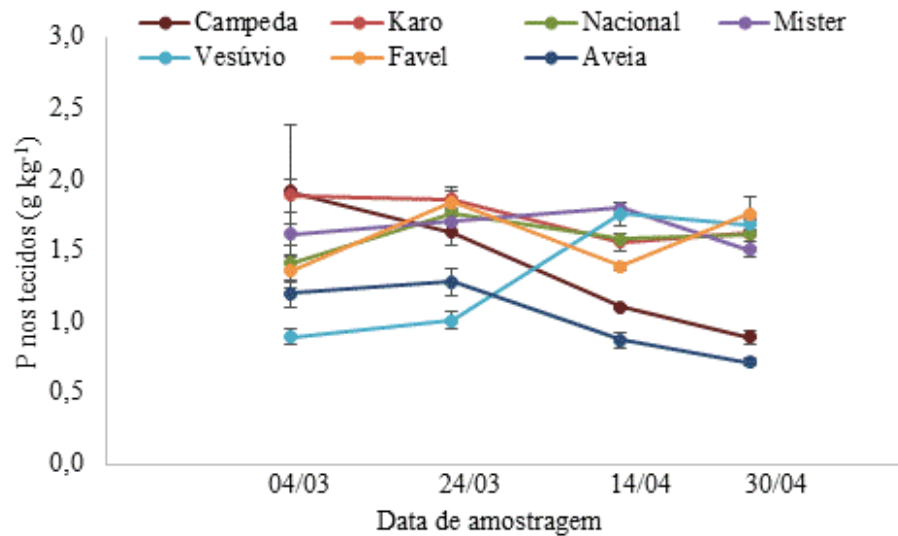
### 5.1.2. Concentração de nutrientes nos tecidos



**Figura 7:** Concentração de nitrogênio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

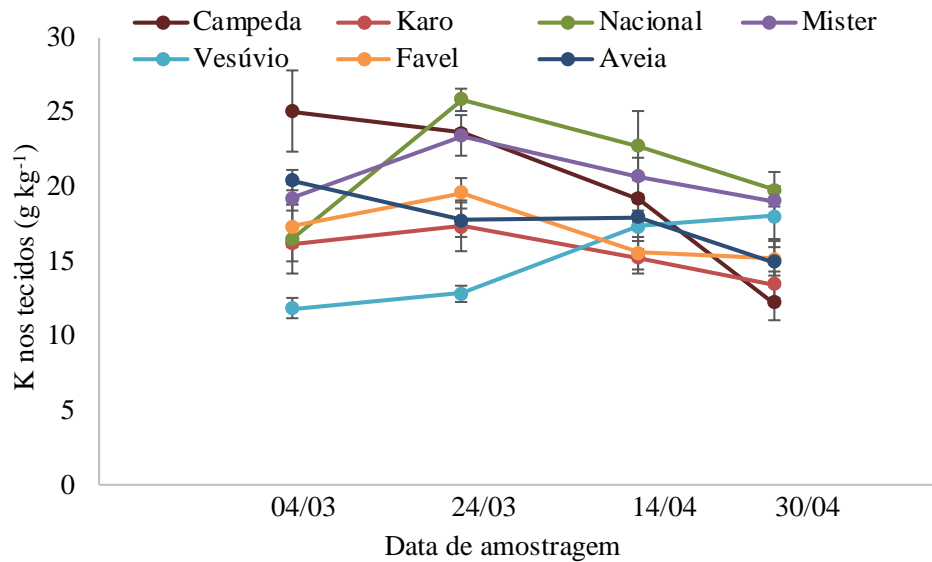
A concentração de fósforo nos tecidos das plantas nas quatro amostragens ao longo do experimento é apresentada na figura 8. As cultivares de fava Favel e Vesúvio e as tremocilhas Nacional e Mister apresentaram valores elevados e aproximados entre si na última coleta, sendo

de 1,76, 1,69, 1,62 e 1,51 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. O trevo subterrâneo e a aveia mostraram valores de fósforo nos tecidos de forma decrescente ao longo do tempo, sendo na última coleta de 0,89 e 0,72 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente.



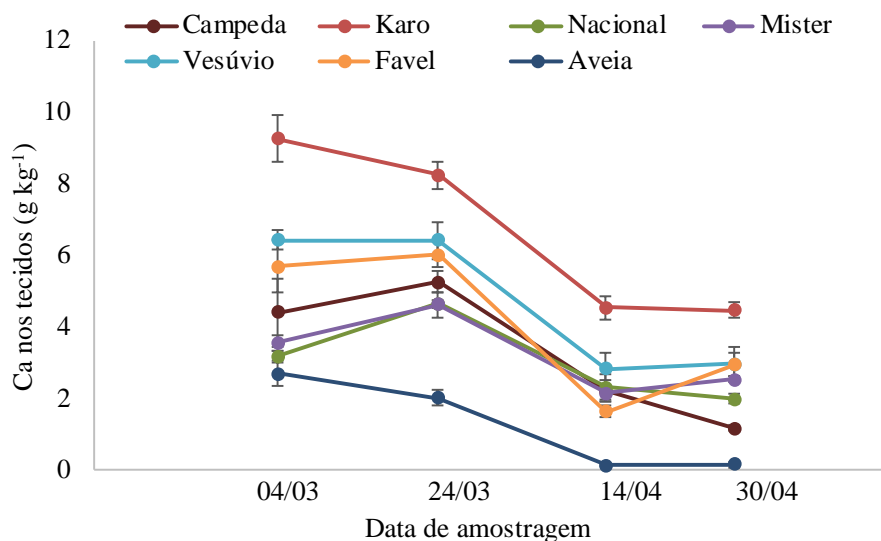
**Figura 8:** Concentração de fósforo nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 9 mostra-se a concentração de potássio nos tecidos das plantas nas quatro amostragens realizadas. As cultivares de tremocilha Nacional e Mister e a fava Vesúvio mostraram valores mais elevados e aproximados entre si na última amostragem com 19,80, 19,04 e 17,98 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. A cultivar de trevo subterrâneo Campeda registrou a menor média com 12,17 g kg<sup>-1</sup>. As demais plantas variaram de 13,40 a 19,04 g kg<sup>-1</sup>. A fava Vesúvio teve um aumento contínuo da concentração de potássio nos tecidos vegetais, enquanto o trevo subterrâneo decresceu da primeira amostragem até a última.



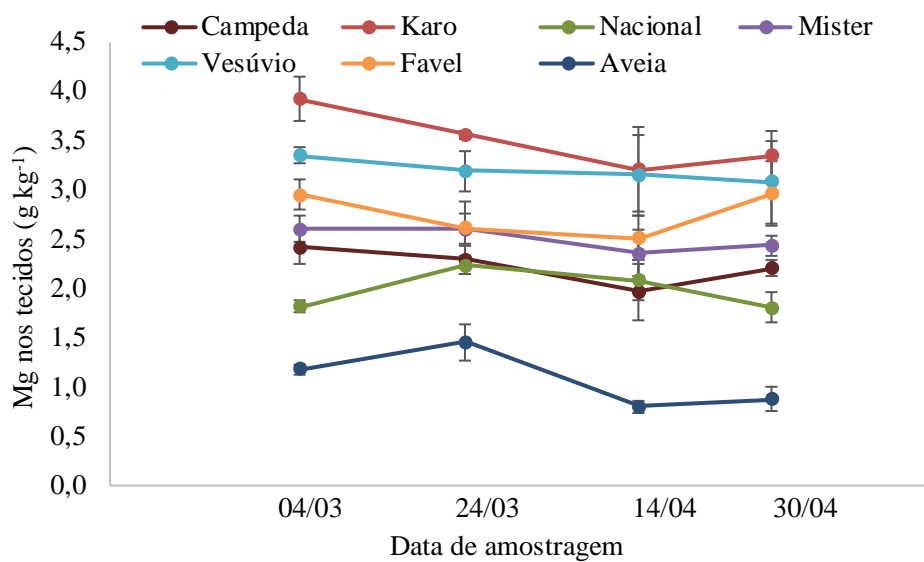
**Figura 9:** Concentração de potássio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 10 observar-se que o tremoceiro azul, cv. Karo, teve os maiores valores da concentração de cálcio nos tecidos em todas as amostragens com valores a variar de 9,3 g kg<sup>-1</sup> na primeira amostragem a 4,4 g kg<sup>-1</sup> na última. A aveia registrou os valores mais baixos a variar de 2,7 a 0,1 g kg<sup>-1</sup> entre a primeira e última amostragem. No geral todas as plantas mostraram valores com forte tendência de decréscimo ao longo do tempo.



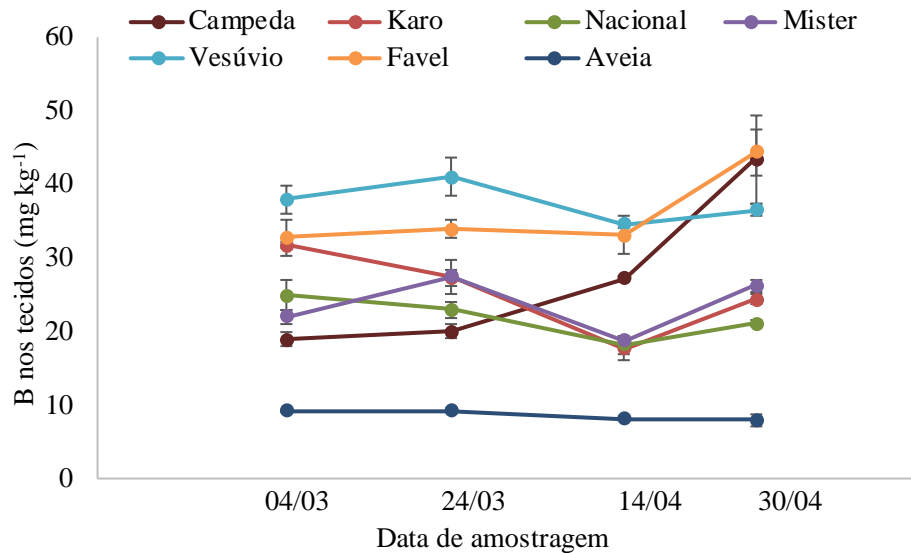
**Figura 10:** Concentração de cálcio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

A figura 11 mostra a concentração de magnésio nos tecidos vegetais nas amostragens realizadas nas sete espécies/cultivares. O tremoceiro azul, cv. Karo, registrou os maiores valores, sendo o valor final de 3,34 g kg<sup>-1</sup>. A aveia teve a menor concentração de magnésio nos tecidos com um valor final de 0,87 g kg<sup>-1</sup>. As concentrações finais de magnésio das demais cultivares variaram entre 1,80 e 3,08 g kg<sup>-1</sup>. Globalmente observou-se uma tendência de decréscimo ao longo do tempo.



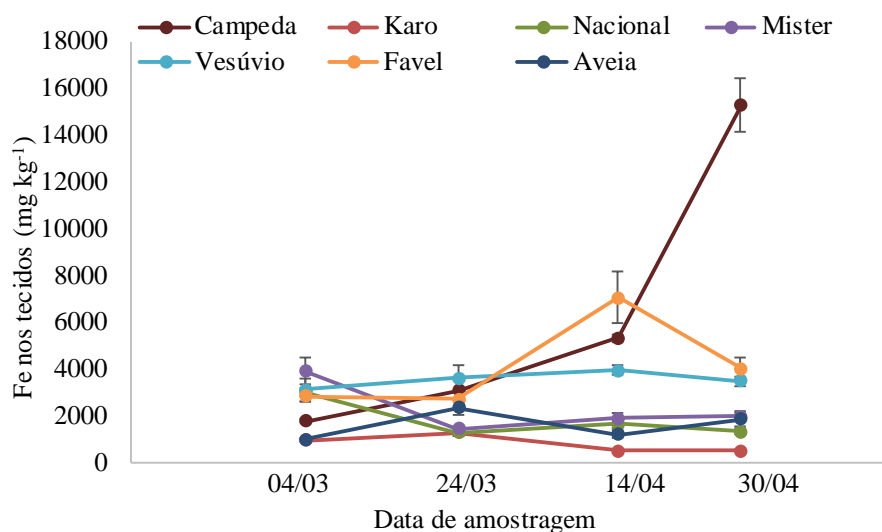
**Figura 11:** Concentração de magnésio nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

As concentrações de boro nos tecidos podem ser observadas na figura 12. A fava, cv. Favel, e o trevo subterrâneo, cv. Campeda, tiveram os maiores valores na quarta amostragem, com 44,26 e 43,40 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. A aveia obteve os menos valores, com uma média final de 7,84 mg kg<sup>-1</sup>. As demais cultivares variaram as concentrações de 20,95 a 36,44 mg kg<sup>-1</sup>.



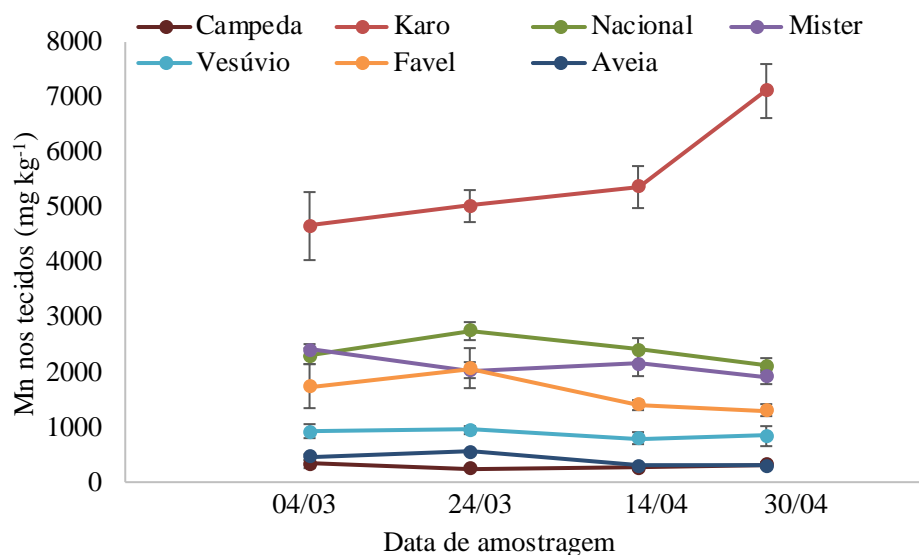
**Figura 12:** Concentração de boro nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 13 pode observar-se a concentração de ferro nos tecidos vegetais das sete espécies/cultivares. O trevo subterrâneo, cv. Campeda, registrou um valor particularmente elevado ( $15278,08 \text{ mg kg}^{-1}$ ) na última amostragem, sem comparação com qualquer outro tecido vegetal. O tremoceiro azul, cv. Karo, obteve a menor média final com  $499,13 \text{ mg kg}^{-1}$ . As demais cultivares obtiveram valores finais entre  $1320,52$  e  $3996,31 \text{ mg kg}^{-1}$ .



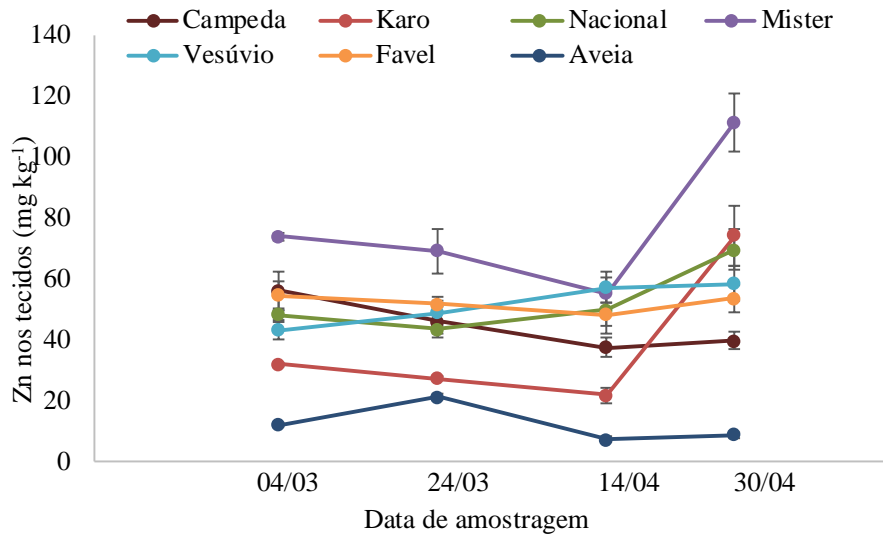
**Figura 13:** Concentração de ferro nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

A figura 14 mostra a concentração de manganês nos tecidos vegetais das sete espécies/cultivares estudadas. O tremoceiro azul, cv. Karo, obteve os maiores valores em todas as amostragens, com uma concentração final de 7104,2 mg kg<sup>-1</sup>. O trevo subterrâneo, cv. Campeda, e a aveia tiveram os menores valores, com uma concentração final de 307,68 e 295,06 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As outras cultivares tiveram uma concentração entre 831,10 e 2117,18 mg kg<sup>-1</sup>.



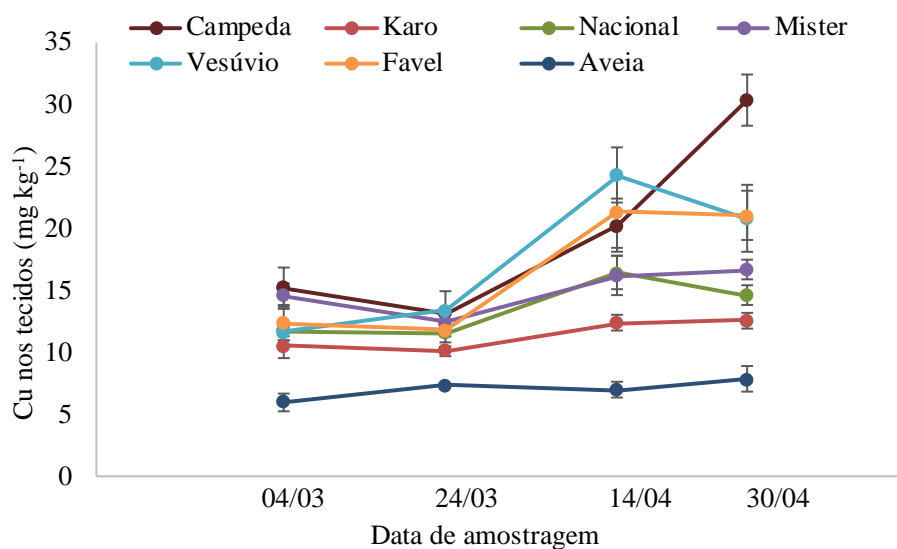
**Figura 14:** Concentração de manganês nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 15 observa-se a concentração de zinco nos tecidos vegetais das sete espécies/cultivares estudadas. A tremocilha, cv. Mister, obteve a maior concentração de zinco, com um na última amostragem de 111,46 mg kg<sup>-1</sup>. A aveia teve os menores valores, com uma concentração final de 8,47 mg kg<sup>-1</sup>. Os demais valores variaram entre 39,59 e 74,07 mg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 15:** Concentração de zinco nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

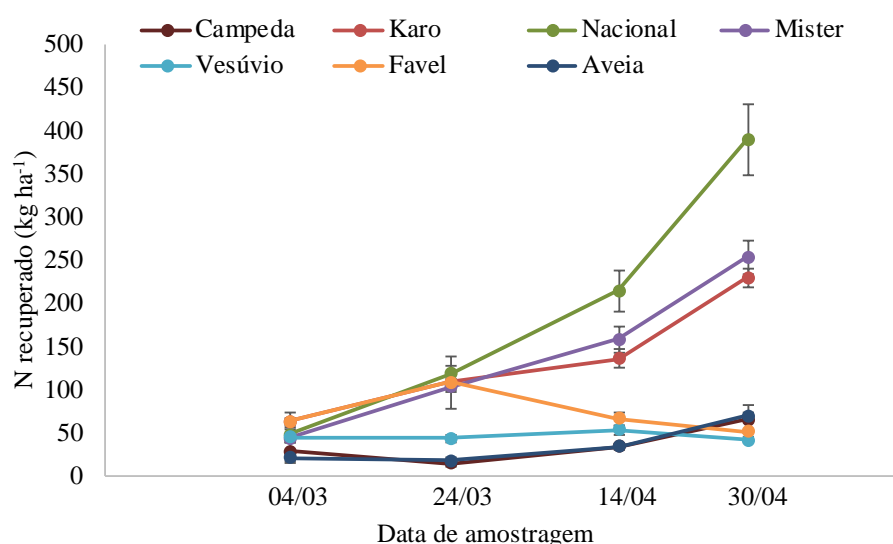
Na figura 16 observa-se a concentração de cobre nos tecidos vegetais das sete espécies/cultivares estudadas. O trevo subterrâneo, *cv.* Campeda, registrou a maior concentração final com 30,37 mg kg<sup>-1</sup>. A aveia obteve os menores resultados, com uma concentração final de 7,83 mg kg<sup>-1</sup>. As demais concentrações finais estiveram entre 12,56 e 21,00 mg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 16:** Concentração de cobre nos tecidos vegetais nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

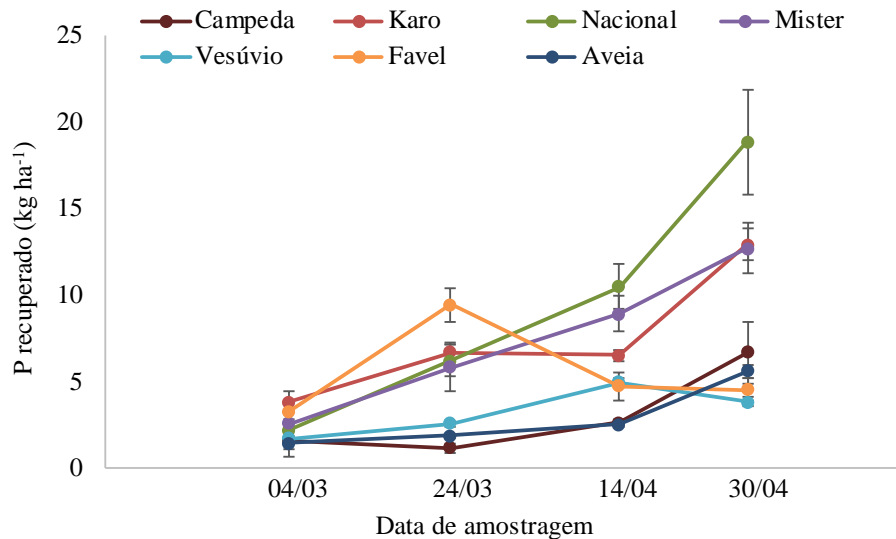
### 5.1.3. Acumulação total de nutrientes nos tecidos

Na figura 17 mostra-se a quantidade de nitrogênio contida nos tecidos vegetais das plantas nas quatro amostragens realizadas. A tremocilha, cv. Nacional, obteve o maior acúmulo final com 390,3 kg ha<sup>-1</sup>. A fava, cv. Vesúvio, registrou o valor mais baixo com 41,3 kg ha<sup>-1</sup>. Na última amostragem, as demais espécies/variedades ficaram entre 50,8 e 253,6 kg ha<sup>-1</sup>. O tremoço, cv. Karo, e as tremocilhas, cvs. Nacional e Mister, mantinham valores crescentes na última amostragem.



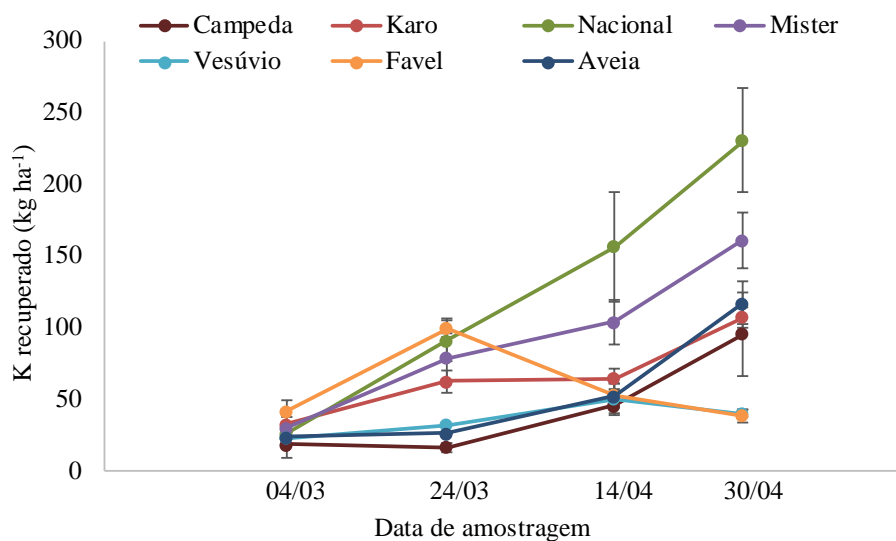
**Figura 17:** Acúmulo total de nitrogênio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 18 apresentam-se os valores de acúmulo de fósforo. A tremocilha, cv. Nacional, obteve o maior resultado na última amostragem com 18,8 kg ha<sup>-1</sup>. A fava, cv. Vesúvio, obteve o menor resultado na última amostragem com 3,9 kg ha<sup>-1</sup>. As demais médias ficaram entre valores de 4,5 e 12,9 kg ha<sup>-1</sup> na última amostragem. Tal como para o nitrogênio, o tremoço azul e as tremocilhas mantiveram valores crescentes na última amostragem.



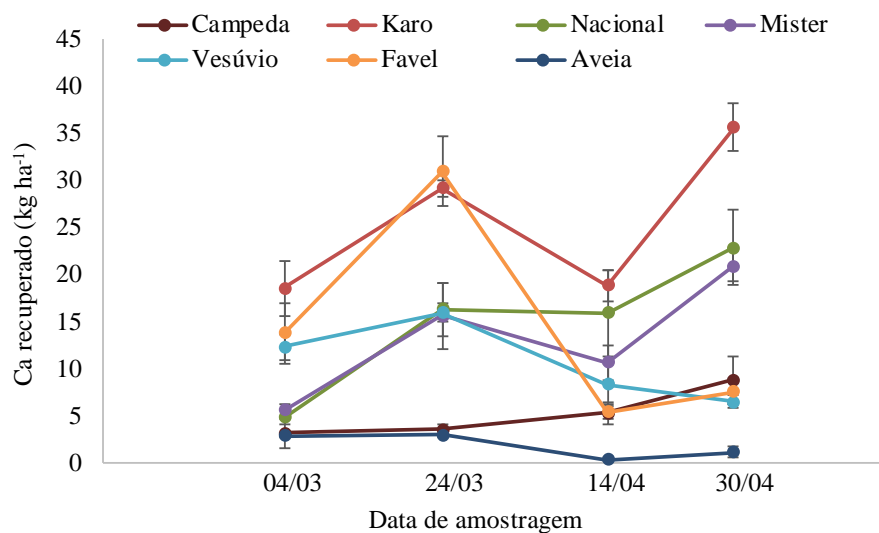
**Figura 18:** Acúmulo total de fósforo nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Para o acúmulo de potássio, ilustrada na figura 19, a tremocilha, cv. Nacional, obteve o maior resultado na última amostragem com 350,5 kg ha<sup>-1</sup>. As favas, cvs. Favel e Vesúvio, obtiveram os menores resultados com valores de 38,1 e 39,7 kg ha<sup>-1</sup>. As demais médias variaram entre 95,1 e 160,6 kg ha<sup>-1</sup>. As favas registraram valores decrescentes na última amostragem.



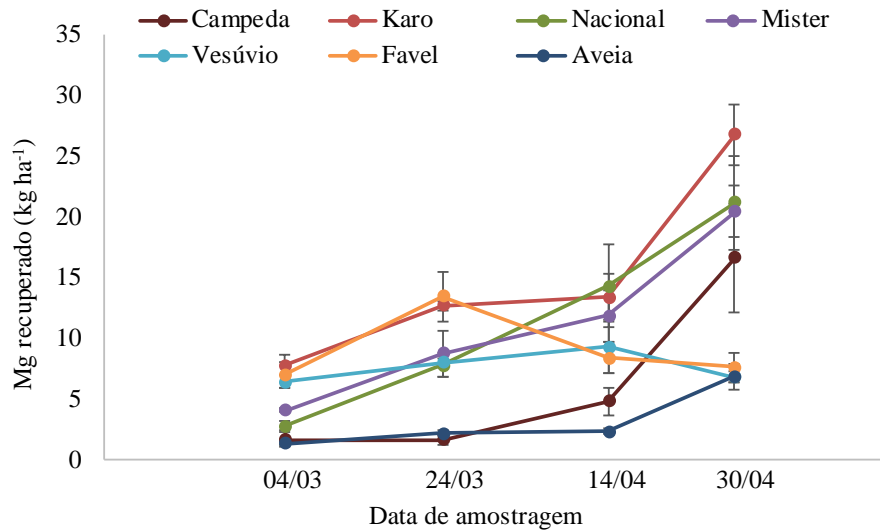
**Figura 19:** Acúmulo total de potássio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 20 mostra-se o acúmulo total de cálcio nos tecidos das plantas. O tremoceiro azul, cv. Karo, apresentou a maior média na última amostragem com 35,6 kg ha<sup>-1</sup>. A aveia obteve a menor média com 1,0 kg ha<sup>-1</sup>. As demais médias ficaram entre os valores de 6,5 e 22,9 kg ha<sup>-1</sup>.



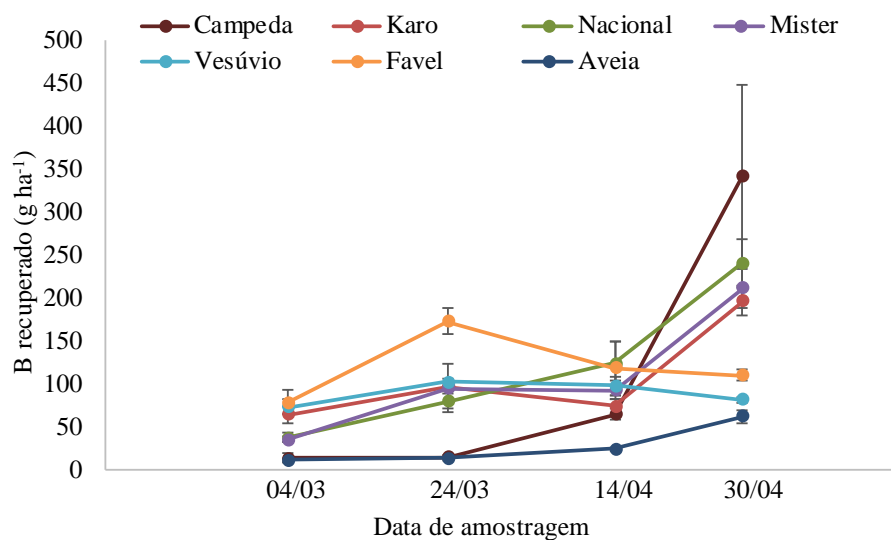
**Figura 20:** Acúmulo total de cálcio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 21 ilustra-se o acúmulo total de magnésio. O tremoceiro azul, cv. Karo, obteve a maior média final com 28,8 kg ha<sup>-1</sup>. A aveia e a fava, cv. Vesúvio, obtiveram a menor média final com um valor idêntico de 6,8 kg ha<sup>-1</sup>. As demais médias ficaram entre 7,50 e 21,11 kg ha<sup>-1</sup>. Com exceção das favas, para todas as demais espécies/variedades os valores mantinham-se crescentes entre a terceira e quarta amostragens.



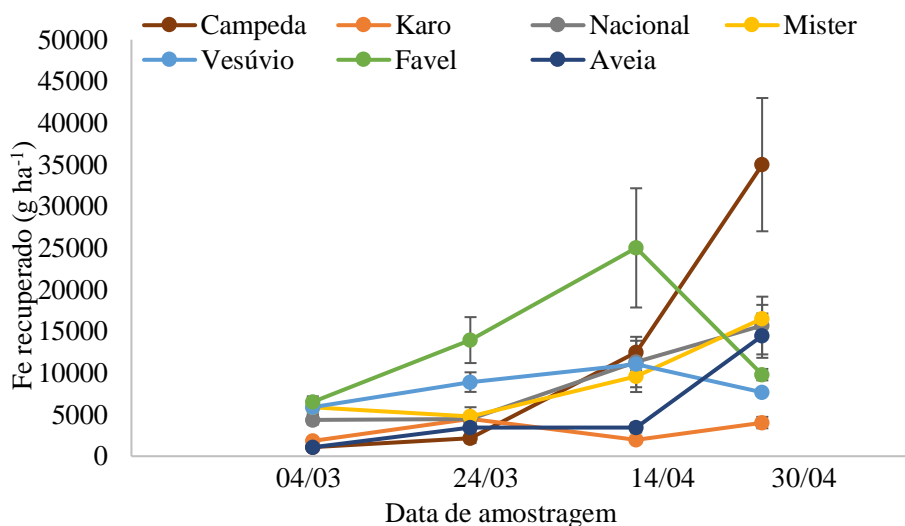
**Figura 21:** Acúmulo total de magnésio nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

O acúmulo total de boro é apresentado na figura 22. O trevo subterrâneo, cv. Campeda, obteve a maior média final com 343,0 g ha<sup>-1</sup>. A aveia, a única gramínea incluída no estudo, obteve o menor resultado com valor de 61,2 g ha<sup>-1</sup>. As demais médias tiveram valores entre 81,4 e 240,6 g ha<sup>-1</sup>.



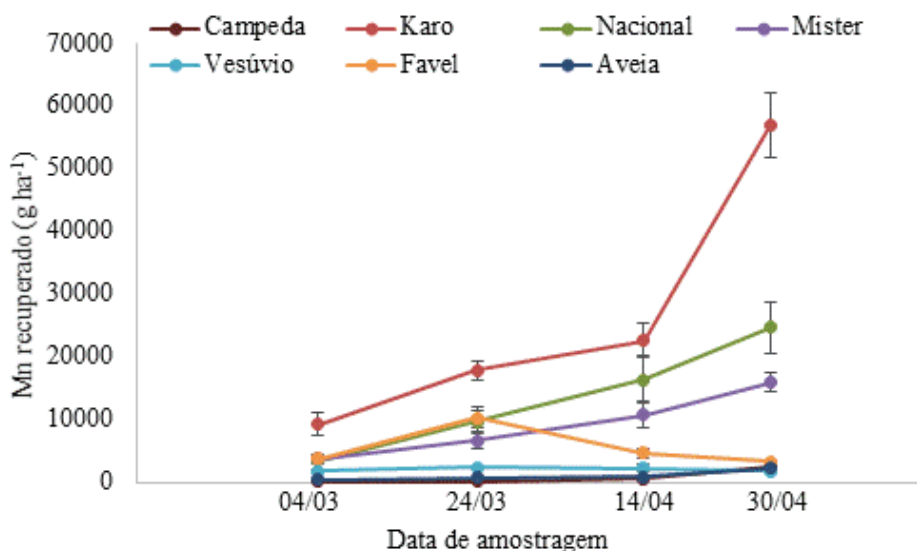
**Figura 22:** Acúmulo total de boro nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 23 mostra-se o acúmulo total de ferro nas diversas espécies/cultivares incluídas no estudo ao longo das quatro amostragens. O trevo subterrâneo, cv. Campeda teve a maior média final com valor de 35000 g ha<sup>-1</sup>. O tremoceiro azul, cv. Karo, obteve a menor média com valor de 4040 g ha<sup>-1</sup>. As demais cultivares tiveram médias entre 7685 e 16519 g ha<sup>-1</sup>.



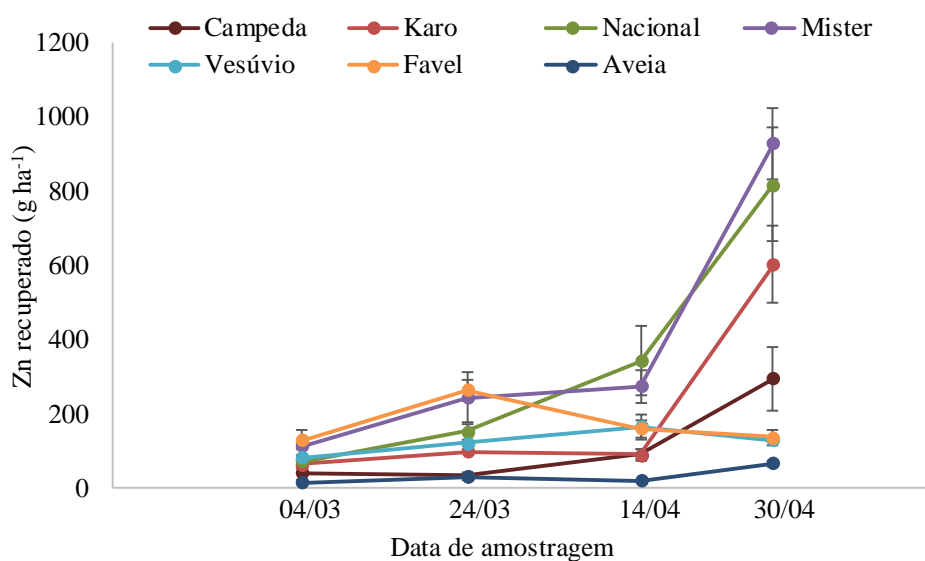
**Figura 23:** Acúmulo total de ferro nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 24 observa-se as médias do acúmulo total de manganês nos tecidos das plantas. O tremoceiro azul, cv. Karo, obteve a maior média final de 56954 g ha<sup>-1</sup>. A aveia e as favas, cvs. Vesúvio e Favel, obtiveram as menores médias com valores de 2306, 3242 e 1804 g ha<sup>-1</sup>, respectivamente. As demais médias ficaram entre 2377 e 24722 g ha<sup>-1</sup>.



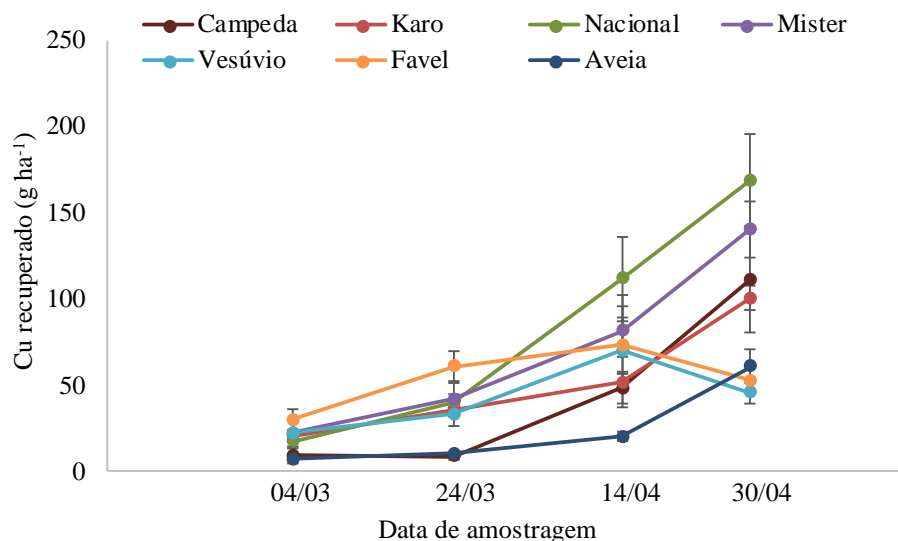
**Figura 24:** Acúmulo total de manganês nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

O acúmulo total de zinco é apresentado na figura 25. A tremocilha, cv. Mister, obteve a maior média final com 929,3 g ha<sup>-1</sup>. A aveia obteve as menores médias com um valor final de 66,1 g ha<sup>-1</sup>. As demais cultivares obtiveram valores entre 128,9 e 818,2 g ha<sup>-1</sup>. Com exceção da aveia e das favas todas as demais plantas registraram fortes acréscimos entre a terceira e quarta datas de amostragem.



**Figura 25:** Acúmulo total de zinco nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

Na figura 26 é apresentado o acúmulo total de cobre nas diferentes espécies/variedades. A tremocilha, cv. Nacional, recuperou mais cobre que os restantes materiais vegetais, com um valor médio de 168,8 g ha<sup>-1</sup>. A menor média final foi registrada na fava, cv. Vesúvio, com 45,6 g ha<sup>-1</sup>. As demais médias variaram entre 52,8 e 140,4 g ha<sup>-1</sup>. O cobre nos tecidos registrou uma quebra nas favas e um aumento nos demais tecidos entre as terceira e quarta datas de amostragem.



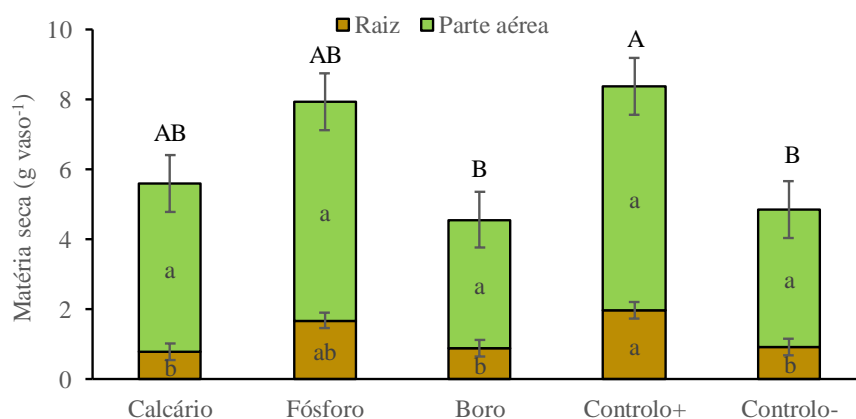
**Figura 26:** Acúmulo total de cobre nas quatro amostragens realizadas. As barras verticais se referem ao desvio padrão das médias.

## 5.2. EXPERIMENTO EM VASOS

### 5.2.1. Produção de matéria seca

A produção de matéria seca pelo trevo subterrâneo, cv. Campeda, cultivado em vasos atingiu valores significativamente mais elevados na raiz das plantas do tratamento Controlo+ (que receberam calcário, fósforo e boro) em comparação com as plantas dos tratamentos Controlo- (sem fertilização), Calcário e Boro (Figura 27). A matéria seca da parte aérea não diferiu significativamente entre tratamentos, embora os valores médios tenham sido mais elevados nos tratamentos Controlo+ e Fósforo. A matéria seca total (raiz + parte aérea) atingiu

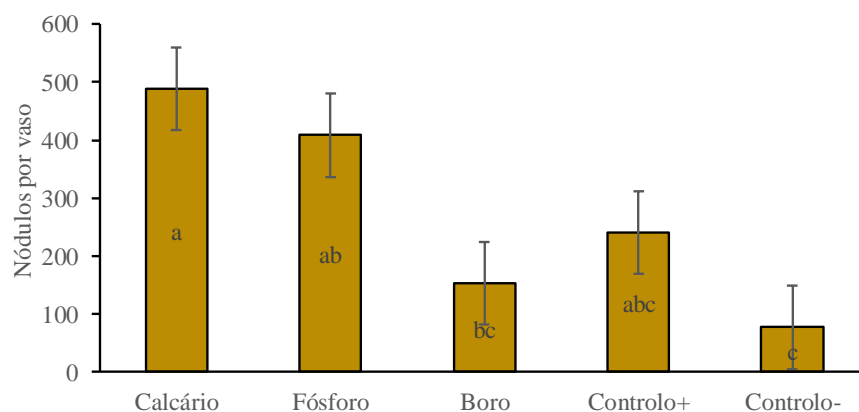
os valores mais elevados no tratamento Controlo+ (8,4 g vaso<sup>-1</sup>), com diferenças significativas para os tratamentos Controlo- (4,9 g vaso<sup>-1</sup>) e Boro (4,6 g vaso<sup>-1</sup>).



**Figura 27:** Matéria seca produzida no experimento em vasos em função dos tratamentos fertilizantes. Nas colunas, letras iguais reportam resultados sem diferenças significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ) para um dado tecido vegetal (minúsculas) ou para a matéria seca total (maiúsculas). As barras de erro reportam o erro padrão das médias.

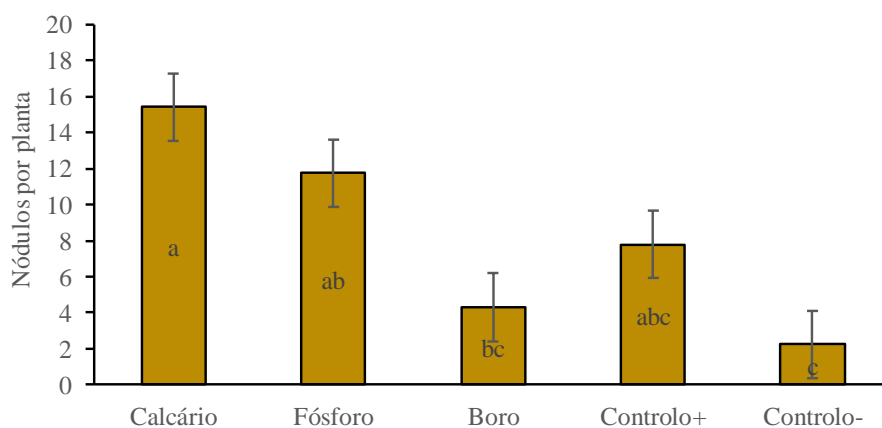
### 5.2.2. Número de nódulos no sistema radicular

O número de nódulos no sistema radicular contabilizados em todas as plantas dos vasos atingiu o valor médio mais elevado no tratamento Calcário (488,0), seguido do tratamento Fósforo (408,5), e com diferenças significativas para os tratamentos Boro (152,8) e Controlo- (76,5) (Figura 28). O tratamento Controlo+ apresentou um valor médio (239,8) que não diferiu significativamente de qualquer um dos demais.



**Figura 28:** Número de nódulos por vaso em função dos tratamentos fertilizantes. Nas colunas, letras iguais reportam resultados sem diferenças significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). As barras de erro reportam o erro padrão das médias.

O número de nódulos por planta manteve a mesma tendência que o número de nódulos por vaso (Figura 29). Os valores médios seguiram a ordem decrescente Calcário (15,4), Fósforo (11,8), Controlo+ (7,8), Boro (4,3) e Controlo- (2,3), com diferenças significativas entre Calcário e Boro e Controlo-.



**Figura 29:** Número de nódulos por planta no experimento em vasos em função dos tratamentos fertilizantes. Nas colunas, letras iguais reportam resultados sem diferenças significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ). As barras de erro reportam o erro padrão das médias.

### 5.2.3. Concentração de nutrientes nos tecidos

Na tabela 1 podem observar-se as concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio na parte aérea do trevo subterrâneo, cv. Campeda, cultivado em vasos. A concentração de nitrogênio teve uma variação significativa do Controlo-, com média de 27,0 g kg<sup>-1</sup>, para o tratamento Boro, que apresentou uma média de 22,8 g kg<sup>-1</sup>.

Os valores de fósforo, potássio e magnésio não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. As médias de fósforo variaram de 1,6 a 2,4 g kg<sup>-1</sup>, as de potássio entre 19,7 e 26,9 g kg<sup>-1</sup>, e as de magnésio de 2,8 a 3,6 g kg<sup>-1</sup>.

Em relação à concentração de cálcio nos tecidos, os tratamentos Controlo+ e Calcário apresentaram os valores mais elevados (8,4 e 8,1 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente) e sem diferenças entre si, mas com diferenças significativas para os tratamentos Controlo- (5,4 g kg<sup>-1</sup>), Boro (5,1 g kg<sup>-1</sup>) e Fósforo (4,4 g kg<sup>-1</sup>).

**Tabela 1:** Concentração de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados.

Tratamentos	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio
	----- g kg <sup>-1</sup> -----				
Calcário	26,7 ab	1,6 a	26,3 a	8,1 a	3,1 a
Fósforo	23,1 ab	2,4 a	19,7 a	4,4 b	3,1 a
Boro	22,8 b	2,1 a	26,9 a	5,1 b	3,6 a
Controlo+	26,4 ab	2,0 a	21,8 a	8,4 a	2,8 a
Controlo-	27,0 a	1,6 a	23,8 a	5,4 b	3,2 a
Probabilidade	0,0245	0,2493	0,1754	<0,0001	0,2505
Erro Padrão	1,05	0,26	2,24	0,43	0,26

Nas colunas, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

A concentração de boro nos tecidos foi significativamente mais elevada no tratamento Boro (64,8 mg kg) em comparação com os demais tratamentos (Tabela 2). No tratamento Controlo+ o valor médio (56,7 mg kg<sup>-1</sup>) foi também significativamente mais elevado que nos demais tratamentos. Entre Fósforo (36,1 mg kg<sup>-1</sup>), Controlo- (35,3 mg kg<sup>-1</sup>) e Calcário (34,3 mg kg<sup>-1</sup>) as médias não diferiram significativamente.

Os tratamentos não diferem entre si na concentração de ferro, onde as médias variaram de 1913,8 a 2766,2 mg kg<sup>-1</sup>. Para o manganês, os tratamentos Controlo-, Boro e Fósforo não diferiram entre si, com médias de 398,5, 387,7 e 311,9 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, mas diferiram dos tratamentos Calcário e Controlo+, que tiveram médias de 192,8 e 188,3 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na concentração de zinco, o tratamento Boro diferiu significativamente dos demais tratamentos com 52,9 mg kg<sup>-1</sup>, sendo que as demais médias variam entre 17 e 44,5 mg kg<sup>-1</sup>. Na concentração de cobre o maior valor foi registrado no tratamento Boro, com uma média de 33 mg kg<sup>-1</sup>. Nos tratamentos Controlo- (44,5 mg kg<sup>-1</sup>) e Fósforo (37,8 mg kg<sup>-1</sup>) foram significativamente mais elevadas que nos tratamentos Calcário (23,8 mg kg<sup>-1</sup>) e Controlo+ (17,0 mg kg<sup>-1</sup>).

**Tabela 2:** Concentração de boro, ferro, manganês, zinco e cobre na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo, cv. Campeda, em função dos tratamentos realizados.

Tratamentos	Boro	Ferro	Manganês	Zinco	Cobre
	----- mg kg <sup>-1</sup> -----				
Calcário	34,3 c	1913,8 a	192,8 b	23,8 c	23,6 b
Fósforo	36,1 c	2036,7 a	311,9 a	37,8 b	21,6 b
Boro	64,8 a	2766,2 a	387,7 a	52,9 a	33,0 a
Controlo+	56,7 b	2019,2 a	188,3 b	17,0 c	21,4 b
Controlo-	35,3 c	2127,1 a	398,5 a	44,5 b	25,2 ab
Probabilidade	<0,0001	0,3225	<0,0001	<0,0001	0,0099
Erro Padrão	1,795	301,2	25,67	<0,0001	0,0099

Nas colunas, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

#### 5.2.4. Acúmulo total de nutrientes nos tecidos vegetais

O acúmulo total de nitrogênio, potássio e magnésio nos tecidos das plantas não tiveram diferenças significativas entre tratamentos (Tabela 3). Os valores médios de nitrogênio acumulado nos tecidos variaram entre 0,86 e 1,69 mg vaso<sup>-1</sup>, os valores médios de potássio entre 0,94 e 1,33 mg vaso<sup>-1</sup> e de magnésio de 0,13 a 0,19 mg vaso<sup>-1</sup>.

Na quantidade total de fósforo acumulado nas plantas, os tratamentos Fósforo e Controlo+ obtiveram os maiores valores com 0,13 e 0,12 mg vaso<sup>-1</sup>, respectivamente. Os demais tratamentos tiveram médias de 0,06 a 0,08 mg vaso<sup>-1</sup>. Nos valores de cálcio, o tratamento Controlo+ teve o maior valor médio com 0,53 mg vaso<sup>-1</sup>, e as demais médias variam de 0,20 a 0,38 mg vaso<sup>-1</sup>.

**Tabela 3:** Acúmulo total de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados.

Tratamentos	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio
	----- mg vaso <sup>-1</sup> -----				
Calcário	1,27 a	0,08 bc	1,21 a	0,38 ab	0,14 a
Fósforo	1,49 a	0,13 a	1,22 a	0,28 b	0,19 a
Boro	0,86 a	0,08 bc	1,03 a	0,20 b	0,14 a
Controlo+	1,69 a	0,12 ab	1,33 a	0,53 a	0,17 a
Controlo-	1,06 a	0,06 c	0,94 a	0,22 b	0,13 a
Probabilidade	0,1310	0,0018	0,5698	0,0038	0,3901
Erro Padrão	0,23	0,08	0,18	0,06	0,03

Nas colunas, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

Os acúmulos de ferro, manganês e cobre não diferiram significativamente entre os diferentes tratamentos, com os valores médios de ferro a variar de 84,45 a 129  $\mu\text{g vaso}^{-1}$ , os de manganês entre 8,87 e 19,63  $\mu\text{g vaso}^{-1}$  e os de cobre entre 1,10 e 1,33  $\mu\text{g vaso}^{-1}$  (Tabela 4).

Relativamente aos valores de boro o Controlo+ foi o tratamento em que se obteve a maior média com 3,62  $\mu\text{g vaso}^{-1}$ . As demais médias variam entre 1,40 e 2,34  $\mu\text{g vaso}^{-1}$ . Para o acúmulo de zinco o tratamento Fósforo registou o maior valor com 2,32  $\mu\text{g vaso}^{-1}$ , tendo os restantes tratamentos apresentado valores a variar entre 1,07 e 1,99  $\mu\text{g vaso}^{-1}$ .

**Tabela 4:** Acúmulo total de boro, ferro, manganês, zinco e cobre na parte aérea das plantas de trevo subterrâneo *cv.* Campeda, em função dos tratamentos realizados.

Tratamentos	Boro	Ferro	Manganês	Zinco	Cobre
	----- $\mu\text{g vaso}^{-1}$ -----				
Calcário	1,64 b	91,28 a	8,87 a	1,10 b	1,10 a
Fósforo	2,28 ab	129,00 a	19,63 a	2,32 a	1,29 a
Boro	2,34 ab	102,37 a	14,86 a	1,99 ab	1,21 a
Controlo+	3,62 a	127,62 a	11,80 a	1,07 b	1,33 a
Controlo-	1,40 b	84,45 a	15,75 a	1,76 ab	1,00 a
Probabilidade	0,0099	0,5085	0,0722	0,0151	0,6421
Erro Padrão	0,39	22,10	2,39	0,26	0,169

Nas colunas, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A tremocilha, cv. Nacional, atingiu os maiores valores de matéria seca, seguida da tremocilha, cv. Mister, e do tremoço azul, cv. Karo. Os valores mantiveram-se crescentes até a última amostragem, indicando que o pico máximo de produção de biomassa não tinha sido atingido. Em outros estudos na região foi demonstrado o elevado potencial de produção de biomassa dos tremoços, sobretudo do tremoço-doce (*Lupinus albus*), mesmo em solos ácidos (Carranca et al., 2009; Rodrigues et al., 2013). Ainda que o tremoço e as tremocilhas usadas neste estudo pertençam a espécies diferentes e as tremocilhas estejam normalmente mais indicadas para solos com pH mais elevado (Grauer e Horst, 1990), elas mostraram níveis interessantes de produção de matéria seca e certa adaptabilidade a acidez do solo. A aveia, usada como testemunha neste estudo, devido à sua adaptação ao clima e solos da região (Rodrigues et al., 2015), teve um comportamento idêntico ao do tremoço e das tremocilhas. As favas registraram valores de produção de matéria seca muito baixos e decrescentes nas últimas amostragens, sendo este um resultado pouco esperado. Desde muito cedo no inverno, estas plantas apresentaram cloroses e necroses generalizadas nas folhas, sintomas de destruição pelo frio e/ou toxicidade nutricional devido ao pH ácido do solo e mesmo tendo alguma tolerância ao frio, são sensíveis a temperaturas muito baixas (Mexe, 2022). O trevo subterrâneo, cv. Campeda, mostrou valores baixos de produção de matéria seca na última amostragem. Essa cultivar tem um ciclo bastante curto, sendo uma justificativa para a baixa produção de matéria seca quando comparada com materiais vegetais de ciclo mais longo (Rodrigues et al., 2015). Contudo, neste estudo as plantas mostraram forte descoloração dos folíolos desde muito cedo no inverno, talvez devido ao frio ou eventualmente à falha na nodulação e acesso ao nitrogênio. É conhecido a sensibilidade de algumas leguminosas a solos ácidos devido à toxicidade do alumínio e/ou do manganês ao processo de nodulação (Russelle, 2008; Havlin et al., 2014)

O trevo subterrâneo iniciou o ciclo com teores de nitrogênio nos tecidos muito elevados, acima de  $40 \text{ g kg}^{-1}$ , e terminou com valores muito baixos, inferiores a  $10 \text{ g kg}^{-1}$ , equivalentes aos registrados na aveia que é uma gramínea. Este resultado pode ser devido ao ciclo curto deste trevo (Rodrigues et al., 2015), pois em abril ocorre uma senescência natural das plantas com remobilização de fotoassimilados para as sementes, como também devido a acidez excessiva do solo que dificulta a nodulação das plantas (Russelle, 2008). Foi a observação das

plantas em campo que motivou o experimento em vasos, que faz também parte desta tese, com o objetivo de evidenciar que fatores justificaram a baixa produção de biomassa dos trevos.

O tremoceiro e as tremocilhas mostraram concentrações elevadas de nitrogênio nos tecidos ao logo do experimento, mostrando que as plantas se encontravam ainda na fase vegetativa na última amostragem e mostrando também que tiveram um bom acesso a nitrogênio atmosférico. Nas favas, a concentração de nitrogênio nos tecidos diminuiu rapidamente desde o inverno, encontrando-se em níveis muito baixos na última amostragem, sendo a explicação mais provável a destruição da parte aérea das plantas pelo frio, devido à sua sensibilidade a temperaturas mais baixas (Mexe, 2022). Nestas plantas ocorreu senescência muito precoce de toda a parte aérea, pelo que a acidez do solo pode ter contribuído também de forma negativa para o baixo desempenho das plantas.

Relativamente aos demais nutrientes, destacam-se os elevados teores de cálcio, magnésio e boro nas leguminosas pelo geral, em comparação com os valores baixos da gramínea. As leguminosas, de uma maneira geral, têm maiores necessidades fisiológicas destes elementos, e acumulam teores mais elevados nos tecidos, em parte devido ao seu papel nas membranas das células e paredes celulares (Gupta, 2007; Broadley et al., 2012; Hawkesford et al., 2012). O tremoceiro azul apresentou níveis muito elevados de manganês nos tecidos, próximos de 7000 mg kg<sup>-1</sup> na última amostragem, valores que seriam tóxicos para a maioria das plantas cultivadas (Bryson et al., 2014). Contudo, estas plantas não mostraram quaisquer sintomas de toxicidade, o que permite antever que esta planta tem boa adaptabilidade a solos ácidos. Por outro lado, indica ser uma planta que não tem mecanismos de exclusão, isto é, que canaliza para a parte aérea o metal, ao contrário de outras plantas que tendem a acumular alguns metais em níveis tóxicos nas raízes (Lopes et al., 2021; Rodrigues et al., 2021; Arrobas et al., 2022).

A recuperação de nitrogênio na parte aérea foi comparativamente elevada no tremoceiro azul e nas tremocilhas, como reflexo da maior produção de biomassa e elevada concentração do nutriente nos tecidos. Esses aspectos são determinantes para serem tidas em conta em projetos de agricultura orgânica/biológica, pois têm uma elevada capacidade de introduzir nitrogênio no sistema, não só para seu uso, mas para outras culturas que possam se beneficiar do nitrogênio após a incorporação dessas leguminosas no solo. As principais técnicas de adubação verde baseiam-se em plantas com essas características (Snoeck et al., 2000; Ferreira et al., 2015).

O ensaio em vasos mostrou maior produção de biomassa no Controlo+ seguido, sem diferenças significativas, do tratamento com Fósforo. No Controlo+ também houve adição de fósforo, significando que, neste experimento e no experimento a campo, o fósforo foi o principal fator limitante ao crescimento das plantas. Muitos estudos anteriores têm destacado o importante papel do fósforo no crescimento das leguminosas, sobretudo na melhoria da sua competição com as gramíneas ou plantas de outros grupos botânicos (Bolland, 1997; Arrobas et al., 2015).

O calcário, contudo, teve um efeito muito positivo na nodulação, bem como o tratamento com Fósforo. Também tem sido evidenciada a importância da calagem na nodulação das leguminosas (Hardarson e Atkins, 2003; Cooper e Scherer, 2012). O Controlo+ não foi tão efetivo na nodulação. Isso parece mostrar que o acesso a fósforo foi mais importante no crescimento das leguminosas que a nodulação, que é responsável pelo fornecimento de nitrogênio (Rodrigues et al., 2013; Rodrigues e Arrobas, 2020).

Na preparação do experimento em vasos, o solo foi crivado e submetido a ciclos de umedecimento e secagem, que estimularam a mineralização de nitrogênio. Isso fez com que o nitrogênio não tenha sido um fator limitante ao crescimento das plantas, também devido à reduzida duração do experimento e baixa produção de biomassa. Nestas condições sobressaiu o fósforo como principal fator limitante, e a sua aplicação aumentou a produção de matéria seca.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na última amostragem a campo, em 30 de abril, as tremocilhas, cvs. Nacional e Mister, e o tremoceiro-azul, cv. Karo, apresentaram os maiores valores de matéria seca. A informação recolhida mostrou também evidência que as plantas estavam em crescimento ativo, não tendo ainda atingido o pico de máxima produção de biomassa. Assim, estas espécies/cultivares mostraram melhorar adaptabilidade às condições de cultivo (frio, pH ácido, ...) que as demais leguminosas.

O acúmulo de nitrogênio atingiu também os valores mais elevados nas tremocilhas e no tremoceiro-azul, em resultado da elevada produção de biomassa e da alta concentração do

nutriente nos tecidos s. Em relação ao acúmulo dos demais nutrientes, a tremocilha, cv. Nacional, teve os valores mais elevados em grande parte dos nutrientes, sendo seguida de perto pelo tremoceiro-azul. Estas plantas tornaram-se assim as mais promissoras para adubação verde, sendo uma fonte importante de nitrogênio para as culturas principais. Como produzem muita biomassa têm também um papel relevante na melhoria da fertilidade do solo.

No experimento em vasos, o tratamento com fósforo originou produções elevadas de biomassa e uma boa nodulação, surgindo como o fator que mais limita o crescimento das plantas neste solo. A aplicação de calcário também apresentou efeitos positivos para a nodulação das plantas, mas não estimulou a produção de matéria seca, o que aparentemente retira importância ao pH como fator limitante ao crescimento das plantas.

## REFERÊNCIAS

- Arrobas, M., Claro, A. M., Ferreira, I. Q., & Rodrigues, M. A. (2013). Disponibilidade de fósforo no solo após o cultivo de leguminosas herbáceas no olival. In *VII Congresso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas*. SECH.
- Arrobas, M., Claro, A. M., Ferreira, I. Q., & Rodrigues, M. Â. (2015). The effect of legume species grown as cover crops in olive orchards on soil phosphorus bioavailability. *Journal of Plant Nutrition*, 38(14), 2294-2311.
- Arrobas, M., de Almeida, S. F., Raimundo, S., da Silva Domingues, L., & Rodrigues, M. Â. (2022). Leonardites Rich in Humic and Fulvic Acids Had Little Effect on Tissue Elemental Composition and Dry Matter Yield in Pot-Grown Olive Cuttings. *Soil Systems*, 6(1), 7.
- Artuzo, F. D. (2022). Carbono na agricultura: produtividade e meio ambiente. Disponível em: ><https://www.3tentos.com.br/triblog/post/87>< Acesso em 30 de maio de 2022.
- Baldani, J., Caruso, L., Baldani, V. L., Goi, S. R., & Döbereiner, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6), 911-922.
- Bertol, O. J., Rizzi, N. E., Favaretto, N., & Lavoranti, O. J. (2005). Perdas de nitrogênio via superfície e subsuperfície em sistema de semeadura direta. *Floresta*, 35(3).
- Bolland, M. D. A. (1997). Comparative phosphorus requirement of four lupin species. *Journal of Plant Nutrition*, 20(10), 1239-1253.
- Bredemeier, C., & Mundstock, C. M. (2000). Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural*, 30, 365-372.
- Bremner, J. M. (1996). Nitrogen-total. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 5, 1085-1121.
- Brezeanu, C., Papa, R., Bittiochi, E., Brezeanu, P. M., Ambarus, S., Calara, M., & Bute, A. (2021). The increase project: Intelligent Collections of Food-Legume Genetic Resources for European Agrofood Systems. *The Plant Journal*, 108(11).
- Broadley, M., Brown, P., Çakmak, İ., Ma, J. F., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Beneficial elements. In *Marschner's mineral nutrition of higher plants* (pp. 249-269). Academic Press.
- Bryson, G. M., Mills, H. A., Sasseville, D. N., Jones, J. B., & Barker, A. V. (2014). *Plant analysis handbook III: A guide to sampling, preparation, analysis, interpretation and use of results of agronomic and horticultural crop plant tissue*. Micro-Macro Publishing, Incorporated.
- Bueno, R. D. F. (2011). *Nitrificação e desnitrificação simultânea em reator com biomassa em suspensão e fluxo contínuo de esgoto* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Carranca, C., Torres, M. O., & Baeta, J. (2009). White lupine as a beneficial crop in Southern Europe: I. Potential for N mineralization in lupine amended soil and yield and N<sub>2</sub> fixation by white lupine. *European Journal of Agronomy*, 31(4), 183-189.

- Cerón Rincón, L. E., & Ancízar Aristizábal Gutiérrez, F. (2012). Dinâmica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295.
- Charchar, J. M., Vieira, J. V., Oliveira, V. R., & Moita, A. W. (2009). Cultivo e incorporação de leguminosas, gramíneas e outras plantas no controle de *Meloidogyne incognita* raça 1 em cenoura 'Nantes'. *Embrapa Hortaliças (ALICE)*.
- Clima Vimioso Portugal. *Climate-data.org*, 2022. Disponível em: ><https://pt.climate-data.org/europa/portugal/vimioso/vimioso-6929/>< Acesso em: 4 de out. de 2022.
- Cross, A. F., & Schlesinger, W. H. (1995). A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*, 64(3-4), 197-214.
- de Souza Moreira, F. M., Da Silva, K., Nóbrega, R. S. A., & De Carvalho, F. (2010). Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 74-74.
- Dobereiner, J. (1984). Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 19, 83-90.
- Drew, E. A., & Ballard, R. A. (2010). Improving N<sub>2</sub> fixation from the plant down: Compatibility of *Trifolium subterraneum* L. cultivars with soil rhizobia can influence symbiotic performance. *Plant and Soil*, 327(1), 261-277.
- Espindola, J. A., et al. (2005). Adubação verde com leguminosas. Brasília, DF: Embrapa Infomação Tecnológica; Seropédica: *Embrapa Agrobiologia*, 2005.
- Favero, C., Jucksch, I., Costa, L. D., Alvarenga, R. C., & Neves, J. C. L. (2000). Crescimento e acúmulo de nutrientes por plantas espontâneas e por leguminosas utilizadas para adubação verde. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24, 171-177.
- Feldens, L. (2018). O homem, a agricultura e a história. Lajeado: *Univantes*.
- Felix, F. F., Berger, L. R. R., de Souza Borges, T. K., & Pereira, N. (2009). Nitrogênio em substrato orgânico mineral inoculado com bactérias diazotrófica de vida livre. In *IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão*.
- Ferreira, I. Q., Rodrigues, M. Â., Claro, A. M., & Arrobas, M. (2015). Management of nitrogen-rich legume cover crops as mulch in traditional olive orchards. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 46(15), 1881-1894.
- Figueiredo, M., Lira Junior, M. A., Araújo, A., & Martinez, C. (2020). Fatores bióticos e abióticos a fixação do N<sub>2</sub>. *Microrganismos e Agrobiodiversidade*, 39-64.
- Galloway, J. N., & Cowling, E. B. (2002). Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 64-71.
- Garcia, G., Cardoso, A. A., & Santos, O. A. M. D. (2013). Da escassez ao estresse do planeta: um século de mudanças no ciclo do nitrogênio. *Química Nova*, 36, 1468-1476.
- Gonçalves, F. M. D. V. T. T. (2015). *Estudo comparativo de leguminosas pratenses anuais* (Doctoral dissertation, ISA/UL).

- Grauer, U. E., & Horst, W. J. (1990). Effect of pH and nitrogen source on aluminium tolerance of rye (*Secale cereale* L.) and yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Plant and Soil*, 127(1), 13-21.
- Gupta, U.C. (2007). Boron. In: *Handbook of plant nutrition*; Barker AV, Pilbeam DJ (eds.). pp: 241-277. CRC.
- Hardarson, G., & Atkins, C. (2003). Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems. *Plant and soil*, 252(1), 41-54.
- Havlin, J. L., Beaton, J. D., Tisdale, S. L., & Nelson, W. L. (2005). Soil fertility and fertilizers and introduction to nutrient management. 7th Ed. *New Jersey, USA*.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I. S., & White, P. (2012). Marschner's mineral nutrition of higher plants. *Functions of macronutrients*. Academic Press, London, 135-189.
- Hayatsu, M., Tago, K., & Saito, M. (2008). Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54(1), 33-45.
- Li, S. X., Wang, Z. H., Hu, T. T., Gao, Y. J., & Stewart, B. A. (2009). Nitrogen in dryland soils of China and its management. *Advances in Agronomy*, 101, 123-181.
- Lopes, J. I., Correia, C. M., Gonçalves, A., Silva, E., Martins, S., Arrobas, M., & Rodrigues, M. Â. (2021). Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation reduced the growth of pre-rooted olive cuttings in a greenhouse. *Soil Systems*, 5(2), 30.
- Marin, V. A., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. D. S., & Baldani, J. I. (1999). Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.
- Martinelli, L. A. (2007). Os caminhos do nitrogênio—do fertilizante ao poluente. *Informações agronômicas*, 118(6).
- Martins, C. R., Pereira, P. D. P., Lopes, W. A., & Andrade, J. D. (2003). Ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre. *Cadernos temáticos de química nova na escola*, 5, 28-41.
- Martins, M. R., Batista, J. N., da Silva, E. C., Jantalia, C. P., Alves, B. J. R., & Urquiaga, S. (2013). Emissões de N<sub>2</sub>O associado ao uso de fertilizantes nitrogenados em solo de Cerrado sob semeadura direta. *Anais da Semana Científica Johanna Döbereiner*.
- Meneghetti, A. M. (2018). Manual de Procedimentos de amostragem e análise química de plantas, solo e fertilizantes. *Editora da Universidade Tecnológica Federal de Paraná*. 200-207.
- Mesquita, S. M., et al. (2019). Abundância de bactérias diazotróficas de vida livre cultiváveis em solos de agricultura. *Encontros Universitários da UFC*.
- Mexe, J., Pereira, G., & Meneses, M. (2022). A cultura da fava: técnicas culturais.
- Nevison, C., & Holland, E. (1997). A reexamination of the impact of anthropogenically fixed nitrogen on atmospheric N<sub>2</sub>O and the stratospheric O<sub>3</sub> layer. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 102(D21), 25519-25536.

- Rocha, C. G., & Cardoso, A. A. (2021). Gases de nitrogênio reativo como precursores do aerossol atmosférico: reações de formação, processos de crescimento e implicações ambientais. *Química Nova*, *44*, 460-472.
- Rockstrom, J. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, *461*, 472-475.
- Rodrigues, M. Â., & Arrobas, M. (2020). Cover cropping for increasing fruit production and farming sustainability. In *Fruit Crops* (pp. 279-295). Elsevier.
- Rodrigues, M. Â., Correia, C. M., Claro, A. M., Ferreira, I. Q., Barbosa, J. C., Moutinho-Pereira, J. M., ... & Arrobas, M. (2013). Soil nitrogen availability in olive orchards after mulching legume cover crop residues. *Scientia Horticulturae*, *158*, 45-51.
- Rodrigues, M. Â., Dimande, P., Pereira, E. L., Ferreira, I. Q., Freitas, S., Correia, C. M., ... & Arrobas, M. (2015). Early-maturing annual legumes: an option for cover cropping in rainfed olive orchards. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, *103*(2), 153-166.
- Rodrigues, M. A., Ferreira, I. Q., Freitas, S. L., Pires, J., & Arrobas, M. (2015). Self-reseeding annual legumes for cover cropping in rainfed managed olive orchards. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *13*(2), e0302.
- Rodrigues, M. A., Pires, J., Claro, A. M., Ferreira, I. Q., Barbosa, J. C., & Arrobas, M. (2013). Instalação de leguminosas anuais de ressementeira natural como cobertos vegetais em olivais de sequeiro. *Pastagens e Forragens*, *32*, 85-97.
- Rodrigues, M. Â., Piroli, L. B., Forcelini, D., Raimundo, S., da Silva Domingues, L., Cassol, L. C., ... & Arrobas, M. (2021). Use of commercial mycorrhizal fungi in stress-free growing conditions of potted olive cuttings. *Scientia Horticulturae*, *275*, 109712.
- Russelle, M. P. (2008). Biological dinitrogen fixation in agriculture. *Nitrogen in agricultural systems*, *49*, 281-359.
- Santos, Vanessa Sardinha dos. "Ciclo do Nitrogênio"; *Brasil Escola*. Disponível em: ><https://brasilecola.uol.com.br/biologia/ciclo-nitrogenio.htm><. Acesso em 26 de maio de 2022.
- Seliga, H. (1993). The role of copper in nitrogen fixation in *Lupinus luteus* L. In *Plant Nutrition—from Genetic Engineering to Field Practice* (pp. 459-462). Springer, Dordrecht.
- Snoeck, D., Zapata, F., & Domenach, A. M. (2000). Isotopic evidence of the transfer of nitrogen fixed by legumes to coffee trees. *BASE*.
- Sousa, L. B., Freitas, M. C., dos Santos Martins, M., da Silva, C. C. G., da Silva, E. V. N., da Silva, V. S. G., & da Silva, A. F. (2020). Caracterização morfofisiológica de diazotróficas de vida livre provenientes de solos sob diferentes coberturas vegetais do nordeste brasileiro. *Brazilian Journal of Development*, *6*(2), 9424-9430.
- Temminghoff, E. J. M.; Houba, V. J. G. (2004). *Plant Analysis Procedures*. 2 ed. London: Kluwer Academic Publishers.
- Toma, H. E. (2015). *Química bioinorgânica e ambiental*. Blucher: São Paulo.
- Vieira, R. F. (2017). Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas. *Embrapa Meio Ambiente (ALICE)*.

Walker, TW, & Syers, JK (1976). O destino do fósforo durante a pedogênese. *Geoderma*, 15 (1), 1-19.