

ESPECIAÇÃO E TRANSFORMAÇÕES DO FÓSFORO ORGÂNICO EM SOLOS
FLORESTAIS E AGROFLORESTAIS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA NO
BRASIL

SELDON ALEIXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2018

ESPECIAÇÃO E TRANSFORMAÇÕES DO FÓSFORO ORGÂNICO EM SOLOS
FLORESTAIS E AGROFLORESTAIS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA NO
BRASIL

SELDON ALEIXO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, com ênfase em Solos e Nutrição de Plantas.”

Orientador: Prof. Antônio Carlos da Gama-Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCH / UENF

081/2018

A366 Aleixo, Seldon.

Especiação e transformações do fósforo orgânico em solos florestais e agroflorestais na região da mata atlântica no Brasil / Seldon Aleixo. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

93 f. : il

Bibliografia: f. 86 – 93.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Antônio Carlos da Gama-Rodrigues.

Coorientador: Jan Schripsema.

1. Agroflorestas de Cacau. 2. Leguminosas Florestais. 3. Fósforo Orgânico do Solo 4. Fertilização Nitrogenada. 5. Solução de espectroscopia de ³¹P RMN I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 633.74

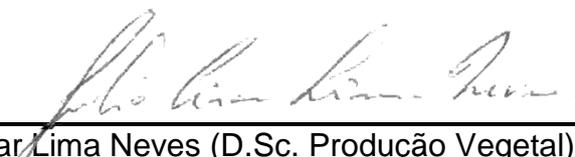
ESPECIAÇÃO E TRANSFORMAÇÕES DO FÓSFORO ORGÂNICO EM SOLOS
FLORESTAIS E AGROFLORESTAIS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA NO
BRASIL

SELDON ALEIXO

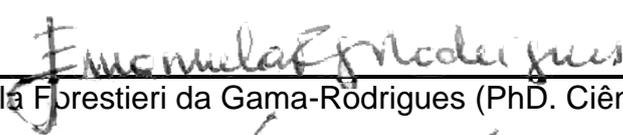
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal, com ênfase em Solos e Nutrição de Plantas.”

Aprovada em 09 de março de 2018

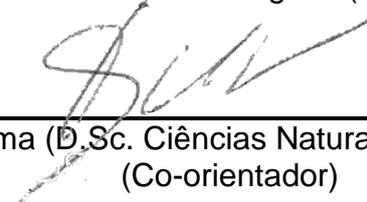
Comissão Examinadora



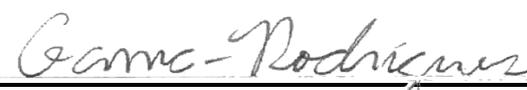
Prof. Júlio César Lima Neves (D.Sc. Produção Vegetal) – UFV



Prof.ª Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues (PhD. Ciência do Solo) – UENF



Prof. Jan Schripsema (D.Sc. Ciências Naturais e Matemática) – UENF
(Co-orientador)



Prof. Antônio Carlos da Gama-Rodrigues (D.Sc. Solos e Nutrição de Plantas) –
UENF
(Orientador)

*I met a traveller from an antique land
Who said: —Two vast and trunkless legs of stone
Stand in the desert. Near them on the sand,
Half sunk, a shatter'd visage lies, whose frown
And wrinkled lip and sneer of cold command
Tell that its sculptor well those passions read
Which yet survive, stamp'd on these lifeless things,
The hand that mock'd them and the heart that fed.
And on the pedestal these words appear:
"My name is Ozymandias, king of kings:
Look on my works, ye mighty, and despair!"
Nothing beside remains: round the decay
Of that colossal wreck, boundless and bare,
The lone and level sands stretch far away.*

Percy Bysshe Shelley

AGRADECIMENTOS

Para que este trabalho fosse realizado, contei com a ajuda e o apoio de muitas pessoas, que contribuíram de diferentes formas na minha vida, mas sem dúvida cada uma foi especial e teve sua importância, à sua maneira.

À Deus que sempre me guiou.

À minha mãe e irmãs queridas, por todo apoio e amor ao longo dessa trajetória que se iniciou ainda no ano de 2003.

À Isabela, por todo carinho e atenção nos momentos difíceis e alegres.

A todos os colegas de laboratório, sendo eles mestrandos, doutorandos ou professores, agradeço por me ajudarem de todas as formas que só um amigo faria.

Ao orientador Antônio Carlos, e ao co-orientador Jan pela sua orientação e ensinamentos. A eles, meu agradecimento.

Às técnicas do Laboratório de Solos/CCTA/ UENF: Vanilda e Katia. A todos que não foram citados, mas que participaram, direta ou indiretamente, da minha formação.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense e professores, por terem fornecido a base de todo o meu aprendizado, e por tornar possível a realização de um ideal. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão de bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. O fósforo no solo.....	5
2.2. Extração sequencial de P do solo.....	7
2.3. Espectroscopia de ³¹ P RMN: Conceitos.....	9
2.4. Espécies de P do solo via ³¹ P RMN.....	10
2.5. Solução extratora para ³¹ P RMN.....	13
2.6. Parâmetros experimentais da análise de ³¹ P RMN.....	15
2.7. Justificativa para o uso da espectroscopia de ³¹ P RMN.....	17
2.8. Sistemas agroflorestais.....	19
3. TRABALHOS	21

3.1. Especificação do Fósforo Orgânico do Solo em Agroflorestas de Cacao na Região da Mata Atlântica no Brasil.....	21
3.2. Leguminosas florestais podem aumentar a disponibilidade de fósforo no solo? Uma ligação entre os ciclos fósforo e nitrogênio em florestas e agroflorestas tropicais no Brasil.....	50
RESUMO E CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

RESUMO

ALEIXO, Seldon; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março, 2018; Especiação e Transformações do Fósforo Orgânico em Solos Florestais e Agroflorestais na Região da Mata Atlântica no Brasil; Orientador: Antônio Carlos da Gama-Rodrigues. Co-orientador: Jan Schripsema.

Há pouco conhecimento sobre as espécies de fósforo (P) em solos fortemente intemperizados sob agroflorestas em regiões tropicais. A especiação de fósforo orgânico do solo foi determinada em diferentes sistemas agroflorestais de cacau (*Theobroma cacao* L.) com idade variável e baixo *input* de fertilizante fosfatado na região da Mata Atlântica no Brasil. Assim como, compreender o papel das leguminosas florestais para os ciclos de P e nitrogênio (N) em solos tropicais é relevante para a conservação das florestas naturais, em conjunto com um manejo sustentável de agroflorestas com baixo *input* de P na região da Mata Atlântica. Para tanto, utilizou-se a extração de NaOH-EDTA e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (^{31}P RMN) assim como o método de extração sequencial de Hedley a fim de determinar as frações de P do solo. As agroflorestas de cacau estudadas foram as seguintes: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau + eritrina, 35 anos; (4) cacau + seringueira, 3 anos; (5) cacau + seringueira, 40 anos; (6) cacau + seringueiras em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau + seringueiras em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada. Uma pastagem não fertilizada com ausência de pastoreio (8) e uma floresta natural (9) foram utilizadas como sistemas de referência. Os sítios com leguminosas florestais foram, Sítio 1 (município de Valença): (1) 0% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais, (2)

25% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais, (3) 50% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais, (4) 75% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais; Sítio 2 (município de Conceição de Macabú): (5) *Acacia auriculiformis*, (6) *Mimosa caesalpinifolia*, (7) floresta secundária, (8) pastagem; Sítio 3 (município de Seropédica): (9) *Acácia angustíssima*; (10) *Gliricidia sepium*; (11) *Pueraria phaseoloides* (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada e (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada. Os resultados mostraram que o uso da espectroscopia de ^{31}P RMN no solo melhorou a compreensão da especiação de P em agroflorestas de cacau. A distribuição das espécies de P no solo variou de acordo com diferentes práticas de manejo (adubação fosfatada, espécies arbóreas e densidade de árvores) e tempo de estabilidade (diferentes idades) das agroflorestas de cacau com baixo *input* de fertilizantes fosfatados. Para as agroflorestas de cacau, floresta natural e pastagem, grande parte do P orgânico do solo consistiu de P-monoéster e baixas concentrações de DNA. Esta espécie de P_o foi correlacionada positivamente com argila e carbono orgânico do solo. No entanto, a recente conversão de florestas naturais e pastagens em agroflorestas de cacau levaram a uma diminuição na concentração de DNA. Altas concentrações de pirofosfato encontradas em todas as agroflorestas de cacau podem ser uma evidência de uma alta atividade fúngica do solo e na ciclagem e acúmulo dessa espécie de P. Além disso, as altas concentrações e proporções relativas de espécies de P_o e pirofosfato revelaram um alto potencial de fornecimento de P às plantas, em caso de supressão da fertilização fosfatada nestes sistemas agroflorestais. As leguminosas florestais inoculadas com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares podem aumentar as concentrações de P no solo através da ciclagem e acumulação de compostos orgânicos e inorgânicos de P. Os resultados também destacaram que o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P em conjunto com a extração sequencial de P do solo melhorou a compreensão do ciclo de P e N para o funcionamento dos ecossistemas terrestres. No geral, o estudo destaca a importância de considerar o contexto ambiental do plantio de diferentes espécies de leguminosas florestais com a finalidade de recuperar áreas fortemente degradadas, e que pode ser uma estratégia adequada através do manejo eficiente da ciclagem de P e N em solos tropicais fortemente intemperizados no domínio do bioma Mata Atlântica no Brasil.

ABSTRACT

ALEIXO, Seldon; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March, 2018; Soil Organic Phosphorus Speciation and Transformations in Forests and Agroforests in the Atlantic Forest Region in Brazil; Advisor: Antônio Carlos da Gama-Rodrigues. Co-advisor: Jan Schripsema.

There is little knowledge about phosphorus (P) species in strongly weathered soils of agroforests in tropical regions. The soil organic P speciation was determined in different cacao (*Theobroma cacao* L.) agroforestry systems varying in age and low-input phosphate fertilizer in the Atlantic Forest region of Brazil. Understanding the role of leguminous trees for P and nitrogen (N) cycling in tropical soils is relevant for conservation of natural forests, as well as the sustainable management of agroforests with low P input in the Atlantic Forest. For this purpose, NaOH-EDTA extraction and solution ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{31}P NMR) were used, as well as the Hedley sequential extraction method was used to determine the soil P fractions. The cacao agroforests studied were the following: (1) open cacao-cabruca, 40 years; (2) close cacao-cabruca, 40 years; (3) cacao + erythrina, 35 years; (4) cacao + rubber tree mixed, 3 years; (5) cacao + rubber tree mixed, 40 years; (6) cacao + rubber tree intercropping, 4 years after replacing a natural forest; (7) cacao + rubber tree intercropping, 4 years after replacing an unfertilized pasture. The sites with forest legumes were, Site 1 (municipality of Valença): (1) 0% leguminous trees mix coverage, (2) 25% leguminous trees mix coverage, (3) 50% leguminous trees mix coverage (4) 75% leguminous trees mix coverage; Site 2 (municipality of Conceição de Macabú): (5) *Acacia auriculiformis*, (6) *Mimosa caesalpinifolia*, (7) secondary forest, (8) pasture; Site 3 (municipality of

Seropédica): (9) *Acacia mangium*; (10) *Gliricidia sepium*; (11) *Pueraria phaseoloides*; (12) spontaneous vegetation with low input of nitrogen fertilizer and (13) spontaneous vegetation without nitrogen fertilization. The use of ^{31}P NMR spectroscopy in soil improved our understanding of P speciation in cacao agroforests. The distribution of P species in soil varied according to different management practices (P fertilization, tree species and tree density) and stability time (different ages) of the cacao agroforests with low input of phosphate fertilizer. In cacao agroforests, natural forest and pasture a large portion of the soil organic P consisted of P-monoester with lower concentrations of DNA. This P_o species was correlated positively with clay and soil organic carbon. However, the recent conversion of natural forest and pasture to cacao agroforests led to a decrease in DNA concentration. High concentrations of pyrophosphate found in all cacao agroforests could be an evidence of a high soil fungal activity in cycling and accumulation of this P species. Moreover, the high concentrations and relative proportions of P_o and pyrophosphate species revealed a high potential of P supply to plants in case of suppression of the phosphate fertilization in these agroforestry systems. Further study is now required to evaluate the contribution of soil P compounds to the plant's nutrition, and to assess the effects of land use on the P biogeochemical cycle in these cacao agroforestry systems. Leguminous trees inoculated with both diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi may increase soil P concentrations through cycling and accumulation of organic and inorganic P compounds. The results also highlighted that the use of ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy in conjunction with the sequential extraction of P from the soil improved the understanding of the P and N cycle for the functioning of terrestrial ecosystems. In general, the study highlights the importance of considering the environmental context of planting different forest legume species in order to recover strongly degraded areas, which may be an appropriate strategy through the efficient management of P and N cycling in tropical soils strongly weathered in the domain of the Atlantic Forest biome in Brazil.

1. INTRODUÇÃO

Solos tropicais com elevado grau de intemperismo possuem também uma elevada deficiência de fósforo (P) causada pela alta capacidade adsorção de P à fase mineral do solo. Esses sistemas possuem, predominantemente, caráter drenado de P que fixa a maior parte do P adicionado via fertilização inorgânica. A deficiência de P em solos tropicais é, portanto, um dos principais fatores nutricionais limitantes à produção vegetal (Grierson et al., 2004). Estas condições em que a diminuição dos estoques de P no solo impõe sobre a cobertura vegetal, na forma de deficiência nutricional, refletem na necessidade de aplicação de quantidades cada vez mais elevadas de fertilizantes fosfatados em sistemas tropicais, entretanto, a limitação do seu uso vem ocorrendo ao longo dos últimos anos, principalmente por que as reservas minerais de P são um recurso finito e não renovável em curto prazo (Laclau et al., 2010).

O ponto central da discussão acerca das metodologias que buscam estimar o P presente no solo tem como foco as concentrações do P inorgânico (P_i) prontamente disponível à cobertura vegetal, com o objetivo em estimar a necessidade de adubação fosfatada a ser aplicada na agricultura. Dentre as metodologias mais comumente utilizadas, a extração ácida de P (P-Mehlich-1) figura como a mais amplamente utilizada para o manejo da fertilidade do solo, e em particular estimar do P disponível. Contudo, o método P-Mehlich-1 não leva em consideração outras formas de P no solo que poderiam ser fontes do elemento para as plantas. Como os valores de P obtidos pelo extrator Mehlich-1 são muito baixos em solos com alta

capacidade tampão da acidez (Novais e Smyth, 1999), as atuais recomendações estariam superestimando as necessidades de aplicação de fertilizantes fosfatados principalmente em sistemas de produção de baixos insumos.

Nesse sentido, o P orgânico (P_o) do solo torna-se um importante *pool* de reserva em solos tropicais, e com a capacidade de suprir P à cobertura vegetal através de processos biogeoquímicos de mineralização. Assim, o entendimento das transformações do P no solo é um ponto estratégico na adoção de planos de manejo eficientes que aumente a disponibilidade de P às plantas e microrganismos, através da ciclagem do P_o aportado ao solo por meio de resíduos vegetais que compõem a serapilheira de ecossistemas produtivos tropicais com elevado grau de intemperismo (Fontes et al., 2014). No geral, as formas e a dinâmica do P do solo em tais ecossistemas continuam não totalmente compreendidas, mesmo com os últimos avanços nas metodologias baseadas na extração de P_o do solo. Dentre as metodologias mais comumente utilizadas, o método de extração sequencial de P proposto por Hedley et al. (1982) é o mais comumente empregado nos mais diversos estudos sobre as transformações de P em diferentes classes de solos e usos da terra, tanto em ecossistemas temperados como tropicais (Negassa e Leinweber, 2009; Condrón e Newman, 2011). A extração sequencial permite caracterizar diferentes frações de P_i e P_o em uma escala de variação de solubilidade com base nas alterações de diferentes níveis de pH e força extratora, em ordem decrescente de labilidade no solo (Costa et al., 2016; Aleixo et al., 2017). Contudo, a informação do comportamento biogeoquímico do P é limitada porque não dá a especiação de P nas diferentes frações de P extraído (Negassa e Leinweber, 2009).

As limitações das metodologias clássicas de amostragem do P do solo, como no caso do fracionamento sequencial de P, puderam ser superadas através do uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (^{31}P RMN). Nesse sentido, a ^{31}P RMN, após a extração com NaOH-EDTA, possibilita a determinação e a natureza química das espécies de P nos solos (Cade-Menum, 2017), a fim de descobrir como os sistemas de produção e práticas de manejo implantadas podem influenciar a composição do P do solo através de *inputs* da cobertura vegetal em diferentes ecossistemas (Cade-Menum, 2017), assim como as práticas de manejo e uso da terra podem atuar nas transformações das espécies do *pool* P_o e, até mesmo, indicar o nível de contribuição do P_o presente no solo depositado, via serapilheira para a manutenção da cobertura vegetal.

As formas de P orgânico no solo, identificadas através da ^{31}P RMN, geralmente são agrupadas de acordo com o número de grupos de fosfato ligados ao carbono, e em alguns compostos orgânicos um grande número de grupos fosfato podem estar agrupados (Condrón et al., 2005; Turner et al., 2005). Assim, os ésteres de ortofosfato são sub-agrupados de acordo com o número de ligações éster. As classes quimicamente funcionais de P_o , identificadas com a ^{31}P RMN, são os ortofosfatos monoésteres (P-monoéster) (i.e., possui uma ligação éster por fosfato), e representam o grupo dominante na composição do P_o do solo. As espécies de P-monoéster normalmente determinadas são o *myo*-inositol hexaquisfosfato (*myo*-IHP) e seus estereoisômeros como *D-chiro*-inositol hexaquisfosfato (*chiro*-IHP), *neo*-inositol hexaquisfosfato (*neo*-IHP) e *scyllo*-inositol hexaquisfosfato (*scyllo*-IHP) (Turner et al., 2012). Os ortofosfatos diésteres (P-diéster) (i.e. possuem duas ligações éster por fosfato) é outro grupo de P_o encontrado no solo e constituem a maior porção do P_o lábil. O ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e fosfolipídios são as formas mais abundantes de P-diéster. Outras formas de P, tais como os ortofosfato inorgânico (*ortho*-P), fosfonatos (i.e., grupo de compostos químicos que possuem ligação direta entre fósforo-carbono), pirofosfato, polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa podem, também, ser determinados por ^{31}P RMN (Jarosch et al., 2015).

Há pouca informação sobre as concentrações de P_o para solos agroflorestais na região tropical. No geral, as agroflorestas de cacau e seringueira possuem uma elevada capacidade de absorção e reciclagem de nutrientes (Fontes et al., 2014), com também elevados estoques de P_o nesses solos (Aleixo et al., 2017). Esse elevado estoque de P_o no solo pode ser relevante em suprir adequadamente a quantidade de P exportada através da colheita das sementes de cacau e diminuir, assim, a dependência das agroflorestas de cacau pela fertilização inorgânica fosfatada anual (Zaia et al., 2012). Entretanto, as conclusões baseadas nos métodos de extração sequencial não fornecem informações detalhadas sobre os diferentes compostos químicos que compõem o *pool* P_o , assim como a sua dinâmica no solo para sustentar a produção vegetal desses ecossistemas.

Neste contexto, há a necessidade de identificar e quantificar as espécies de P presentes em solos sob diferentes agroflorestas, assim como em plantações de leguminosas florestais, para melhor entender a contribuição das espécies orgânicas para a biodisponibilidade de P em solos tropicais fortemente intemperizados. Desta

forma, os objetivos do presente estudo foram (1) utilizar a extração de NaOH-EDTA em conjunto com a solução de espectroscopia ^{31}P RMN para determinar as concentrações e a natureza química das espécies de P orgânico e inorgânico, em diferentes sistemas agroflorestais de cacau com diferentes idades e com baixo *input* de fertilizante fosfatado no domínio do bioma Mata Atlântica, no Brasil; (2) Compreender através do uso da espectroscopia ^{31}P RMN, em conjunto com o fracionamento sequencial de P a relevância do manejo sustentável de leguminosas florestais sobre ciclo do fósforo (P) e do nitrogênio (N) e conservação das florestas naturais no domínio do bioma Mata Atlântica, no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O fósforo no solo

O elemento fósforo (P) é um dos nutrientes essenciais à manutenção da vida de todos os organismos e que pode limitar a produção vegetal por ser um recurso finito. Alguns dos processos ligados ao metabolismo vegetal têm a participação do fósforo como a síntese de moléculas armazenadoras de energia (ATP) e ácidos nucleicos, manutenção da membrana plasmática através de fosfolipídios, além de atuar na fixação biológica de nitrogênio (N), assim a dinâmica desse elemento se torna um ponto chave para a produção vegetal.

Os minerais fosfatados são a fonte primária de P para a composição do solo. O solo possui diversas concentrações de P inorgânico (P_i) e orgânico (P_o), e a sua dinâmica é controlada por agentes físicos, químicos e biológicos (Frossard et al., 2000), que o torna disponível à solução do solo e assim às plantas. Contudo, a maior parcela do P que é liberado dos minerais fonte, como a apatita ($Ca_3(PO_4)_2(OH, F, Cl)$), tende a formar estruturas com coloides inorgânicos do solo (Stevenson e Cole, 1999) e a se ligar com componentes como o alumínio (Al) cálcio (Ca) e ferro (Fe) ou até mesmo, pode ser adsorvido a argilas silicatadas além da matéria orgânica do solo (Rheinheimer, 2000). No geral, o P_i quando ligado à fase mineral do solo pode se apresentar de uma maneira mais disponível à solução do solo do que na forma composta por agregados orgânicos que dependem da degradação da matéria orgânica por microrganismos (Barber, 1995).

Por outro lado, o P_o possui uma elevada contribuição para a nutrição vegetal quando há deficiência de P_i no solo (Zaia et al., 2008) e, portanto, a mineralização e disponibilização dele tem um papel importante na ciclagem do P no solo (Oehl et al., 2004). O P_o pode ter origem em resíduos orgânicos decompostos da cobertura vegetal por microrganismos, ou até mesmo no tecido microbiano (Martinazzo et al., 2007). Os microrganismos mineralizam o P_o diretamente da matéria orgânica quando há baixo aporte de P_i ao solo (Stewart e Tiessen, 1987), sendo a incorporação do fósforo presente em resíduos vegetais pela biomassa microbiana ocorrendo em curtos períodos (Richardson e Simpson, 2011).

A intensidade da atividade microbiana e a qualidade do resíduo depositado no sistema podem interferir na ciclagem de P e na acumulação de formas mais recalcitrantes de P_o . Em se tratando de resíduos ricos em lignina, ou na sua rápida disponibilização através de resíduos com baixa relação C/N, a imobilização de P em formas orgânicas advindas da biomassa microbiana tende a aumentar a sua disponibilidade a médio e longo prazo no solo, evitando que os coloides inorgânicos do solo adsorvam grande quantidade de P dificultando a absorção das plantas.

Diversos são os trabalhos que demonstram a acumulação e o predomínio de formas orgânicas de P em sistemas tropicais. O P_o no solo pode variar de 20 a 80% do fósforo total (P_t) da camada superficial do solo (Agbenin e Tiessen, 1994; Rheinheimer e Anghinoni, 2002). Segundo Turner e Engelbrecht (2011), em florestas tropicais no Panamá, as concentrações de P_o em diferentes solos tropicais variaram de 22 a 494 mg kg⁻¹, o que representou cerca de 26% do P total. Segundo Cunha et al. (2007), o predomínio do P_o sobre a fração inorgânica representa mais de 80% em solos sob florestas e cerca de 65% em solos sob eucalipto (*Eucalyptus* spp.). E em plantações florestais de pinheiros o P_o contabilizou mais de 50% do P_t do solo na camada superficial de 0-20 cm e que o percentual de acumulação das formas orgânicas de P aumentava de acordo com a idade das plantações, demonstrando que a deposição de resíduos vegetais contribuía de forma significativa para a acumulação de P_o (Slazak et al., 2010), ao passo que a remoção dos resíduos vegetais em florestas tropicais reduziu o percentual de acumulação de P_o total no solo (Vincent et al., 2010).

2.2. Extração sequencial de P do solo

Metodologias de extração sequencial do P do solo foram adotadas ao longo do tempo visando quantificar os diversos compartimentos (*pools*) através da adoção de extratores em acordo com o grau de força de ligação entre P e os componentes do solo (Condrón e Newman, 2011), com diferentes protocolos adotados que promoveram alterações ao longo do tempo. Portanto, a busca por uma metodologia que quantifique de forma precisa o P presente no solo é um desafio, tendo em vista que não há um protocolo de fracionamento que possa descrever de forma precisa todas as interações entre diferentes solos e coberturas vegetais (Gatiboni et al., 2013).

Revisões publicadas ao longo dos anos descrevem fracionamentos para P em solos e sedimentos nos mais diversos ecossistemas (Negassa e Leinweber, 2009; Condrón e Newman, 2011). Entre eles está o fracionamento de P do solo proposto por Bowman e Cole (1978), onde a sua principal vantagem é a quantificação de frações lábeis de P_o , frações moderadamente lábeis que estão associadas a ácidos fúlvicos e frações mais resistentes de P ligado aos ácidos húmicos. Entretanto, o fracionamento mais difundido e utilizado é o esquema de Hedley et al. (1982) (Figura 1), onde foi desenvolvido um método de extração sequencial de P do solo capaz de distinguir as frações lábeis das não-lábeis, identificar as frações estáveis e separar as frações orgânicas das inorgânicas, em ordem decrescente de disponibilidade à biomassa microbiana e às plantas.

O grande diferencial deste esquema de extração de P está no fato de conseguir identificar que o P_o extraído por bicarbonato ($NaHCO_3$), que após a digestão do extrato resultante, o P presente pode ser identificado como um P facilmente mineralizável e disponível às plantas e aos microrganismos, enquanto o P_o extraído por NaOH e o P_o resultante da aplicação do ultrassom, por estarem física e quimicamente protegidos no solo, como formas moderadamente lábeis e oclusas, respectivamente. Essa metodologia ainda pode adotar a resina trocadora de ânions (RTA) na fase inicial da extração de P do solo, que por sua vez reproduz de forma semelhante o processo de absorção do P-solução utilizado pela cobertura vegetal (Silva & Raij, 1999).

Segundo Cross e Schlesinger (1995), o método mais efetivo no estudo do ciclo biogeoquímico do P do solo em ecossistemas naturais é o fracionamento de Hedley

et al. (1982), e o que consegue descrever de forma precisa as transformações de P ao longo do desenvolvimento do solo de acordo com os processos biológicos na dinâmica dos *pools* de P que contribuem para a ciclagem de P (Tiessen e Moir, 2007). Portanto, o fracionamento sequencial é uma ferramenta adequada para avaliar o ciclo de P quanto ao uso da terra em conjunto com as diferentes classes de solos e manejo de agrossistemas temperados, subtropicais e tropicais (Negassa e Leinweber, 2009).

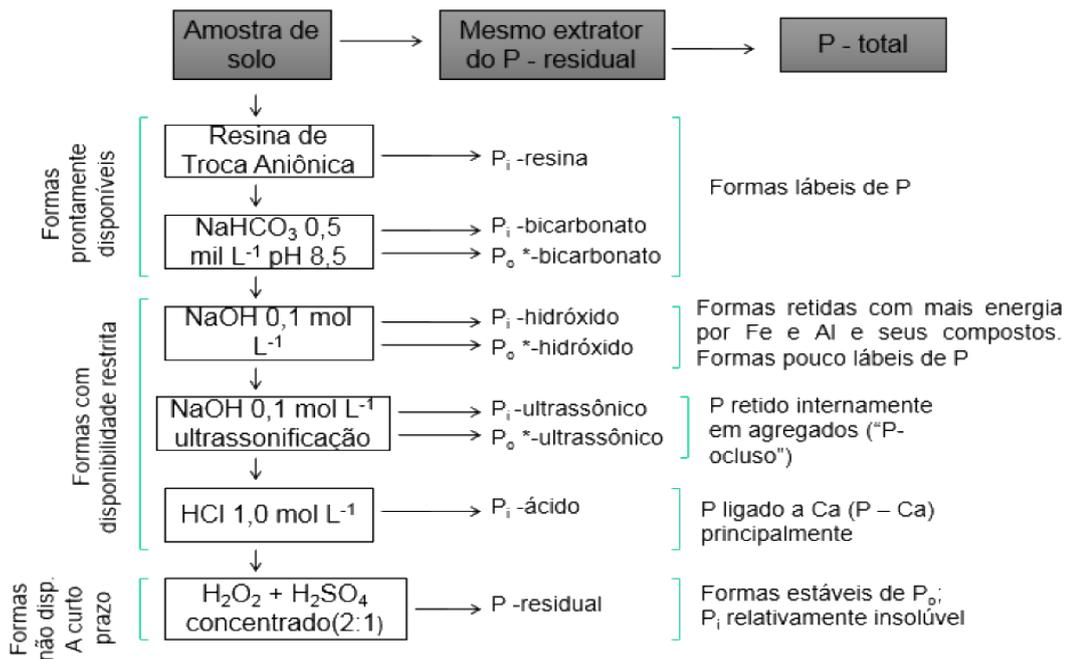


Figura 1 Esquema de fracionamento sequencial de P do solo proposto por Hedley et al. (1982) modificado.

As transformações que o P sofre no solo é um dos pontos centrais do manejo de agrossistemas e importante para manter a produtividade de alimentos no mundo (Oberson et al., 2011). Diversos estudos foram realizados ao longo dos anos visando quantificar os estoques de P em sistemas agroflorestais tropicais. Szott e Melendez (2001), comparando a disponibilidade de fósforo, após extração sequencial, sob cultivos anuais fertilizados, não fertilizados e sistemas agroflorestais multi-estratificados, concluíram que a disponibilidade de P nas culturas era menor em sistemas de plantio não fertilizados e superiores em agroflorestas, entretanto, a disponibilidade de P em sistemas fertilizados foi superior a agroflorestas pelo acúmulo de P_i .

A metodologia de fracionamento de P pode, ainda, avaliar os *pools* de P no solo, que podem estar sendo supridos com base na translocação de nutrientes via serapilheira de agroflorestas, bem como se a incorporação de P_o nos *pools* lábeis diminuirá a fixação em frações menos lábeis aumentando a disponibilidade de nutrientes (Lehmann et al., 2001). Contudo, poucos são os trabalhos que utilizam fracionamento de P em agrossistemas e que visam o entendimento das transformações de P para aperfeiçoar o manejo desse nutriente em agroflorestas. O desenvolvimento e aplicação de novas metodologias de fracionamento e quantificação de P no solo devem ser levados em consideração no monitoramento efetivo das relações de P no solo de agroflorestas (Negassa e Leinweber, 2009).

2.3. Espectroscopia de ³¹PRMN: Conceitos

A análise das espécies de P do solo através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ³¹P (³¹P RMN) ocorre na forma de espectrometria de absorção atômica sob influência de um campo magnético que mede a absorção de radiação eletromagnética na região de radiofrequência pelos núcleos dos átomos de uma molécula (Silverstein et al., 1994), ou seja, quando se aplica um campo magnético sobre uma molécula, a nuvem de elétrons que envolvem o núcleo tende a produzir um campo magnético em oposição ao aplicado. Assim, o campo magnético dos elétrons tende a blindar o núcleo do campo externo incidente. Esta blindagem define o deslocamento químico de cada núcleo irradiado e em razão da densidade eletrônica que o cerca, e como os grupos funcionais de P possuem densidades eletrônicas características, a posição espectral do sinal também será característica (Silverstein et al., 1994).

Na Figura 2 está ilustrada a identificação dos compostos de P presentes no solo através de um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades, denominado espectro, e este apresenta a diversidade de espécies de P em amostras naturais de solo, incluindo fosfonato, ortofosfato inorgânico (*ortho*-P), ortofosfato monoéster (P-monoéster), ortofosfato diéster (P-diéster), pirofosfato e polifosfato.

A identificação dos compostos, a partir dos espectros de ³¹P RMN, ocorre através do seu deslocamento químico (δ), que é uma unidade composta pela diferença de absorção atômica em relação ao composto de referência, e que em

experimentos com o P geralmente é utilizada uma amostra padrão externa de H_3PO_4 a 85%. Segundo Cade-Menun (2005), os sinais ou picos de compostos P_i e P_o plotados nos espectros em estudos ambientais geralmente situam-se entre 25.0 e -25.0 ppm (Figura 2), incluindo: fosfonatos a 20.0 ppm; *ortho*-P entre 5.0 e 7.7 ppm; P-monoésteres entre 3.0 e 6.0 ppm; P-diésteres com os fosfolipídios e DNA entre 2.5 e -1.0 ppm; pirofosfato entre -4.0 e -5.0 ppm e por fim o polifosfato a -20 ppm.

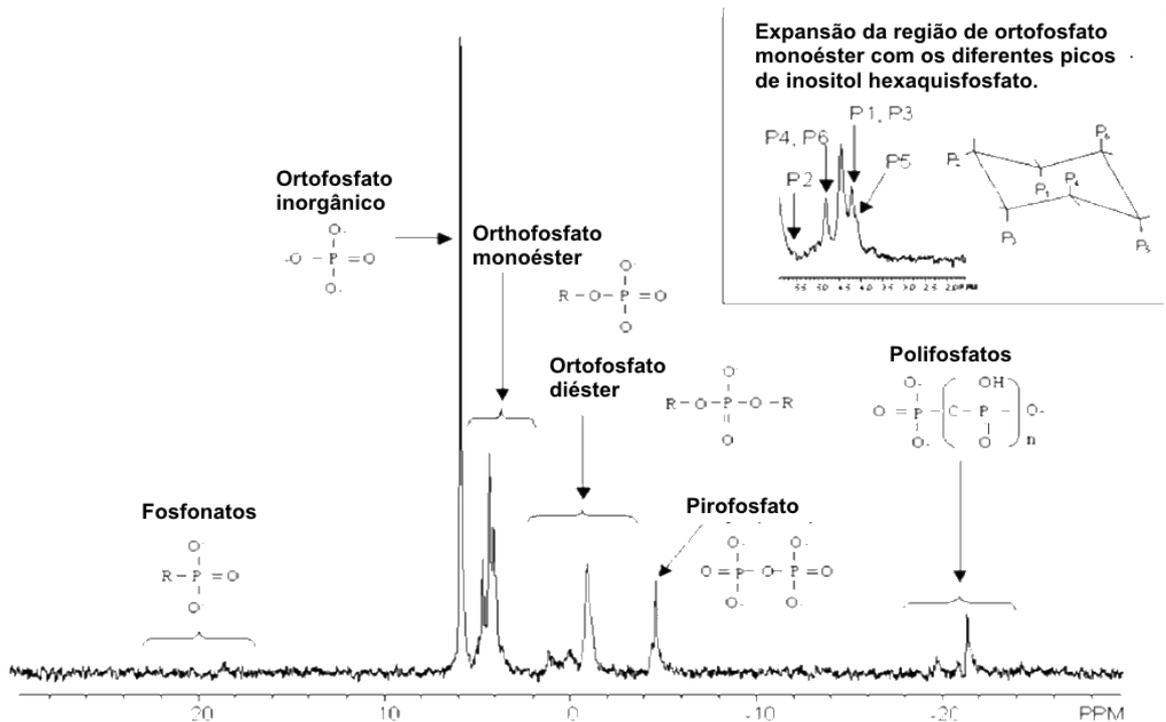


Figura 2. Espectro padrão de ^{31}P RMN para espécies de P do solo extraídas com NaOH- Na_2EDTA e gerado por espectrômetro de 500 MHz com probete de 10 mm, por pulso de 90° , tempo de aquisição 0,68 s, tempo de relaxamento 4,32 s, alargamento de linha: 7Hz. Adaptado de Cade-Menun (2005).

2.4. Espécies de P do solo via ^{31}P PRMN

A identificação e quantificação das formas de P presentes no solo tornou-se objeto de intensa pesquisa desde a primeira aplicação da técnica de espectroscopia ^{31}P PRMN por Newman e Tate (1980), permitindo identificar as espécies do P orgânico (P-monoésteres, P-diésteres, fosfonatos e polifosfatos) e inorgânico (*ortho*-P e pirofosfato) do solo (Cade-Menun, 2005; Turner et al., 2005) (Tabela 1). Das espécies presentes no *pool* P_o do solo, a maioria ainda não foi identificada, devido,

principalmente, à grande variedade de classes quimicamente funcionais (Cade-Menum, 2015).

Tabela 1. Principais espécies de P encontradas nos solos de acordo com a espectroscopia ^{31}P RMN

Grupo químico	Espécie	Exemplos	Descrição
Ortofosfatos	Ortofosfato	HPO_4^{2-} , $\text{H}_2\text{PO}_4^{4-}$	Ânions inorgânicos de ácido fosfórico. Utilizados em processos metabólicos e síntese de moléculas.
Metabólitos	Monoéster	Glicose-6-fosfato, Piruvato, ATP.	Produtos de diferentes processos metabólicos
Metabólitos	Monoéster	Inositol	Composto de P orgânico dominante em sementes de plantas e na maioria dos solos onde é fortemente estabilizado. Relativamente recalcitrante no ambiente.
Ácidos nucleicos	Diéster	DNA e RNA	Biopolímeros presentes nas células
Fosfolipídios	Diéster	Fosfatidilglicerol	Parte das membranas celulares eucarióticas e bacterianas
Ácidos Teicóicos	Diéster	Ácido teicóico glicerol	Polissacarídeos presentes nas células.
Fosfonatos	Fosfonato	Ácido fosfônico	Função biológica não é bem conhecida. Ocorre naturalmente e é encontrado em uma variedade de organismos e em solos temperados
Polifosfatos	Polifosfato orgânico	Adenosina 5'-trifosfato	Comum em sistemas biológicos. Envolvido na transferência de energia bioquímica
Pirofosfato	Pirofosfato	Pirofosfato	Composto de armazenamento constituído por dois grupos de fosfato condensado

Adaptado de Turner et al. (2005)

Um dos aspectos da grande variedade de espécies de P_o que correm nos solos está intimamente ligado à variedade de mecanismos pelos quais as plantas podem produzi-los, acessá-los e utilizá-los (Steindinger et al., 2015). As diferentes espécies de P do solo podem ser enumeradas ao longo do gradiente de custo de investimento necessário para a sua mineralização, em função da sua solubilidade e das enzimas que devem ser produzidas pela cobertura vegetal para solubilizar e mineralizar o P_o da porção mineral do solo (Turner 2008). As interações de espécies vegetais, que podem manipular o seu acesso aos compostos de P no solo, pode sugerir uma coexistência entre elas a fim de minimizar a competição pelo P do solo (Turner, 2008; Steindinger et al., 2015), ou até mesmo estimular o acúmulo de espécies de

P_o em se tratando de sistemas agroflorestais de alto *input* de P_o através da serapilheira, revelando assim um alto potencial de suprimento de P às plantas via o processo de mineralização na eventual supressão da fertilização mineral a que os sistemas produtivos estão sujeitos (Aleixo et al., 2017).

Em sua maioria, o P-monoéster (i.e., possui uma ligação éster por fosfato) representa o grupo dominante na composição do P_o , principalmente em solos alcalinos com altos teores de matéria orgânica (Turner et al., 2014). O fosfato monoéster pode ocorrer em formas de menor concentração como mononucleotídeos, fosfoproteínas e açúcares fosfatados ou até mesmo em sua forma relativamente recalcitrante de inositol fosfato (10 a 80%) que corresponde a maior parte do P-monoéster presente no solo. Esta ainda pode estar fortemente estabilizada no solo após sua fosforilação a formas como *myo*-inositol hexaquisfosfato (*myo*-IHP) e seus estereoisômeros como *D-chiro*-inositol hexaquisfosfato (*chiro*-IHP), *neo*-inositol hexaquisfosfato (*neo*-IHP) e *scyllo*-inositol hexaquisfosfato (*scyllo*-IHP) (Figura 3) (Turner et al., 2005; Doolette et al., 2010; Turner et al., 2012). A estabilização do P-monoéster no solo ocorre principalmente pela formação de complexos, relativamente insolúveis no solo, com o ferro (Fe) e o alumínio (Al), protegendo-os, assim, da degradação via mineralização microbiana (Anderson 1980), e classificando as espécies presentes no P-monoéster em moderadamente lábil de P do solo (Tate e Newman, 1982).

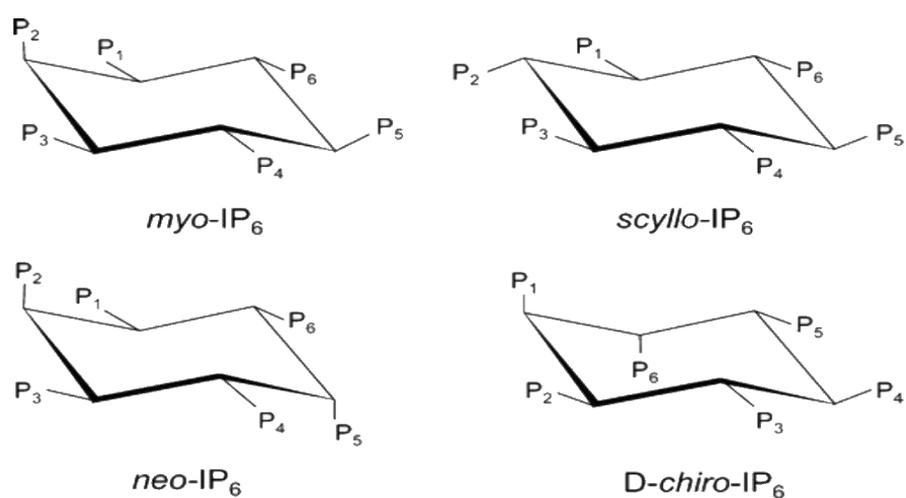


Figura 3 Estereoisômeros de inositol hexaquisfosfato encontrados em extratos de NaOH-EDTA e analisados com a ^{31}P RMN. Adaptado de Turner et al. (2012)

Uma segunda classe de compostos fosfatados denominados P-diéster (i.e., possui duas ligações éster por fosfato) podem estar presentes em solos tropicais. Os ácidos nucleicos (DNA e RNA), fosfolipídios e ácidos teicóico são os mais comumente encontrados nessa classe funcional, constituindo menos de 10% do fósforo total orgânico (Turner et al., 2003; Condrón et al., 2005), estes são atribuídos ao *pool* lábil de P_o possivelmente pela sua menor energia de adsorção aos colóides do solo. A menor estabilidade de P-diéster no solo foi verificada por Taranto et al. (2000), através da aplicação de P-diéster em colunas de solo que foi comparada em conjunto com o P-monoéster através do tempo. Os resultados demonstraram que a adição de P-monoéster incrementou o *pool* orgânico de P, já a adição de P diéster além de contribuir para o *pool* lábil de P_o , incrementou o P_i lábil e P_i moderadamente lábil. Entretanto, solos com ausência de manejo e uso da terra com fins agrícolas, como solos florestais, podem possuir maiores proporções de P-diéster como resultado do tempo de estabilidade desses ecossistemas naturais (Turner e Engelbrecht, 2011).

2.5. Solução extratora para ^{31}P RMN

Segundo Cade-Menun e Liu (2014), a técnica de espectroscopia ^{31}P PRMN requer amostras líquidas a partir de um extrator ideal que remova formas mais complexas de P_i e P_o , e que minimize as interferências a partir da degradação das formas de P presentes na amostra. A solução é a mais amplamente utilizada para identificar a especiação do P_o , entretanto, a análise de ^{31}P RMN pode também ser realizada através de amostras sólidas que, por sua vez, podem apresentar problemas quanto à sensibilidade de aparelhos, quantificação e preparação das amostras de solo, além da aquisição e resolução de espectros, com identificação apenas de formas inorgânicas de P (Doolette et al., 2011a).

A solução de extração mais comumente utilizada é a de matriz alcalina de NaOH, pois a solubilidade as espécies dos *pools* de P são maximizadas em pH elevado (Tate e Newman, 1982; Hawkes et al., 1984). Entretanto, uma solução extratora que contenha somente NaOH não é capaz de quebrar as fortes ligações que o P possui com os complexos catiônicos de Fe e Al do solo. Assim, Bowman e Moir (1993) estabeleceram inclusão de Na_2EDTA (etilenodiaminatetraacetato) na solução extratora alcalina, que ampliou o percentual de recuperação de P do solo e

aumentou assim a eficiência da técnica extratora. Apesar da eficiência na recuperação de P do solo pelo complexo extrator NaOH-Na₂EDTA ser uma constatação, a natureza do solo (i.e., manejo, uso da terra e pedogênese) pode influenciar no percentual de recuperação das espécies de P (Turner et al., 2005) e, por consequência, influenciar a tomada de decisão quanto à solução extratora.

Comparando a eficiência de extração com a matriz alcalina de NaOH e a solução do complexo NaOH-Na₂EDTA em solos de natureza diversas, nota-se a maior eficiência do NaOH-Na₂EDTA na recuperação de espécies de P em relação ao seu total para solos tropicais (~37%) com relação à solução de NaOH (~27%) (Turner, 2008). Recentemente, em substituição a adição de Na₂EDTA na solução extratora de matriz alcalina, Briceño et al. (2006) e Redel et al. (2011) conduziram experimentos com a adição de HCl seguida de NaOH e logo após uma resina de troca catiônica Chelex (resina quelante) como solução extratora de P do solo para ³¹PRMN. Os resultados demonstraram que houve maior recuperação nas concentrações de P do solo com a resina trocadora de ânions, entretanto, somente Briceño et al. (2006) durante a condução do experimento realizou testes comparativos à solução de NaOH-Na₂EDTA, havendo mais etapas de extração com a solução de NaOH e somente uma no experimento com NaOH-Na₂EDTA, colocando, assim, em dúvida os resultados com o complexo HCl-NaOH-Chelex (Cade-Menun e Liu, 2014).

Assumindo que a solução extratora com o complexo NaOH-Na₂EDTA seja a mais amplamente utilizada (Cade-Menun e Liu, 2014), diversos procedimentos com diferentes protocolos de extração foram postulados na busca do aperfeiçoamento da técnica de ³¹P RMN, em sua maior parte visando à diminuição da interferência das formas inorgânicas de P no espectro, ou até mesmo, quanto à isolação de determinada espécie de Po. A inserção de uma resina trocadora de ânions (RTA) saturada com NaHCO₃ nos extratos de NaOH-Na₂EDTA do solo pode capturar o *ortho*-P da solução minimizando, assim, o ruído no sinal do espectro (Turrion et al., 2010; Cheesman et al., 2010a, b), ou até mesmo a adição de uma solução extratora com NaHCO₃ ao solo antes da extração com NaOH-Na₂EDTA (He et al., 2008). Contudo, em alguns experimentos poderá haver a subestimação do P_o total, já que a conformação química tanto dos P-monoésteres quanto P-diésteres favorecem a adsorção pela solução de NaHCO₃ (Cheesman et al., 2010c).

Em análise a procedimentos pós-extração do P do solo, diferentes técnicas para a retirada de materiais sólidos do extrato possuem relevância para o sucesso da identificação de espécies de P através da espectroscopia ^{31}P RMN. Como a centrifugação de amostras em diferentes tempos de uso e aplicação força, a utilização de filtros de papel Whatman (Doolette et al., 2011a; Ohno et al., 2011) e filtros de membrana (Lehmann et al. 2005; Backnäs et al. 2012) com diferentes graus de seleção de solutos ou até mesmo a utilização de colunas de diálise com seletividade a ortofosfatos a fim de concentrar espécies orgânicas de P (Lehmann et al., 2005; Bol et al., 2006).

Por outro lado, a degradação de formas mais complexas de P em espécies menos complexas pode ocorrer após o procedimento de extração com NaOH- Na_2EDTA e interferir na sensibilidade da aquisição dos resultados com a espectroscopia ^{31}P RMN, como uma parcela do *pool* P_o podendo ser degradado via hidrólise para compostos mais simples, principalmente o P-diéster (Doolette et al., 2011a). Segundo Makarov et al. (2002), certas espécies de P-diéster como o RNA podem sofrer hidrólise passando a P-monoéster após completa degradação em 24 horas, ao passo que outras espécies de P-diéster, como o DNA, possuem maior resistência à hidrólise (Turner et al., 2003). Com a finalidade de evitar a degradação dos compostos presentes no extrato de NaOH- Na_2EDTA tornou-se amplamente utilizado o congelamento do extrato com Azoto líquido a -196°C e, em seguida, a liofilização (Cade-Menun e Liu, 2014). Contudo, sem uma devida padronização dos métodos de extração, a comparação entre os resultados de diferentes estudos fica prejudicada, assim como o desempenho de diferentes extratores e as condições de extração recomendadas a fim de aperfeiçoar a metodologia de ^{31}P RMN (Cade-Menun, 2005; Turner et al., 2005; Cade-Menun e Liu, 2014).

2.6. Parâmetros experimentais da solução de ^{31}P RMN

A análise das espécies de P do solo por espectroscopia ^{31}P RMN apresenta diferentes marchas analíticas com também diferentes parâmetros de ajuste do espectrofotômetro de ^{31}P RMN. Por exemplo, os extratos de NaOH- Na_2EDTA liofilizados devem ser dissolvidos antes da análise de ^{31}P RMN. O óxido de deutério (D_2O) é o solvente mais amplamente utilizado como *lock* no espectrômetro em trabalhos publicados a partir do ano de 2005 (Cade-Menun e Liu, 2014), entretanto

diversos autores conduziram experimentos onde o extrato liofilizado foi dissolvido não somente com D₂O, mas com uma combinação de soluções diversas (i.e., NaOD; D₂O + NaOH; D₂O + NaOH-EDTA). Ainda, com a finalidade de maximizar a concentração de P nos tubos de RMN e assim ampliar os sinais das espécies de P no espectro, os extratos são geralmente concentrados antes da análise de ³¹P RMN (Shafqat et al., 2009; Vestergren et al., 2012), mas segundo Cade-Menun e Liu (2014) a solubilização dos extratos liofilizados em solventes, como NaOH ou NaOH-Na₂EDTA podem causar a formação de finos agregados que aumentam a linha de alargamento dos sinais no espectro de ³¹P RMN, e recomendada à centrifugação ou filtragem das amostras preparadas antes da análise.

Em se tratando de trabalhos com fins ambientais, como amostragem das formas e espécies de P em solos tropicais com elevado grau de intemperismo, a faixa de interesse no espectro gerado pela espectroscopia de ³¹P RMN está entre -25.0 e 25.0 ppm de P (Cade-Menun, 2005). Para gerar os espectros são utilizados espectrômetros de 500 MHz com ajuste de 202.4 MHz. (Cade-Menun, 2005; Turner e Engelbrecht, 2011). O tempo de aquisição é período pelo qual os dados serão registados após o pulso de radiofrequência (RF), e variam de acordo com o tipo de solo analisado, são determinados pela largura espectral e o número de pontos de dados no espectro, os tempos de aquisição podem variar de 0.1 s (Lehmann et al., 2005) a 1.31 s (McDowell et al., 2007b). Contudo, em se tratando de solos tropicais, Turner e Engelbrecht (2011) adotaram o valor de 0.4 s para o tempo de aquisição. Diferentes espécies de P do solo apresentam diferentes tempos de relaxamento, e este é o tempo necessário para permitir que os núcleos excitados de P voltem ao equilíbrio após os pulsos RF; autores como Turner e Blackwell (2013) sugerem que o tempo de relaxamento deve ser fixado em 2.0 s por ser o mais adequado para a maioria das amostras de solos, principalmente para solos tropicais (Turner e Engelbrecht, 2011).

O período em que o pulso RF excita os núcleos normalmente é expresso em termos de ângulos de pulso, geralmente variam entre 30° e 90°. Os ângulos de pulso mais curtos são utilizados para diminuir o *delay time* entre os pulsos quando os núcleos dos átomos de P não são totalmente excitados, assim eles terão um menor tempo para voltar ao equilíbrio (Cade-Menun et al., 2002). O número de *scans* que determinada amostra de solo deve sofrer é determinado através da adequada resolução espectral, ou seja, é uma sequência de *scans* que é repetida um grande

número de vezes para aumentar a intensidade do sinal (Cade-Menun, 2005). O tempo necessário para cada bateria de *scans* também depende da concentração de P na sonda do espectrofotômetro de ^{31}P RMN e do diâmetro do tubo utilizado (Cade-Menun et al., 2002). Em geral, o número de *scans* em amostras de P nos solos varia entre 528 (Bünemann et al., 2008) a 240,000 *scans* (Bourke et al., 2008).

2.7. Justificativa para o uso da espectroscopia de ^{31}P RMN

Métodos químicos, como a extração sequencial de P do solo, são importantes ferramentas utilizadas nos últimos 50 anos para identificar a dinâmica dos *pools* inorgânicos de P (P_i) e orgânico (P_o) do solo com base na solubilidade de P em diferentes extratores (Condrón e Newman, 2011), entretanto não oferecem informações sobre a estrutura dos diferentes compostos químicos de P_i e P_o presentes no solo (Negassa e Leinweber, 2009; Condrón e Newman, 2011). As atuais metodologias de fracionamento sequencial de P podem estar sujeitas a limitações quanto à quantificação das concentrações de P, seja por métodos colorimétricos que não representam uma digestão completa das formas P_i , seja por não quantificar diretamente as frações do *pool* P_o que são obtidas pela diferença entre a fração P_i e o seu total após digestão (Cade-Menun e Liu, 2014). Ainda, a superestimação das frações P_o pode ocorrer pela adição de formas mais complexas de P_i (i.e., polifosfatos e pirofosfato) que não interagiram com o reagente colorimétrico durante a quantificação das frações P_i das etapas anteriores do fracionamento, ou seja, somente com a classe funcional do *ortho*-P (H_2PO_4^- e HPO_4^{2-}) durante o fracionamento (Condrón e Newman, 2011).

A superestimação de formas inorgânicas ao *pool* P_o na concentração final após análise dos extratos pode ainda ocorrer quando uma parcela da concentração de *ortho*-P, presente nos coloides do solo, não reage completamente com o molibdato de amônio durante a sua complexação antes da determinação colorimétrica, sendo uma das causas da interferência de espécies de P pouco estudadas em ecossistemas terrestres como ligadas a sulfatos, nitratos, nitritos e até mesmo complexos arsênicos e silicatados, comumente encontrados em ecossistemas aquáticos (Turner et al., 2006). Em contrapartida, a concentração de P em formas inorgânicas, com cadeias quimicamente menos complexas como o *ortho*-P, podem sofrer *inputs* a partir da degradação de espécies quimicamente mais

complexas de polifosfatos inorgânicos e/ou orgânicos. Essa transformação ocorre principalmente pela necessidade de pH ácido durante a análise colorimétrica do fracionamento sequencial (Monaghan e Ruttenberg, 1999). A especiação das classes de P_i e P_o abrangem uma enorme variedade de formas químicas e processos, pelas quais, ocorrem as transformações de P do solo e que ainda poucos são estudados em solos temperados e, menos ainda, em solos tropicais (Cade-Menum e Liu, 2014).

A utilização da espectroscopia de ^{31}P RMN em detrimento das técnicas clássicas de fracionamento de P solo encontra justificativa na observação das proporções relativas de classes funcionais de P, especialmente do P_o , com respeito às propriedades do solo, clima ou distúrbios em ciclos biogeoquímicos de ecossistemas naturais, florestas e na agricultura (Cade-Menum, 2005; Turner et al., 2005). Em se tratando de sistemas agroflorestais e florestais, Lehman et al. (2001), Szott and Melendez (2001) e Cardoso et al. (2003) relataram que as condições de solo e clima, a composição e o arranjo das espécies aliado às práticas de manejo (i.e., fertilização de P_i) afetam a distribuição das frações de P no solo e, portanto, a capacidade de produção do agrossistema a curto, médio e longo prazo.

Estes sistemas de produção possuem elevada capacidade de absorção e reciclagem de nutrientes além de alto *input* de resíduos vegetais via serapilheira que tem um papel fundamental na manutenção de estoques dos nutrientes em solos tropicais de baixa fertilidade natural (Fontes et al., 2014). Entretanto, segundo Aleixo et al. (2017), estudos futuros são necessários sobre o ciclo de P do solo a fim de atribuir a magnitude da contribuição do P_o como fonte de P em diferentes níveis de *input* de fosfato, de forma a estabelecer estratégias de manejo que aumente a eficiência dos *inputs* de P_i sobre o *pool* P_o , considerando assim os diversos tipos de solos e a influência dos diferentes tipos de agroflorestas (coberturas vegetais) existentes em solos tropicais, possivelmente com a utilização da espectroscopia ^{31}P RMN.

Contudo uma ampla gama de estudos publicados a partir de 2005 com ^{31}P RMN possui foco em solos temperados com baixo grau de intemperismo, ~73% do total dos trabalhos realizados (Cade-Menum e Liu, 2014; Cade-Menum 2017), muito distante da realidade dos ecossistemas tropicais que possuímos no Brasil; e em se tratando de uso da terra poucos são os trabalhos com as espécies de P em agroflorestas ou até mesmo a influência dos diferentes graus de intemperismo do

solo sobre os *pools* de P do solo (~9%); e apenas três estudos tiveram como objetivo solos de uma floresta tropical (Turner, 2008; Vincent et al, 2010; Turner e Engelbrecht, 2011).

2.8. Sistemas agroflorestais

Um sistema agroflorestal caracteriza-se por ser um sistema de produção composto por duas ou mais espécies, sendo que ao menos uma lenhosa e perene, entretanto, as espécies florestais utilizadas não precisam ter utilidade madeireira, mas possuir interações ecológicas, bem como econômicas, entre as espécies lenhosas e não lenhosas no sistema (Young, 1989). O caráter econômico de uma agrofloresta de cacau está em consonância com a venda do seu produto (sementes), com uma possível reposição dos nutrientes do solo através da translocação de nutrientes da serapilheira decomposta, minimizando, assim, maiores gastos com adubação e uma possível extração sustentável da madeira de espécies arbóreas de interesse econômico, o que corroboraria a definição de uma agrofloresta feita por Young (1989).

A cultura do cacau (*Theobroma cacao* L.), segundo Müller et al. (2003), torna-se um modelo próximo ao ideal de um sistema agroflorestal sustentável por possuir um caráter socioambiental que leva em consideração a preservação de fragmentos florestais, matas ciliares, nascentes de mananciais e a redução da degradação dos solos por processos erosivos, bem como da conscientização e instrução do homem do campo acerca da produção de cacau e preservação do meio ambiente, além da geração permanente de empregos. A cultura do cacau é uma das principais *commodities* agrícolas em muitos países na região tropical (Hartemink 2005). O Brasil responde por cerca de 5% da produção global de sementes de cacau; do qual a principal região produtora é o sul do estado da Bahia situada no domínio do bioma Mata Atlântica (Fontes et al., 2014).

Müller e Gama-Rodrigues (2012) descrevem existência de três sistemas de agroflorestas de cacau: O cacau cabruca, onde os cacauzeiros são cultivados sob a mata atlântica raleada, cuja produtividade torna a atividade pouco rentável, porém ecologicamente sustentável. O sistema de produção de *Theobroma cacao* L. em consórcio com seringueira (*Hevea brasiliensis*), onde temos a derrubada inicial da floresta nativa passando pelo plantio de seringueiras e posterior adequação das

mudas de cacau nas entrelinhas de seringueiras adultas, nesse sistema de SAF podem-se ter dois produtos de interesse econômico como o látex da seringueira e a semente de cacau. O terceiro modelo de agrofloresta é composto pelo consórcio de *Theobroma cacao* L. com eritrina (*Erythrina* spp.) que, semelhantemente, a implantação do consórcio cacau com seringueira inicia-se com a retirada das espécies vegetais nativas para o plantio de mudas de cacau sob sombreamento de cultivares de interesse alimentício como mandioca, milho e banana até que as mudas de eritrina possam fornecer um sombreamento eficiente à cultura do cacau.

As agroflorestas podem simular ou até mesmo equiparar-se a ecossistemas naturais em sua estrutura funcional, conservação de espécies e meio ambiente (Melo et al., 2001). Do ponto de vista da conservação de solos podem controlar a erosão pelo menor revolvimento do solo e manter a matéria orgânica do solo com um maior grau de agregação, além de promover uma eficiente ciclagem de nutrientes (Young, 1989). Assim, a interação desses fatores contribuirá para a melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas do solo (Syers e Craswel, 1995), dando origem a um solo mais produtivo de fertilidade elevada. A fertilidade pode ser descrita como a capacidade do solo em ceder elementos essenciais às plantas (Novais et al., 2007). Dessa forma, a implantação de uma agrofloresta torna-se útil por possuir certa eficácia em utilizar recursos escassos como fósforo em solos tropicais de baixa fertilidade natural e altas concentrações de alumínio trocável (Kanmegne et al., 1999; Radersma, 2002).

Pesquisas recentes, conduzidas em diferentes agroflorestas de cacau sob diferentes condições climáticas e uso da terra no Brasil, mostraram que esses agrossistemas possuem uma ampla capacidade de absorção e reciclagem de nutrientes (Fontes et al., 2014), com uma elevada acumulação de matéria orgânica no solo (Rita et al., 2011; Monroe et al., 2016), e elevados estoques de P_o no solo determinado por diferentes métodos de extração sequencial (Zaia et al., 2012; Aleixo et al., 2017). Ainda, o acúmulo significativo de serapilheira em agroflorestas de cacau e leguminosas florestais como a *Erythrina* spp. pode vir a dispensar a adubação fosfatada e nitrogenada em determinados períodos (Hagggar et al., 2011). Esse elevado estoque de P_o no solo pode ser relevante em suprir adequadamente a quantidade de P exportada através da colheita das sementes de cacau e diminuir, assim, a dependência das agroflorestas de cacau pela fertilização inorgânica fosfatada anual (Zaia et al., 2012).

3. TRABALHOS

3.1. ESPECIAÇÃO DO FÓSFORO ORGÂNICO DO SOLO EM AGROFLORESTAS DE CACAU NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA NO BRASIL

RESUMO

Há pouco conhecimento sobre as espécies de fósforo (P) em solos fortemente intemperizados sob agroflorestas em regiões tropicais. A especiação de fósforo orgânico do solo foi determinada em diferentes sistemas agrofloretais de cacau (*Theobroma cacao* L.) com idade variável e baixo *input* de fertilizante fosfatado na região da Mata Atlântica no Brasil. Para tanto, utilizou-se a extração de NaOH-EDTA e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (^{31}P RMN). As agroflorestas de cacau estudadas foram as seguintes: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau + eritrina, 35 anos; (4) cacau + seringueira, 3 anos; (5) cacau + seringueira, 40 anos; (6) cacau + seringueiras em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau + seringueiras em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada. Uma pastagem não fertilizada com ausência de pastoreio (8) e uma floresta natural (9) foram utilizadas como sistemas de referência. O fósforo total extraído em NaOH-

EDTA e determinado pela solução de espectroscopia de ^{31}P RMN (Total ^{31}P RMN) variou entre 166 e 1.160 mg kg^{-1} (representando 26 a 81% do P total do solo), dos quais $57,4 \pm 4,3 \text{ mg kg}^{-1}$ foram identificados como P orgânico. A maior parcela do P orgânico foi encontrada na forma de ortofosfato monoéster (P-monoéster) nas agroflorestas de cacau (variando entre 26,4 e 63,2 mg kg^{-1}), pastagem (60,2 mg kg^{-1}) e floresta natural (33,5 mg kg^{-1}). As concentrações de DNA variaram entre 4 e 26,2 mg kg^{-1} nas agroflorestas de cacau, 13,9 mg kg^{-1} no pasto e 16 mg kg^{-1} na floresta natural. A recente conversão de floresta natural ou pastagem em agroflorestas de cacau levou a uma diminuição da concentração de DNA. Além disso, o DNA foi correlacionado positivamente com carbono orgânico do solo (COS), N total e argila. A maioria do P inorgânico encontrada foi identificada como ortofosfato inorgânico (variando entre 108 e 1.091 mg kg^{-1}) e pirofosfato (variando entre 6,2 e 28,6 mg kg^{-1}). Não foram detectados fosfonatos, polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa em todos os sítios avaliados. As altas concentrações de pirofosfato encontradas em todas as agroflorestas de cacau mostraram uma elevada ciclagem e acumulação de P através de micro-organismos do solo. Não detectamos fosfonatos, polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa em todos os sítios analisados. As altas concentrações e proporções relativas de espécies orgânicas de P e pirofosfato revelaram o alto potencial de fornecimento de P às plantas em caso de supressão da adubação fosfatada em solos fortemente intemperizados sob sistemas agroflorestais de cacau.

Palavras-chave: solos tropicais; sistemas agroflorestais; fósforo orgânico, ortofosfato diéster; ortofosfato monoéster; solução de espectroscopia de ^{31}P RMN

ABSTRACT

SOIL ORGANIC PHOSPHORUS SPECIATION OF CACAO AGROFORESTS IN
THE ATLANTIC FOREST REGION OF BRAZIL

There is little knowledge about phosphorus (P) species in strongly weathered soils of agroforests in tropical regions. The soil organic P speciation was determined in different cacao (*Theobroma cacao* L.) agroforestry systems varying in age and low-input phosphate fertilizer in the Atlantic Forest region of Brazil. For this purpose, NaOH-EDTA extraction and solution ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{31}P NMR) were used. The cacao agroforests studied were the following: (1) open cacao-cabruca, 40 years; (2) close cacao-cabruca, 40 years; (3) cacao + erythrina, 35 years; (4) cacao + rubber tree mixed, 3 years; (5) cacao + rubber tree mixed, 40 years; (6) cacao + rubber tree intercropping, 4 years after replacing a natural forest; (7) cacao + rubber tree intercropping, 4 years after replacing an unfertilized pasture. An unfertilized pasture without grazing and a natural forest were used as reference systems. Total P extracted in NaOH-EDTA and determined by solution ^{31}P NMR spectroscopy (Total $^{31}\text{P}_{\text{NMR}}$) ranged between 166 and 1,160 mg kg^{-1} (representing 26 to 82% of the total soil P), of which $54.7 \pm 4.3 \text{ mg kg}^{-1}$ was identified as organic P. A large portion of the total soil organic P consisted of orthophosphate monoester (P-monoester) in the cacao agroforests (ranging between 26.4 and 63.2 mg kg^{-1}), pasture (60.2 mg kg^{-1}) and natural forest (33.5 mg kg^{-1}). DNA concentrations ranged between 4 and 26.2 mg kg^{-1} in the cacao agroforests, 13.9 mg kg^{-1} in pasture and 16 mg kg^{-1} in natural forest. The recent conversion of natural forest and pasture to cacao agroforests led to a decrease in DNA concentration. Furthermore, DNA was correlated positively with soil organic carbon, total N and clay. Soil inorganic P was detected as inorganic orthophosphate (ranging between 108 and 1,091 mg kg^{-1}) and pyrophosphate (ranging between 6.2 and 28.6 mg kg^{-1}). We did not detect

phosphonates, long chain organic and/or inorganic polyphosphates in all evaluated sites. The distribution of P species in soil varied according to different management practices (P fertilization, tree species and tree density) and stability time (different ages) of the cacao agroforests with low-input phosphate fertilizer. The high concentrations and relative proportions of organic P and pyrophosphate species revealed the high potential of P supply to plants in case of suppression of the phosphate fertilization in strongly weathered soils under cacao agroforestry systems.

Keywords: tropical soils; agroforestry systems; organic phosphorus; orthophosphate monoesters; orthophosphate diesters; solution ^{31}P NMR spectroscopy

INTRODUÇÃO

Em solos tropicais fortemente intemperizados, a baixa disponibilidade de fósforo (P) é um dos principais fatores nutricionais que limitam a produtividade primária de florestas naturais e agroflorestas (Reed et al., 2011). As plantas absorvem P da solução do solo apenas na forma de ortofosfato inorgânico ($\text{P}_i = \text{H}_2\text{PO}_4^-$ ou HPO_4^{2-}) e, conseqüentemente, respondem a mudanças na disponibilidade em momentos de escassez de P no solo. Nesse sentido, o P orgânico do solo (P_o) torna-se um importante reservatório de reserva em solos tropicais com capacidade de suprir P à cobertura vegetal por processos biogeoquímicos de mineralização. Além disso, as condições ambientais (e.g., solo e clima), disposição das plantas e práticas de manejo (e.g., fertilização inorgânica) nas florestas e sistemas agroflorestais tropicais podem afetar diretamente a distribuição e a labilidade nesses solos e, portanto, a capacidade de produção do agroecossistema a médio e longo prazo (Costa et al., 2016; Aleixo et al., 2017). Assim, entender a especiação de P em solos é relevante para o desenvolvimento de estratégias de manejo do solo para aumentar a biodisponibilidade de P em sistemas agroflorestais de baixo consumo.

O método de extração sequencial P desenvolvido por Hedley et al. (1982) é utilizado em uma ampla gama de estudos sobre a dinâmica P em diferentes ordens de solo e usos da terra, tanto em ecossistemas temperados quanto tropicais (Negassa e Leinweber, 2009; Condon e Newman, 2011). A extração sequencial

permite caracterizar diferentes frações de P_i e P_o em uma escala de variação de solubilidade com base nas alterações de diferentes níveis de pH e força extratora, em ordem decrescente de labilidade no solo (Hedley et al. 1982). Contudo, a informação do comportamento biogeoquímico do P é limitada porque não dá a especiação de P nas diferentes frações de P extraído (Negassa e Leinweber, 2009). Nesse sentido, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P (^{31}P RMN), após a extração com NaOH-EDTA, possibilita a determinação e a natureza química das espécies de P nos solos (Cade-Menum, 2017). As formas de P orgânico no solo são geralmente agrupadas de acordo com o número de grupos de fosfato ligados ao carbono e, em alguns compostos orgânicos um grande número de grupos fosfato, podem estar agrupados (Condon et al., 2005; Turner et al., 2005). Assim, os ésteres de ortofosfato são subgrupados de acordo com o número de ligações éster. As classes quimicamente funcionais de P_o identificadas com a ^{31}P RMN são os ortofosfatos monoésteres (P-monoéster) (i.e., possui uma ligação éster por fosfato), e representam o grupo dominante na composição do P_o do solo. As espécies de P-monoéster normalmente determinadas são o *myo*-inositol hexaquisfosfato (*myo*-IHP) e seus estereoisômeros como *D-chiro*-inositol hexaquisfosfato (*chiro*-IHP), *neo*-inositol hexaquisfosfato (*neo*-IHP) e *scyllo*-inositol hexaquisfosfato (*scyllo*-IHP) (Turner et al., 2012). Os ortofosfatos diésteres (P-diéster) (i.e., possuem duas ligações éster por fosfato) é outro grupo de P_o encontrado no solo e constituem a maior porção do P_o lábil. O ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e fosfolipídios são as formas mais abundantes de P-diéster. Outras formas de P, tais como o ortofosfato inorgânico (*ortho*-P), fosfonatos (i.e., grupo de compostos químicos que possuem ligação direta entre fósforo-carbono), pirofosfato, polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa podem, também, ser determinados por ^{31}P RMN (Jarosch et al., 2015).

Em solos tropicais, há poucos estudos com ^{31}P RMN em sistemas florestais (Turner 2008a; Vicent et al., 2010; Turner e Engelbrecht, 2011) e em agroflorestas multiestratadas (Cardoso et al., 2003), mas nenhum especificamente em solos sob agroflorestas de cacau (*Theobroma cacao* L.). A cultura do cacau é uma das principais *commodities* agrícolas em muitos países na região tropical (Hartemink, 2005). O Brasil responde por cerca de 5% da produção global de sementes de cacau (Middlej e Santos, 2012), tendo como principal região produtora o sul do estado da Bahia, situada no domínio do bioma Mata Atlântica (Fontes et al., 2014). No Brasil

existem dois sistemas de produção de cacau característicos, o primeiro é o cacau sombreado tradicionalmente pela floresta natural (cacau-cabruca), o segundo é caracterizado pelo cacau sombreado em conjunto com plantações de *Erythrina* spp. (cacau + eritrina). Entretanto, como alternativa de uso da terra, outros sistemas agroflorestais de cacau têm sido introduzidos sem substituição à eritrina como árvore de sombra, entre eles a adoção da seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) a fim de diversificar e aumentar a renda agrícola dos fazendeiros.

Pesquisas recentes conduzidas em diferentes agroflorestas de cacau sob diferentes condições climáticas e uso da terra no Brasil, mostraram que esses agrossistemas possuem uma ampla capacidade de absorção e reciclagem de nutrientes (Fontes et al., 2014), com uma elevada acumulação de matéria orgânica no solo (Rita et al., 2011; Monroe et al., 2016), e elevados estoques de P_o no solo determinado por diferentes métodos de extração sequencial (Zaia et al., 2012; Aleixo et al., 2017). Esse elevado estoque de P_o no solo pode ser relevante em suprir adequadamente a quantidade de P exportada através da colheita das sementes de cacau e diminuir, assim, a dependência das agroflorestas de cacau pela fertilização inorgânica fosfatada anual (Zaia et al., 2012). Entretanto, as conclusões baseadas nos métodos de extração sequencial não fornecem informações detalhadas sobre os diferentes compostos químicos que compõem o *pool* P_o , assim como a sua dinâmica no solo para sustentar a produção vegetal desses ecossistemas. Neste contexto, há a necessidade de identificar e quantificar as espécies de P presentes em solos sob agroflorestas de cacau para melhor entender a contribuição das espécies orgânicas para a biodisponibilidade de P em solos tropicais fortemente intemperizados. O objetivo do estudo foi usar a extração de NaOH-EDTA em conjunto com a solução de espectroscopia ^{31}P RMN para determinar as concentrações e a natureza química das espécies de P orgânico e inorgânico, em diferentes sistemas agroflorestais de cacau com diferentes idades, e com baixo *input* de fertilizante fosfatado em Latossolo Amarelo (*Oxisol*) no domínio do bioma Mata Atlântica, no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Sítios de estudo

O estudo foi realizado na Fazenda Porto Seguro, localizada na região cacaueira do município de Uruçuca, região sul da Bahia, Brasil (14° 35' 34" S, 39° 17' 2" W). A fazenda possui uma área total de 1,100 ha, desse total cerca de 300 ha é composto por agroflorestas de cacau e 800 ha em áreas de vegetação primária e secundária de floresta ombrófila densa do bioma Mata Atlântica (Veloso et al., 1991). Os sítios de estudo estão situados em clima tropical úmido do tipo *Af*, de acordo com a classificação de Köppen, com uma precipitação média anual bem distribuída de 1,500 mm sem déficit hídrico e temperatura média anual de 25 °C. O solo em todos os sítios foi classificado como Latossolo Amarelo (Embrapa, 2013), que é equivalente ao *Oxisol* em *USDA Soil Taxonomy* (Soil Survey Staff, 2009). No geral, os solos presentes nessa região integram à formação geológica Barreiras, com textura argilosa à arenosa-argilosa com a presença de uma alta concentração de caulinita (96% da fração argila) e baixas concentrações de óxidos de ferro (Fe) e vestígios de óxidos de manganês (Mn) (Correa et al., 2008). Uma breve descrição dos nove sítios de estudo é mostrada na tabela 1.

A fertilização inorgânica dos sítios com agroflorestas não foi realizada até o ano de 2002, foi adotada a partir do ano de 2003 em intervalos de 3 anos. A fertilização foi interrompida nos sítios em 2012 para realização da amostragem dos solos. Os sítios pastagem e floresta natural não foram fertilizados. Nos sítios 6 e 7 foram plantadas árvores de *Gliricidia* (*Gliricidia sepium*) intercaladas nas faixas de cacau. Em cada sítio foram delimitadas parcelas fixas de 900 m² e separadas entre si por pelo menos 100 m de distância com uniformidade em termos de homogeneidade do solo, declividade, histórico do uso da terra, densidade e idade das árvores. Em cada parcela foi retirada uma amostra composta de solo proveniente de 15 amostras simples na profundidade de 0-10 cm. Nos sítios 6 e 7, foram retiradas amostras de solo tanto nas fileiras de cacau quanto nas fileiras de seringueira com a finalidade de comparar os resultados com os respectivos sítios de referência (sítios 8 e 9) antes da implantação das agroflorestas.

Tabela 1. Descrição dos nove diferentes sítios, incluindo sistemas agroflorestais de cacau, pastagem e floresta natural na região da Mata Atlântica do Brasil

Sítios	Sistema de produção	Idade (anos)	Manejo
1	Cacau-cabruca aberta	40	Cacau sombreado por 32 árvores de Mata Atlântica, com poda da copa das árvores de sombra, o espaçamento do cacau é de 3 x 3 m, com fertilização inorgânica aplicada na liteira de 57, 86 e 29 kg ha ⁻¹ de N, P ₂ O ₅ e K ₂ O respectivamente
2	Cacau-cabruca fechada	40	Cacau sombreado por 35 árvores de Mata Atlântica, sem poda da copa das árvores de sombra, o espaçamento do cacau é de 3 x 3 m, com fertilização inorgânica aplicada na liteira de 49, 74 e 49 kg ha ⁻¹ de N, P ₂ O ₅ e K ₂ O respectivamente
3	Cacau + eritrina	35	O espaçamento de Eritrina (<i>Erythrina glauca</i> Lour.) foi de 25 x 25 m, distribuído em <i>quincunx</i> que totaliza 32 árvores por hectare, o espaçamento do cacau é de 3 x 3 m, com fertilização inorgânica aplicada na liteira de 49 kg ha ⁻¹ de N, P ₂ O ₅ e K ₂ O respectivamente
4	Cacao + seringueira	03	O espaçamento da seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg.) é de 15 x 2 m, e o espaçamento do cacau é de 3 x 3 m, substituindo um sistema de cacau+eritrina (32 anos). A fertilização inorgânica foi à mesma do sítio 1
5	Cacao + seringueira	40	O espaçamento da seringueira de 15 x 3 m, e o espaçamento do cacau é de 3 x 3 m. A fertilização inorgânica foi à mesma do sítio 1
6	Cacao + seringueira em faixas	04	Fileiras de cacau (6c) plantadas em 4 linhas com uma densidade de 3 x 3 m nas entrelinhas (784 árvores ha ⁻¹). As linhas L1 e L5 foram plantadas a uma distância de 3.0 m das faixas de seringueira. As faixas duplas de seringueira (6r) com uma densidade de 15 x 3 x 2.5 m (440 árvores ha ⁻¹), em substituição da Mata Atlântica. A fertilização inorgânica foi a mesma do sítio 3 em ambas as fileiras de cacau e seringueira
7	Cacao + seringueira em faixas	04	Fileiras de cacau (7c) plantadas em 5 linhas com uma densidade de 3 x 3 m nas entrelinhas (833 árvores ha ⁻¹). As linhas L1 e L5 foram plantadas a uma distância de 3.0 m das faixas de seringueira. As faixas duplas de seringueira (7r) com uma densidade de 17 x 3 x 2.5 m (400 árvores ha ⁻¹), em substituição a uma pastagem não fertilizada e sem pastoreio intensivo (26 anos). A fertilização inorgânica foi a mesma do sítio 2 em ambas as fileiras de cacau e seringueira
8	Pastagem	30	<i>Brachiaria decumbens</i> : ausência de pastoreio e não fertilizada em substituição a Mata Atlântica
9	Floresta natural	-	Um fragmento de Mata Atlântica não fertilizado

Determinação dos atributos químicos e físicos do solo

As amostras de solo foram secas ao ar e separadas por peneiras de 2 mm. O carbono orgânico do solo (COS) e nitrogênio total (N total) foram determinados através de combustão seca em sistema analisador elementar automatizado *PerkinElmer's Series II 2400 CHNS/O Analyzer* (Tabela 2). O pH do solo foi determinado em água deionizada. O teor de argila foi determinado utilizando o método da pipeta após tratamento com 35% de H_2O_2 e 1.0 mol L^{-1} HCl para remover a matéria orgânica e carbonatos (Embrapa, 2011). O P inorgânico trocável (P-resina) foi determinado com a pesagem de 0.5 g de solo seco em tubos falcon de 15 ml, adicionando-se 10 ml de água deionizada e uma resina trocadora de ânions (RTA) de 1 x 5 cm (ANION 204UZRA) saturada com $NaHCO_3$ 0.5 mol L^{-1} (pH 8.5), levada para agitador horizontal a 120 rpm por 16 horas, logo após, a resina foi lavada com água deionizada e levada para agitação com 10 ml de HCl 0.5 mol L^{-1} para recuperação do fosfato (Hedley et al., 1982). O extrato resultante foi analisado através de colorimetria para P_i reativo ao molibdato de Murphy e Riley (1962) em SPECORD 210 PLUS (*Analytik Jena, Jena, DE*). Os valores referentes às propriedades químicas e físicas dos solos foram obtidos de Aleixo et al. (2017) por se tratar dos mesmos sítios amostrados nesse estudo. O P total do solo foi extraído com a digestão em $H_2SO_4 + H_2O_2$ de 5.0 g de solo e determinado por espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), utilizando um *Shimadzu ICPE-9000* (*Shimadzu Inc., Kyoto, JP*).

Extração com NaOH–EDTA e solução de espectroscopia ^{31}P RMN

O P do solo (0-10 cm) foi extraído agitando 1.0 g de solo com 10 mL de uma solução contendo 0.25 mol L^{-1} NaOH + 50 mmol L^{-1} Na_2EDTA , durante 10 h a $25^\circ C$. Escolhemos um tempo de extração de 10 h para melhorar a recuperação de P total, e limitar, assim, a degradação dos compostos de P no extrato final. Após este passo, cada extrato foi centrifugado a 5,000 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de ésteres de celulose (nitrato 75-80% e acetato) de $0.45 \text{ }\mu m$ (*Millipore Inc., Massachusetts, USA*) para remover quaisquer precipitados ou materiais que não solubilizaram, foram congelados com nitrogênio líquido, liofilizados (~52h) e armazenados. Uma alíquota de cada extrato foi retirada

para análise do P total por uma digestão com $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ e determinada por ICP-AES ($P_{\text{ICP Total}}$), seguindo o método modificado proposto por Doolette et al. (2009; 2011).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{31}P foi realizada solubilizando 100 mg de cada extrato liofilizado com 0.9 mL contendo 0.25 mol L^{-1} NaOH + 50 mmol L^{-1} Na_2EDTA , 0.1 mL de óxido de deutério (D_2O) e 0.1 mL de uma solução de $2,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido metilenodifosfônico (MDPA) como padrão interno, cada extrato foi centrifugado e depois transferido para um tubo de RMN de 5mm. Os espectros de solução ^{31}P RMN foram adquiridos com desacoplamento de prótons e operando a 202,446 MHz usando um Bruker Avance DRX 500 MHz (Bruker, DE), utilizando um pulso de $6,0 \text{ } \mu\text{s}$ (30°), com tempo de aquisição de 0.4 s, tempo de relaxamento de 0.5 s e operando a 21°C . Aproximadamente 30,000 *scans* foram realizados para cada amostra. Na literatura, tempos T1 mais longos foram sugeridos (Cade-Menun 2015; 2017), entretanto, em nossa medida, os tempos de aquisição e de relaxamento foram intencionalmente breves. Contudo, para o presente estudo realizamos testes em uma amostra representativa em diferentes condições para realizar a calibração dos comprimentos do pulso ^{31}P RF no espectrômetro antes da realização dos nossos experimentos; além disso, mensuramos os valores T1 em uma amostra de extratos aquosos de solos em NaOH-EDTA, com conhecida concentração de P, em diferentes testes para medir o intervalo de valores T1 no pico de maior amplitude no espectro gerado com um pulso de 30° , como recomendado por Cade-Menun and Liu (2014) para que 99% dos átomos de fósforo retornem ao equilíbrio. Os resultados mostraram que apenas um pequeno desvio na intensidade do sinal, principalmente para o ortofosfato inorgânico, DNA e Pirofosfato, entre tempos curtos e longos, o que diminui a possibilidade de superestimação das concentrações de *ortho*-P e subestimação das concentrações de P-diéster.

Não obtivemos espectros replicados para cada extrato de solo. Os desvios químicos dos sinais (δ) foram determinados em partes por milhão (ppm) em relação a um padrão externo de H_2PO_4 a 85%. A concentração das espécies de P foi calculada multiplicando sua contribuição relativa ao sinal de RMN total pela concentração de MDPA como referência interna e padrão de concentração ($17.56 \text{ } \delta$ ppm). Os espectros foram processados com o alargamento da linha de 5 Hz. Todas as áreas com processamento e pico espectral foram calculadas por meio de integração matemática utilizando o *Delta NMR Software* (Jeol Resonance Inc.,

Tokyo, JP). Os sinais atribuídos aos compostos P foram baseados em relatos da literatura de extratos de solo NaOH-EDTA, e que foram interpretados como sugerido por Cade-Menun (2015) e Doolette et al. (2009; 2011). Foi calculada e, então, comparada à proporção relativa de cada composto de P detectado nos P_i total (soma de *ortho*-P e pirofosfato) e P_o total (soma de P-monoéster e P-diéster) em relação ao P_{ICP} total, assim como a proporção dos P_i e P_o total na composição do P total do solo obtido por digestão em $H_2SO_4 + H_2O_2$ (Turner e Engelbrecht, 2011).

Análise estatística

Cada sistema agroflorestal de cacau foi considerado um tratamento de efeito fixo devido às múltiplas fontes de variação, tais como os três sistemas de produção (i.e., cacau cabruca, eritrina e seringueiras), tempo de estabilidade (i.e., diferentes idades) e diferentes práticas de manejo. (i.e., adubação fosfatada, poda de copa e densidade arbórea). Os dados foram transformados por \sqrt{X} quando não distribuídos normalmente (determinado por *Curtoses* para valores significativamente diferentes de zero, $p < 0,05$). Assim, os dados referentes às espécies de P do solo determinadas por espectroscopia de extração NaOH-EDTA e solução de ^{31}P RMN, como propriedades físicas e químicas dos solos, foram analisados por meio do coeficiente de correlação de Pearson. As análises foram realizadas utilizando o software R (*R Development Core Team*, 2009) e analisadas utilizando o pacote ADE-4 (Chessel et al., 2004).

RESULTADOS

Identificação das espécies de P do solo por ^{31}P RMN

A partir da solução de espectroscopia de ^{31}P RMN, detectamos diferentes compostos no solo de diferentes sistemas agroflorestais de cacau com baixo input de fertilizante fosfatado, mostrados nas figuras 1 e 2. O P inorgânico foi detectado como *ortho*-P (média \pm erro padrão, $5,43 \pm 0,3$ ppm, $n = 11$) e pirofosfato ($-5,16 \pm 0,9$ δ ppm, $n = 11$). A região de P-monoéster dos espectros variou de 5,2 a 3,0 δ ppm, $n = 11$. Picos específicos nesta região foram detectados a $4,91 \pm 0,09$; $4,74 \pm 0,07$; $4,56 \pm 0,02$; $4,38 \pm 0,03$; $4,22 \pm 0,01$; $4,1 \pm 0,02$; $3,49 \pm 0,02$ δ ppm $n = 11$ e $3,96 \pm$

0,05; $3,69 \pm 0,04 \delta$ ppm $n = 10$; mas não foram especificamente identificados. Na região P-diéster apenas o DNA foi especificamente detectado e identificado ($-0,64 \pm 0,09 \delta$ ppm, $n = 3$ e $-0,78 \pm 0,05 \delta$ ppm, $n = 11$). Os fosfonatos não foram detectados, e estão geralmente distribuídos de 38,4 a 9,9 δ ppm, e também polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa, geralmente distribuídos de -4,0 a -20,9 δ ppm.

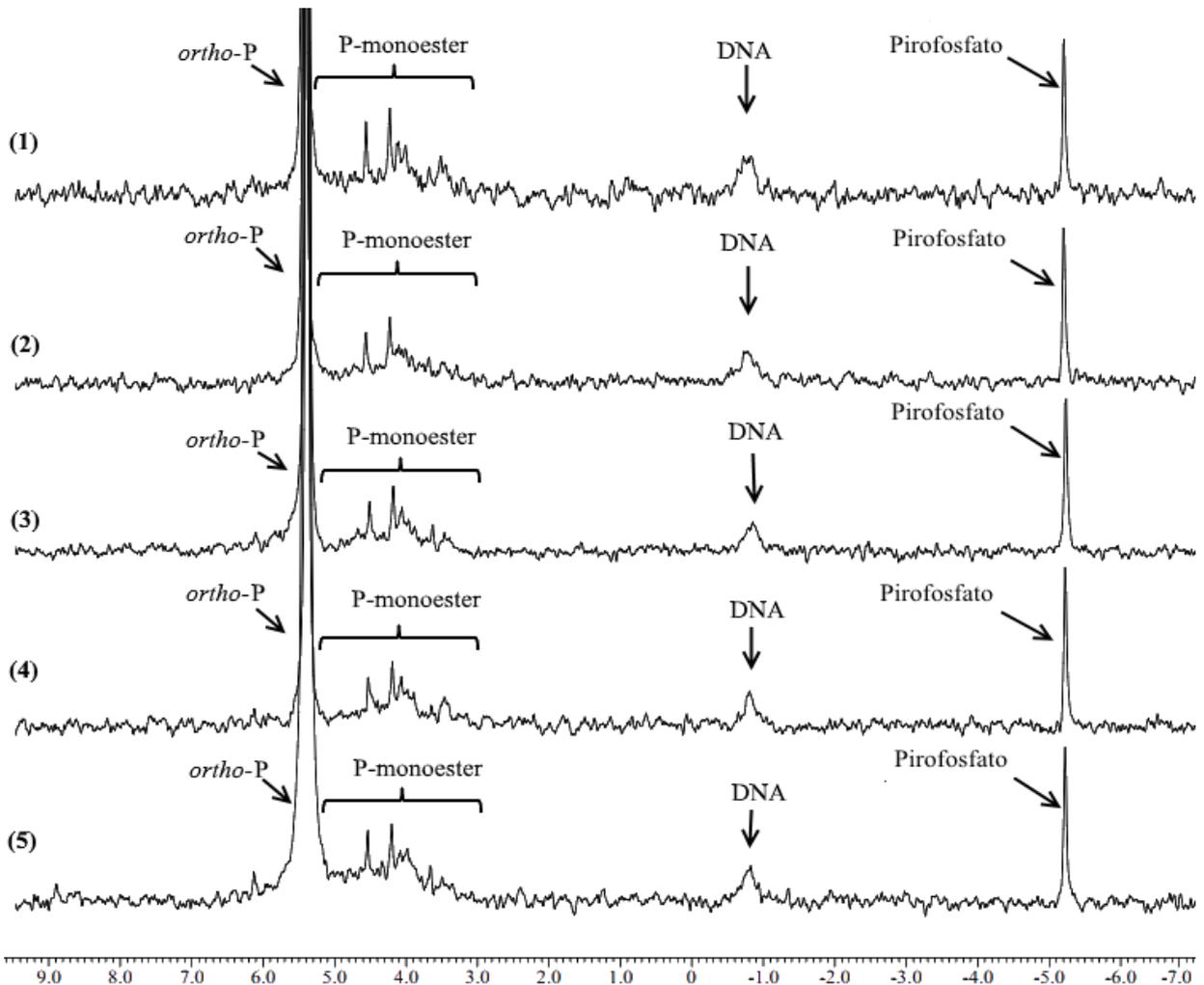


Figura 1. Espectros obtidos com a solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA em solos sob diferentes agroflorestas de cacau na região da Mata Atlântica do Brasil. As escalas dos espectros foram ajustadas em relação aos picos de ortofosfato inorgânico. Os espectros foram plotados com 5 Hz de linha de alargamento. Sítios: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau+eritrina, 35 anos; (4) cacau+seringueira, 3 anos; (5) cacau+seringueira, 40 anos.

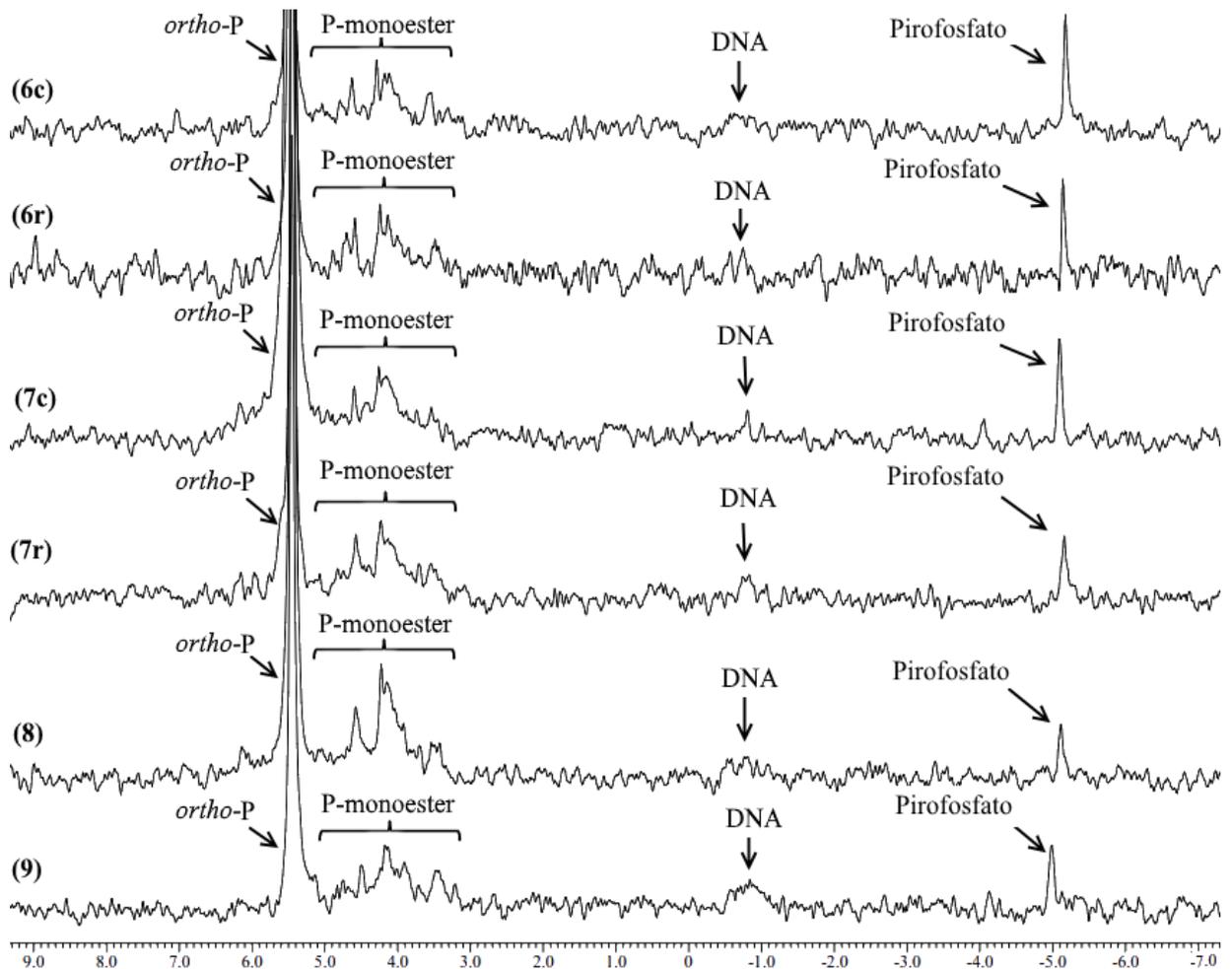


Figura 2. Espectros obtidos com a solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA em solos sob diferentes agroflorestas de cacau, floresta natural e pastagem na região da Mata Atlântica do Brasil. As escalas dos espectros foram ajustadas em relação aos picos de ortofosfato inorgânico. Os espectros foram plotados com 5 Hz de linha de alargamento. (6) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada; (8) pastagem e (9) floresta natural.

Análise quantitativa das espécies de P do solo por ^{31}P RMN

Resumidamente, todos os sítios estudados apresentaram solos ácidos, de textura argilosa a muito argilosa, e elevados teores de COS e N total, baixos teores de P total do solo, e baixas concentrações de P-resina em todos os sítios, com exceção do sítio 5 que apresentou teor médio de P disponível a cobertura vegetal (Tabela 2). O P total dos solos extraídos em NaOH-EDTA e determinados por espectroscopia de ^{31}P RMN ($^{31}\text{P}_{\text{RMNtotal}}$) em solução variou entre 166 e 1,160 mg kg⁻¹ (média ± erro padrão, 396 ± 81,9 mg kg⁻¹), representando entre 26 e 82% (média de 54,7 ± 5,5%) do P total do solo (Tabela 3). Valores determinados em extratos por ICP-AES ($P_{\text{ICP total}}$) foram similares para aqueles determinados por $^{31}\text{P}_{\text{RMN total}}$, variando entre 182 e 1,179 mg kg⁻¹ (média de 423 ± 81.9 mg kg⁻¹) e representando entre 28 e 83% (média de 59 ± 5.6%) do P total do solo (Tabela 3). Os valores de $^{31}\text{P}_{\text{RMN total}}$ corresponderam em média a 92% do $P_{\text{ICP total}}$. Uma regressão linear com o intercepto forçado através da origem entre $^{31}\text{P}_{\text{RMN total}}$ e $P_{\text{ICP total}}$ foi descrita pela seguinte equação:

$$*\sqrt{(P_{\text{ICP total}})} = 1.0336 \pm 0,005 * \sqrt{(^{31}\text{P}_{\text{RMNtotal}})}; r^2 = 0.999; p < 0,0001; n = 11.$$

Tabela 2. Atributos físicos e químicos dos solos (0-10 cm) sob diferentes agroflorestas de cacau, pastagem e floresta natural na região da Mata Atlântica no Brasil

Sítios	Argila %	pH (H ₂ O)	P-resina mg kg ⁻¹	P	COS	N %
1	52.7	4.1	6.4	695	3.42	0.47
2	52.8	4.5	4.8	692	3.34	0.39
3	65.9	4.5	5.5	842	3.72	0.42
4	61.8	4.0	6.4	500	3.56	0.47
5	62.0	4.3	25.2	1420	3.08	0.35
6c	31.2	4.5	5.3	445	3.08	0.23
6r	40.2	4.3	6.6	548	3.01	0.22
7c	35.7	4.8	6.8	529	2.73	0.33
7r	36.2	4.6	7.7	689	2.52	0.31
8	44.7	4.6	2.5	678	3.59	0.42
9	60.3	4.5	3.5	641	3.99	0.47

P: fósforo total do solo foi extraído por digestão com H₂SO₄-H₂O₂ e analisado em ICP-AES. Argila, pH (H₂O), P-resina, COS e N foram retirados de Aleixo et al. (2017). Sítios: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau+eritrina, 35 anos; (4) cacau+seringueira, 3 anos; (5) cacau+seringueira, 40 anos; (6) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada; (8) pastagem e (9) floresta natural.

O P_i total dos solos extraídos em NaOH-EDTA (soma do *ortho-P* e pirofosfato) e determinados por espectroscopia de ^{31}P RMN variou entre 117 e 1.115 mg kg^{-1} (média de $341 \pm 82,5 \text{ mg kg}^{-1}$), que representaram entre 18 e 78% (média de $46 \pm 5,4\%$) do P total do solo (Tabela 3). A espécie com maior contribuição para o P_i total foi o *ortho-P*, variando entre 108 e 1.091 mg kg^{-1} (média de $324 \pm 81,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e representou entre 92 e 98% (média de $94,2 \pm 0,6\%$) do P_i extraído em NaOH-EDTA (Tabela 4). As concentrações de pirofosfato variaram entre 6,2 e 28,4 mg kg^{-1} (média de $16,7 \pm 2,2 \text{ mg kg}^{-1}$), e representaram entre 2 e 8% (média de $5,8 \pm 0,6\%$) do P_i extraído em NaOH-EDTA (Tabela 4).

O P_o total dos solos extraídos em NaOH-EDTA (soma do P-monoéster e P-diéster) determinados por espectroscopia de ^{31}P RMN variaram entre 35,8 e 78,2 mg kg^{-1} (média de $54,7 \pm 4,3 \text{ mg kg}^{-1}$), representando entre 3 e 16% (média de $8,7 \pm 1,1\%$) do P total do solo (Tabela 3). A maior parte do P_o ocorreu como P-monoéster, variando de 26,4 a 63,2 mg kg^{-1} (média de $42 \pm 3,8 \text{ mg kg}^{-1}$), e correspondeu entre 61 e 94% (média de $76,9 \pm 3,1\%$) do P_o total (Tabela 4). O P-diéster foi detectado como DNA em todos os sítios, e variou de 4,0 a 26,2 mg kg^{-1} (média de $12,6 \pm 2,1 \text{ mg kg}^{-1}$), e representou 6 a 39% (média de $23,1 \pm 3,1\%$) do P_o total. Assim, a razão entre o P-monoéster/P-diéster (M/D) variou entre 1,6 e 15,7 (média de $4,9 \pm 1,3$). Essa relação pode ser considerada um índice do grau de labilidade das espécies orgânicas de P no solo (Tabela 4). As espécies de P detectadas variaram amplamente com o uso da terra: o DNA apresentou a maior variação (CV = 52%, $n = 11$), seguido por orto-P (CV = 79%, $n = 11$) e pirofosfato (CV = 41%, $n = 11$). O P-monoéster apresentou a menor variação (CV = 28%, $n = 11$).

Tabela 3. Frações de P inorgânico e orgânico determinadas pela solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA de solos (0-10 cm) sob agroflorestas de cacau, pastagem e floresta natural na região da Mata Atlântica no Brasil

Sítios	Extração em NaOH-EDTA (mg kg^{-1})			
	P_i total	P_o total	$^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total	P_{ICP} total
1	315 (45)	43,5 (6)	358 (52)	392 (56)
2	300 (43)	67,6 (10)	368 (53)	402 (58)
3	453 (54)	48,0 (6)	501 (60)	549 (65)
4	311 (62)	78,2 (16)	389 (78)	405 (81)
5	1115 (78)	45,2 (3)	1160 (82)	1179 (83)
6c	190 (43)	35,8 (8)	226 (51)	247 (55)
6r	318 (58)	49,0 (9)	367 (67)	402 (73)
7c	281 (53)	67,2 (13)	349 (66)	382 (72)
7r	155 (23)	43,7 (6)	199 (29)	218 (32)
8	194 (29)	74,1 (11)	268 (40)	293 (43)
9	117 (18)	49,5 (8)	166 (26)	182 (28)

Os valores entre parênteses são proporções (%) do fósforo total do solo. P_i total soma de *ortho*-P e pirofósforo. P_o total: soma de P-monoéster e P-diéster. $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total: soma de P_i total e P_o total. P_{ICP} total: P total extraível por NaOH-EDTA e analisado por ICP-AES. Sítios: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau+eritrina, 35 anos; (4) cacau+seringueira, 3 anos; (5) cacau+seringueira, 40 anos; (6) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada; (8) pastagem e (9) floresta natural.

Relações entre as espécies de P e os atributos do solo

O teor de argila foi correlacionado positivamente com COS ($r = 0,72$, $p < 0,05$, $n = 11$) e N total ($r = 0,75$, $p < 0,01$, $n = 11$). COS e N total foram correlacionados positivamente entre si ($r = 0,70$, $p < 0,01$, $n = 11$). Os teores de P-resina e P total do solo foram forte e positivamente correlacionados entre si ($r = 0,75$, $p < 0,01$, $n = 11$), porém não se correlacionaram significativamente com os outros atributos do solo. Resultado similar para os valores de pH do solo. O P total do solo foi fortemente correlacionado com $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total ($\text{P}_i + \text{P}_o$ determinado por espectroscopia de RMN ^{31}P) ($r = 0,81$, $p < 0,01$, $n = 11$) e P_i total (*orto*-P plus pirofósforo) extraído em NaOH-EDTA ($r = 0,99$, $p < 0,001$, $n = 11$), embora não com extração total de P_o (P-monoéster plus P-diéster). Entre as espécies de P_i e atributos do solo, o *orto*-P foi fortemente correlacionado com o P total do solo ($r = 0,82$, $p < 0,01$, $n = 11$) e P-resina ($r = 0,87$, $p < 0,001$, $n = 11$), enquanto o pirofósforo foi correlacionado apenas com argila ($r = 0,62$, $p < 0,05$, $n = 11$). Para as espécies de P_o apenas o DNA foi

positivamente correlacionado com argila ($r = 0,68$, $p < 0,05$, $n = 11$), COS ($r = 0,73$, $p < 0,01$, $n = 11$) e N total ($r = 0,62$, $p < 0,05$, $n = 11$). Não foram encontradas correlações significativas entre P_i total e P_o total, nem entre os atributos do solo e os dois grupos de espécies de P.

Tabela 4. Concentração das espécies de P determinadas pela solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA de solos (0-10 cm) sob diferentes agroflorestas de cacau, pastagem e floresta natural na região da Mata Atlântica no Brasil

Sítios	P inorgânico (mg kg^{-1})		P orgânico (mg kg^{-1})		
	<i>ortho</i> -P	Pirofosfato	P-monoéster	P-diéster	M/D
1	298	16,5	31,2	12,3	2,5
2	277	23,3	41,4	26,2	1,6
3	425	28,6	35,3	12,7	2,8
4	287	24,3	56,3	21,8	2,6
5	1091	24,0	32,4	12,8	2,5
6c	175	15,0	26,4	9,4	2,8
6r	303	15,7	42,9	6,0	7,1
7c	269	12,2	63,2	4,0	15,7
7r	145	10,4	39,7	4,0	9,9
8	188	6,2	60,2	13,9	4,3
9	108	8,2	33,5	16,0	2,1

M/D: relação entre P-monoéster_(C) e P-diéster_(C). Sítios: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau+eritrina, 35 anos; (4) cacau+seringueira, 3 anos; (5) cacau+seringueira, 40 anos; (6) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada; (8) pastagem e (9) floresta natural.

DISCUSSÃO

Totais de P no solo e a solução de ^{31}P RMN

A maioria dos sítios avaliados apresentou baixos teores de P no solo, que é uma característica dos solos com elevado grau de intemperismo. O sítio 5 foi o único a mostrar um teor médio de P total do solo devido, provavelmente, à aplicação de fertilizante fosfatado seis meses antes do momento da amostragem do solo. O P_{ICP} total e o $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total mostraram eficiência semelhante para caracterizar as concentrações totais de P extraível no solo por extração com NaOH-EDTA (média de 55% para $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total e 59% para P_{ICP} total) nos locais avaliados (Tabela 3). No

entanto, a pequena diferença entre os métodos sugere que algumas espécies de P determinadas pela solução de espectroscopia de ^{31}P RMN não puderam ser quantificadas a partir dos espectros obtidos, enquanto o extrato analisado por ICP-AES quantificou todos os P presentes na solução de NaOH-EDTA. Resultados semelhantes foram relatados por Turner e Engelbrecht (2011), em solos de florestas tropicais no Panamá, onde os valores determinados pelo ICP-AES variaram de 27 a 56% e os determinados pela espectroscopia ^{31}P RMN variaram de 28 a 61% do solo total. Altos percentuais de recuperação do solo P obtidos a partir do uso do extrator NaOH-EDTA, tanto do P_{ICP} total como do $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total, demonstraram a eficiência deste extrator em solos florestais tropicais fortemente intemperizados, geralmente ácidos e com alta capacidade de adsorção de P fase mineral do solo (Comerford e Barros, 2005).

Diversidade e a distribuição das espécies de P no solo

O *ortho*-P foi a espécie com maior concentração em todos os sítios avaliados (Tabela 4). O aumento na concentração dessa espécie P em quase todos os sítios agroflorestais de cacau sugere que, mesmo com o baixo *input* P inorgânico, houve um aumento na disponibilidade de P_i , indicado pela alta correlação entre *orto*-P e P-resina ($r = 0,87$, $p < 0,001$, $n = 11$). Esse aumento na disponibilidade de P_i nos solos sob agroflorestas de cacau pode ser, em parte, atribuído a altas concentrações de matéria orgânica do solo (Tabela 2), devido à alta acumulação de serapilheira (Fontes et al., 2014) e *turnover* de raízes (Muñoz e Beer, 2001), que formariam complexos organo-minerais que bloqueariam os sítios de adsorção de P na fase mineral do solo (Guppy et al., 2005). Este processo pode aumentar a biodisponibilidade de P por um longo período após sua adição via fertilização mineral. Concomitante a esse processo, a transferência contínua de P (média de 6 kg/ha/ano) por meio da queda de serapilheira em agroflorestas de cacau (Fontes et al., 2014) pode levar a um aumento no solo de P disponível. Em sistemas agroflorestais tropicais multiestratadas, a deposição de resíduos ricos em P juntamente com a fertilização fosfatada residual pode aumentar a disponibilidade de P_i em solos fortemente intemperizados (Lehmann et al., 2001; Szott e Melendez, 2001).

Concentrações elevadas de pirofosfato encontradas em todas as agroflorestas de cacau em comparação com a pastagem e a floresta natural (Tabela 4) poderia ser uma evidência de uma alta atividade fúngica do solo na transformação de P-monoéster e P-diéster em pirofosfato (Koukol et al., 2006; 2008). A acumulação de pirofosfato em solos sob agroflorestas de cacau também pode ser atribuída à maior disponibilidade de P_i tanto da fertilização mineral quanto da hidrólise de formas orgânicas de P pelas enzimas fosfatases, nas quais P_i seria absorvido e armazenado como pirofosfato no tecido fúngico do solo (Bünemann et al., 2008), e posteriormente liberados no solo após o *turnover* microbiano. Em contraste, em pastagens e florestas naturais, o baixo acúmulo de pirofosfato pode ser atribuído à sua hidrólise pelas enzimas fosfatases, já que este composto, funcionalmente semelhante ao P orgânico, pode constituir uma importante fonte de P para plantas em solos de baixa fertilidade (Turner e Engelbrecht, 2011; Reitzel e Turner, 2014). Concomitante ao ciclo fúngico de P, a correlação positiva significativa entre pirofosfato e argila é uma indicação de que a adsorção desta forma P na fase mineral do solo constituiria em um importante processo abiótico de estabilização do pirofosfato no solo, já que a intensidade de adsorção do pirofosfato no solo é maior que a do *orto*-P (Gunary, 1966).

A alta abundância relativa de DNA em relação ao P_o total do solo em todas as agroflorestas de cacau (média de 23%), bem como para pastagem (19%) e floresta natural (32%) (Figura 3) pode ser devida a associações positivas de DNA com argila, COS e N total. Todos esses atributos do solo constituem um conjunto de processos abióticos de estabilização de P_o . O DNA, em particular, pode ser fortemente adsorvido nos ácidos húmicos e nos minerais da fração argila (Khanna et al., 1998; Poly et al., 2000), particularmente abaixo do pH 5 (Khanna et al., 1998), como os solos avaliados no presente estudo (Tabela 2). O acúmulo de DNA também pode ser atribuído à sua incorporação dentro das estruturas da matéria orgânica do solo (Turner et al., 2007). Todos esses processos de estabilização do DNA promovem proteção de ataques enzimáticos. Assim, correlações positivas entre DNA, COS e N total foram encontradas em solos sob florestas temperadas (Turner et al., 2007), enquanto em solos de florestas tropicais essa correlação foi encontrada positivamente significativa apenas com COS (Turner e Engelbrecht, 2011).

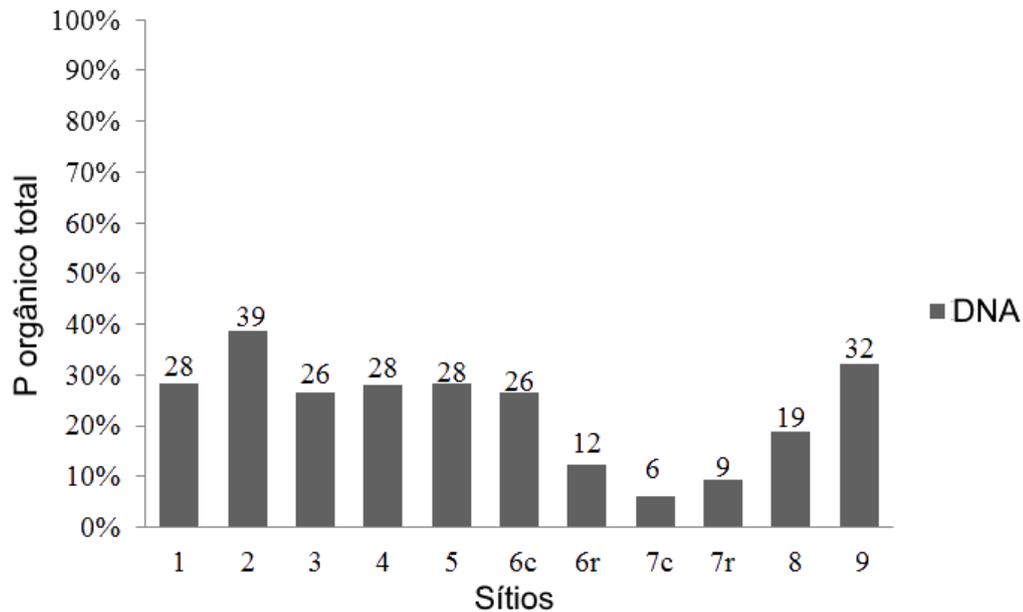


Figura 3. Distribuição relativa do DNA em solos (0-10 cm) sob agroflorestas de cacau, pastagem e floresta natural na região da Mata Atlântica no Brasil. O DNA do solo é mostrado através de proporções relativas ao P orgânico total determinado através da ^{31}P RMN nos extratos de NaOH-EDTA. Sítios: (1) cacau-cabruca aberta, 40 anos; (2) cacau-cabruca fechada, 40 anos; (3) cacau+eritrina, 35 anos; (4) cacau+seringueira, 3 anos; (5) cacau+seringueira, 40 anos; (6) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma floresta natural; (7) cacau+seringueira em faixas, 4 anos após a substituição de uma pastagem não fertilizada; (8) pastagem e (9) floresta natural.

Os sinais P-monoéster detectados (Figuras 1 e 2) podem ser devidos à presença de fosfatos de IHP (*myo*- e *scyllo*-) e açúcar (glicose-1-fosfato e -6-fosfato). Na região P-monoéster dos espectros foram detectados os sinais $4,56 \pm 0,02$; $4,22 \pm 0,01$; $4,1 \pm 0,02$ δ ppm, $n = 11$, isso sugere a presença do *myo*-IHP. Esta espécie contém 6 fosfatos, e a conformação desses grupos fosfato faz com que eles tenham múltiplos picos em um único espectro, um arranjo específico de 1:2:2:1, entretanto foram identificados apenas 3 picos. O deslocamento químico do pico *orto*-P de 6,0 para 5,43 δ ppm juntamente com o alargamento da base do sinal encobriu o pico de *myo*-IHP, geralmente indicado (grupo fosfato C-2) a 5,49 ppm, detectado e identificado por Cade-Menun (2015), usando um método padronizado e biblioteca de pico nos experimentos. Outro sinal detectado na região P-monoéster, $3,69 \pm 0,04$ δ ppm, $n = 10$, indicaria a presença de *scyllo*-IHP nesses locais. No entanto, experimentos adicionais podem ser necessários para detectar e identificar *scyllo*-IHP nesses solos, de acordo com Cade-Menun (2015). A hipótese atual é que a gênese e o acúmulo deste estereoisômero no solo originam-se de transformações

microbianas de *myo*-IHP, contribuindo para aumentar o nível de P_o recalcitrante no solo, uma vez que este estereoisômero é mais resistente à hidrólise por fitase durante a aquisição de P por microrganismos do solo, mas sua origem, dinâmica e função biológica permanecem ainda desconhecidas (Turner et al., 2012). Notavelmente, algumas formas de P-diésteres, tais como fosfolipídios e RNA, são suscetíveis à degradação nas condições de extração NaOH-EDTA e que posteriormente são adicionadas ao P-monoéster. As espécies α -glicerofosfato e β -glicerofosfato, inicialmente detectadas na região P-monoéster, são na verdade produtos de degradação fosfolipídica, enquanto os mononucleotídeos detectados são formados predominantemente por degradação de RNA (He et al., 2011; Young et al., 2013; Schneider et al., 2016). Resultados semelhantes foram relatados por Vincent et al. (2010) em florestas de terras baixas no Panamá, com sinais na região de P-monoéster correspondentes a produtos de degradação de P-diésteres. Assim, futuros estudos sobre a especiação de P_o em solos sob agroflorestas de cacau são necessários, uma vez que esses processos ainda não foram totalmente elucidados.

Uso da terra e a distribuição das espécies de P no solo

Os diferentes sistemas agroflorestais de cacau com baixo *input* de fertilizantes fosfatados proporcionaram uma alta variação nas concentrações de espécies de P detectadas nos solos (Tabela 4). Inicialmente, era esperado que as agroflorestas cacau-cabruca (sítios 1 e 2) fossem semelhantes à floresta natural (sítio 9), devido ao tempo de estabilidade (40 anos) dessas agroflorestas, que conservam características bióticas e abióticas semelhantes às da floresta natural, como composição de espécies arbóreas e atributos do solo. Embora os sítios de cacau-cabruca fossem superiores à floresta natural em 165% em *orto*-P, 141% em pirofosfato e 20% em DNA, eles foram semelhantes para o P-monoéster. Também era esperado que as duas agroflorestas de cacau-cabruca (sítios 1 e 2) fossem semelhantes entre si em termos de distribuição de espécies de P no solo. No entanto, o sistema cacau-cabruca fechada (sítio 2) foi superior ao sítio cacau-cabruca aberta (sítio 1) em 53% no DNA, 29% em P-monoéster e pirofosfato (Tabela 4). Estas diferenças nas concentrações de espécies de P entre os dois sítios de cacau-cabruca podem ser atribuídas às diferentes práticas de manejo adotadas ao

longo de 40 anos, como poda de copa de árvores de sombra, diferentes densidades de árvores e composição de plantas que afetariam distintamente a especiação de P no solo.

A conversão recente de uma floresta natural e uma pastagem em agroflorestas de cacau-seringueira (sítios 6c, 6r, 7c e 7r) diminuiu em 21% a concentração de DNA no solo (Tabela 4). Durante a conversão da floresta natural em agrofloresta cacau-seringueira (sítio 6), o corte e remoção de árvores e raízes grossas, juntamente com o revolvimento do solo por aração e gradagem, promoveram a quebra dos macroagregados do solo e, como consequência, a liberação de microagregados livres e mineralização de DNA que estavam protegidos nos macroagregados. No entanto, a conversão de uma parcela de um sistema de 32 anos de cacau + eritrina (sítio 3) para um sistema misto de cacau + seringueira de três anos (sítio 4), em que houve apenas a substituição da eritrina pela seringueira, sem revolvimento do solo, proporcionou um incremento de 72% no DNA e de 56% nas concentrações do P-monoéster (Tabela 4). O aumento dessas espécies de P_o pode ser consequência do grande aporte de resíduos ao solo durante o corte seletivo da eritrina, que é rico em P (Fontes et al., 2014). A alta proporção relativa de P-monoéster em relação ao total de P_o encontrada nas agroflorestas de cacau (média de 77%), pastagem (81%) e em floresta natural (68%) é maior em relação ao intervalo de 20 a 52% relatado para solos temperados (Murphy et al., 2009). Após 30 anos da conversão da floresta natural (sítio 9) para uma pastagem não fertilizada (sítio 8), a principal distinção das concentrações de espécies de P entre estas duas coberturas foi o incremento de 73% em *orto*-P e 79% em P-monoéster. A maior concentração de P-monoéster (IHP) encontrada em sítios de pastagens deve-se provavelmente à alta produção de sementes (1.128 kg/ha) durante o ciclo anual de *Brachiaria decumbens* (Quadros et al., 2012), que predomina na cobertura vegetal deste sítio. Em geral, o IHP está presente em altas concentrações, tanto em sementes (Raboy, 2007) quanto em frutos senescentes de diferentes sistemas agrícolas (Lott et al., 2000), constituindo, assim, uma fonte de P_o para o solo. A ausência de pastejo intensivo de ruminantes nesta pastagem (sítio 8) pode estar contribuindo para o acúmulo de P-monoéster no solo, uma vez que os ruminantes têm a capacidade de hidrolisar, através de enzimas digestivas, o IHP presente em

sementes de capim e transformá-los em formas P mais simples que seriam depositadas no solo (Leytem e Maguire, 2007).

Embora a conversão da floresta para agroflorestas de cacau fornecesse uma alta variação nas concentrações de P_o no solo, essa conversão não afetou negativamente, em geral, os estoques de P-monoéster nos solos avaliados (Tabela 4). A proporção de P-monoéster em relação ao total de P_o , tanto para agroflorestas de cacau (média de 77%) como para ecossistemas de referência (média de 74% para pastagem e floresta natural) sugere uma forte estabilização de espécies P-monoéster em solos tropicais altamente intemperizados, uma vez que podem ser fortemente adsorvidos à fase mineral do solo (Condrón et al., 2005). De fato, o acúmulo de P_o em solos de florestas tropicais ocorre principalmente como formas de P-monoéster com proporções variando de 68 a 94% do total de P_o (Turner e Engelbrecht, 2011). Os altos valores da razão monoéster/diéster revelam que as baixas concentrações de P-diéster (e.g., apenas o DNA) para ambos as agroflorestas de cacau (média 23% do P_o total) e para floresta natural e pastagem (média de 26% do P_o total) indicariam uma ciclagem de P_o eficiente nos solos desses sítios (Tabela 4). No entanto, a correlação positiva encontrada entre DNA e a fração argila sugere que esta forma de P possa ser estabilizada na fase mineral do solo e protegida dos processos de mineralização que ocorrem nesses solos tropicais. Nesse sentido, as altas concentrações e proporções relativas de P_o encontradas em todos as agroflorestas de cacau sugerem um alto potencial de suprimento de P às plantas através do processo de mineralização em caso de supressão da adubação mineral fosfatada, confirmando os resultados encontrados por Aleixo et al. (2017) que utilizaram a técnica de fracionamento de Hedley nos mesmos locais do presente estudo.

Os sítios avaliados apresentaram baixa variação no teor de argila (CV < 24%) e pH (CV = 5%) e, portanto, a causa da variação nas concentrações e proporções relativas da maioria das espécies de P estaria diretamente relacionada ao tipo de sistema produção e práticas de manejo adotadas em cada agrofloresta de cacau. Além disso, espécies arbóreas presentes em agroflorestas e florestas naturais podem apresentar diferentes estratégias de aquisição de P no solo, a fim de evitar uma alta depleção de espécies de P_o em caso de uma supressão da fertilização fosfatada. Diferentes espécies florestais têm capacidades distintas para produzir

enzimas específicas a fim de acessar uma ampla diversidade de formas de P_o em diferentes níveis de estabilidade no solo (Turner, 2008b; Steidinger et al., 2015). Portanto, os resultados do presente estudo demonstraram a necessidade de identificar diferentes espécies de P no solo com o objetivo de estabelecer estratégias de manejo do P_o , e assim aumentar a eficiência da fertilização fosfatada em ecossistemas manejados, com ênfase nas interações entre a composição da cobertura vegetal e as diferentes práticas de manejo, e como isso afetaria a intensidade da ciclagem biogeoquímica de P em solos tropicais fortemente intemperizados.

CONCLUSÕES

O uso da espectroscopia de ^{31}P RMN no solo melhorou a compreensão da especiação de P em agroflorestas de cacau. A distribuição das espécies de P no solo variou de acordo com diferentes práticas de manejo (adubação fosfatada, espécies arbóreas e densidade de árvores) e tempo de estabilidade (diferentes idades) das agroflorestas de cacau com baixo *input* de fertilizantes fosfatados. Para as agroflorestas de cacau, floresta natural e pastagem, grande parte do P orgânico do solo consistiu de P-monoéster e baixas concentrações de DNA. Esta espécie de P_o foi correlacionada positivamente com argila e carbono orgânico do solo. No entanto, a recente conversão de florestas naturais e pastagens em agroflorestas de cacau levaram a uma diminuição na concentração de DNA. Altas concentrações de pirofosfato encontradas em todas as agroflorestas de cacau podem ser uma evidência de uma alta atividade fúngica do solo e na ciclagem e acúmulo dessa espécie de P. Além disso, as altas concentrações e proporções relativas de espécies de P_o e pirofosfato revelaram um alto potencial de fornecimento de P às plantas, em caso de supressão da fertilização fosfatada nestes sistemas agroflorestais. Mais estudos são agora necessários para avaliar a contribuição dos compostos de P do solo para a nutrição vegetal, assim como para avaliar os efeitos do uso da terra no ciclo biogeoquímico de P, nesses sistemas agroflorestais de cacau.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixo, S., Gama-Rodrigues, A.C., Costa, M.G., Sales, M.V.S., Gama-Rodrigues, E.F., Marques, J.R.B. (2017) P transformations in cacao agroforests soils in the Atlantic Forest region of Bahia, Brazil. *Agroforest. Syst.* 91(3), 423–437.
- Cade-Menun, B.J. (2015) Improved peak identification in ^{31}P -NMR spectra of environmental samples with a standardized method and peak library. *Geoderma* 257-258, 102–114
- Celi, L., Barberis, E. (2005) Abiotic stabilization of organic phosphorus in the environment. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment*. CABI, Wallingford, pp 113–132
- Chessel, D., Dufour, A.B., Thioulouse, J. (2004) The ade4 package I: one-table methods. *R News* 4, 5–10.
- Costa, A.C, Gama-Rodrigues, A.C., Zaia, F.C., Gama-Rodrigues, E.F. (2014) Leguminosas arbóreas para recuperação de áreas degradadas com pastagem em Conceição de Macabu, Rio de Janeiro, Brasil. *Scientia Forestalis* 42(101), 101–112
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1977) Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. *Journal of Environmental Quality*, 6, 82-85.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J. (2010) Rapid decomposition of phytate applied to a calcareous soil demonstrated by a solution ^{31}P NMR study. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 563–575.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2011) *Manual de análise química de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa solos, Brasília. 379 p.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2013) *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Embrapa solos, Brasília, 3.ed., 353 p.
- Fan, Y., Lin, F., Yang, L. (2018) Decreased soil organic P fraction associated with ectomycorrhizal fungal activity to meet increased P demand under N application in a subtropical forest ecosystem. *Biol Fertil Soils* 54, 149.

- Fontes, A.G., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Sales, M.V.S., Costa, M.G., Machado, R.C.R. (2014) Nutrient stocks in litterfall and litter in cocoa agroforests in Brazil. *Plant and Soil* 383, 313–335.
- Furlan, D.A. (2015) Frações de fósforo do solo em diferentes usos da terra no Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes, RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 44p. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Gama-Rodrigues, A.C., Sales, M.V.S., Silva, P.S.D, Comerford, N. B., Cropper, W. P., Gama-Rodrigues, E. F. (2014) An exploratory analysis of phosphorus transformations in tropical soils using structural equation modeling. *Biogeochemistry*, 118, 453-469.
- He, Z.Q., Olk, D.C., Cade-Menun, B.J. (2011) Forms and lability of phosphorus in humic acid fractions of Hord silt loam soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 1712–1722.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S. (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 970-976.
- Houlton, B.Z., Wang, Y.P., Vitousek, P., Field, C. (2008) A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* 454, 327–330.
- Jarosch, K.A., Doolette, A.L., Smernik, R.J., Frossard, F.T.E., Bünemann, E.K., (2015) Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of ³¹P NMR spectroscopy and enzyme addition assays. *Soil Biol. Biochem.* 91, 298–309.
- Koukol, O., Novák, F., Hrabal, R., Vosátka, M. (2006) Saprrotrophic fungi transform organic phosphorus in spruce needle litter, *Soil Biol. Biochem.* 38, 3372–3379.
- Koukol, O., Novák, F., Hrabal, R. (2008) Composition of the organic phosphorus fraction in basidiocarps of saprotrophic and mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2464–2467.

- Laliberté, E., Grace, J.B., Huston, M.A., Lambers, H., Teste, F.P., Turner, B.L., Wardle, D.A. (2013) How does pedogenesis drive plant diversity? *Trends Ecol.* 28(6), 331–340.
- Lambers, H., Raven, J.A., Shaver, G.R., Smith, S.E. (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends Ecol Evol* 23, 95–103
- Lehmann, J., Günther, D., Socorro Da Mota, M., Pereira De Almeida, M., Zech, W., Kaiser, K. (2001) Inorganic and organic soil phosphorus and sulfur pools in an amazonian multistrata agroforestry system. *Agroforest. Syst.* 53(2), 113–124.
- Liu, X., Meng, W., Liang, G., Li, K., Xu, W., Huang, L., Yan, J. (2014) Available phosphorus in forest soil increases with soil nitrogen but not total phosphorus: evidence from subtropical forests and a pot experiment. *PLoS One* 9:e88070
- Lobão, D.E., Setenta, W.C., Lobão, E.S.P., Curvelo, K., Valle, R.R. (2012) Cacaú cabruca-sistema agrossilvicultural tropical. In: Valle, R.R. (Ed.), *Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro*. CEPLAC/CEPEC, Brasília, pp. 467–506
- Makino, W., Cotner, J.B. (2004) Elemental stoichiometry of a heterotrophic bacterial community in a freshwater lake: implications for growth- and resource-dependent variations. *Aquat Microb Ecol* 34, 33–41
- Marklein, A.R., Houlton, B.Z. (2012) Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 193, 696–704.
- McGill, W.B., Cole, C.V. (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26, 267–268
- McLaren, T.I., Smernik, R.J., McLaughlin, M.J., McBeath, T.M., Kirby, J.K., Simpson, R.J., Guppy, C.N., Doolette, A.L., Richardson, A.E. (2015) Complex forms of soil organic phosphorus—a major component of soil phosphorus. *Environ. Sci. Technol.* 49, 13238–13245.
- Murphy, J., Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta* 27, 31–36.

- Myers, M.D., Leake, J.R. (1996) Phosphodiesterases as mycorrhizal P sources. II. Ericoid mycorrhiza and the utilization of nucleic acids as a phosphorus and nitrogen source by *Vaccinium macrocarpon*. *New Phytol* 132, 445–451.
- Nasto, M.K., Alvarez-Clare, S., Lekberg, Y., Sullivan, B.W., Townsend, A.R., Cleveland, C.C. (2014). Interactions among nitrogen fixation and soil phosphorus acquisition strategies in lowland tropical rain forests. *Ecol Lett* 17, 1282–1289.
- Nziguheba, G., Palm, C.A., Buresh, R.J., Smithson, P.C. (1988) Soil phosphorus fractions and adsorption as affected by organic and inorganic sources. *Plant Soil* 198, 159-168.
- Olander, L.P., Vitousek, P.M. (2000) Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49(2), 175–191.
- Rita, J.C.O., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Zaia, F.C., Nunes, D. A.D. (2013) Mineralization of organic phosphorus in soil size fractions under different vegetation covers in the north of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 37, 1207-1215.
- Sato, S., Comerford, N.B. (2006) Organic anions and phosphorus desorption and bioavailability in a humid Brazilian Ultisol. *Soil Sci.* 171, 695–705.
- Schneider, K.D., Cade-Menun, B.J., Lynch, D.H., Voroney, R.P. (2016) Soil phosphorus from organic and conventional forage fields. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 80, 328–340.
- Schroth, G., Lehmann, J., Rodrigues, M.R.L., Barros, E., Macêdo, J.L.V. (2001) Plant-soil interactions in multistrata agroforestry in the humid tropics. *Agroforest. Syst.* 53, 85–102.
- Schroth, G., Fonseca, G.A.B., Harvey, C.A., Vasconcelos, H.L., Gascon, C., Izar, A.M.N. (2004) *Agroforestry and biodiversity conservation in tropical landscapes*. Island Press, Washington, DC
- Soil Survey Staff (2014) *Soil survey field and laboratory methods manual*. In: Burt, R. (Eds), *Soil Survey Investigations Report n 51 Version 1.0*. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.

- Steidinger, B.S., Turner, B.L., Corrales, A., Dalling, J.W. (2015) Variability in potential to exploit different soil organic phosphorus compounds among tropical montane tree species. *Functional Ecology* 29, 121–130.
- Treseder, K., Vitousek, P. (2001) Effects of Soil Nutrient Availability on Investment in Acquisition of N and P in Hawaiian Rain Forests. *Ecology* 82(4), 946-954.
- Turner, B.L., (2008) Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of Ecology* 96, 698–702.
- Turner, B.J., Engelbrecht, B.M.J. (2011) Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry* 103, 297–315.
- Turner, B.L., Cheesman, A.W., Godage, H.Y., Riley, A.M., Potter, B.V.L. (2012) Determination of *neo*- and *D-chiro*-inositol hexakisphosphate in soils by solution ³¹P NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 46(9), 4994–5002.
- Vincent, A.G., Turner, B.L., Tanner, E.V.J. (2010) Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 48–57.
- Vitousek, P., Porder, S., Houlton, B.Z., Chadwick, O.A. (2010) Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecological Applications* 20, 5–15.
- Zaia, F.C., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Moço, M.K.S., Machado, R.C.R., Baligar, V.C. (2012) Carbon, nitrogen, organic phosphorus, microbial biomass and N mineralization in soils under cacao agroforestry systems in Bahia, Brazil. *Agroforest. Syst.* 86, 197–212.
- Young, E.O., Ross, D.S., Cade-Menun, B.J., Liu, C.W. (2013) Phosphorus speciation in riparian soils: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy and enzyme hydrolysis study. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 77(5), 1636-1647.

3.2. LEGUMINOSAS FLORESTAIS PODEM AUMENTAR A DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO NO SOLO? UMA LIGAÇÃO ENTRE OS CICLOS DE FÓSFORO E NITROGÊNIO EM AGROFLORESTAS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA NO BRASIL

RESUMO

Compreender o papel das leguminosas florestais para os ciclos de fósforo (P) e nitrogênio (N) em solos tropicais é relevante para a conservação das florestas naturais, bem como o manejo sustentável de agroflorestas com baixo *input* de P na região da Mata Atlântica no Brasil. Para tanto, utilizou-se o método de extração sequencial de Hedley a fim de determinar as frações de P do solo, assim como a extração de NaOH-EDTA em conjunto com a espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{31}P (^{31}P RMN) para determinar as espécies de P do solo. Foram selecionados os tratamentos, Sítio 1 (município de Valença): (1) 0% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais, (2) 25% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais, (3) 50% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais, (4) 75% de cobertura de *mix* de leguminosas florestais; Sítio 2 (município de Conceição de Macabú): (5) *Acacia auriculiformis*, (6) *Mimosa caesalpinifolia*, (7) floresta secundária, (8) pastagem; Sítio 3 (município de Seropédica): (9) *Acácia angustíssima*; (10) *Gliricidia sepium*; (11) *Pueraria phaseoloides* (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada e (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada. Esta pesquisa mostrou que o enriquecimento com leguminosas florestais inoculadas com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares, aumentou concentrações de P disponível, P-lábil, P-moderadamente lábil e P-ocluído. O fósforo total extraído em NaOH-EDTA e determinado pela solução de

espectroscopia de ^{31}P RMN (^{31}P RMN total) variou entre 193 e 467 mg kg⁻¹ (representando 37 a 83% do P total do solo), dos quais entre 50 e 200 mg kg⁻¹ foram identificados como P orgânico. A maior parcela do P orgânico foi encontrada na forma de ortofosfato monoéster (P-monoéster) em todos os sítios (variando entre 52,6 e 191,9 mg kg⁻¹). As concentrações de DNA variaram entre 4,1 e 17 mg kg⁻¹. A maioria do P inorgânico encontrada foi identificada como ortofosfato inorgânico (variando entre 124,3 e 237,6 mg kg⁻¹) e pirofosfato (variando entre 18,8 e 38,4 mg kg⁻¹). Não foram detectados fosfonatos, polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa em todos os sítios avaliados. A alta concentração de pirofosfato encontradas em todos os sítios com leguminosas florestais e adubação nitrogenada mostrou uma elevada ciclagem e acumulação de P através de micro-organismos do solo. O uso conjunto da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P e da extração sequencial de P do solo mostrou que as plantações de diferentes espécies de leguminosas florestais em áreas fortemente degradadas favorece uma elevada acumulação no solo de compostos orgânicos e inorgânicos de P do solo, através de uma ciclagem eficiente de P e N em solos tropicais fortemente intemperizados.

Palavras-chave: leguminosas florestais; fertilização nitrogenada, fósforo orgânico do solo, extração sequencial de fósforo; solução de espectroscopia de ^{31}P RMN.

ABSTRACT

CAN LEGUMINOUS TREES INCREASE SOIL PHOSPHORUS AVAILABILITY? A
LINK BETWEEN THE P AND N CYCLES IN TROPICAL FORESTS AND
AGROFORESTS OF BRAZIL

Understanding the role of leguminous trees for phosphorus (P) and nitrogen (N) cycling in tropical soils is relevant for conservation of natural forests, as well as the sustainable management of agroforests with low P input in the Atlantic Forest region of Brazil. For this, the Hedley sequential extraction method was used to determine the soil P fractions, as well as NaOH-EDTA extraction together with ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{31}P NMR) to determine the species of soil P. The treatments were selected, Site 1 (municipality of Valença): (1) 0% leguminous trees mix coverage, (2) 25% leguminous trees mix coverage, (3) 50% leguminous trees mix coverage (4) 75% leguminous trees mix coverage; Site 2 (municipality of Conceição de Macabú): (5) *Acacia auriculiformis*, (6) *Mimosa caesalpinifolia*, (7) secondary forest, (8) pasture; Site 3 (municipality of Seropédica): (9) *Acacia mangium*; (10) *Gliricidia sepium*; (11) *Pueraria phaseoloides*; (12) spontaneous vegetation with low input of nitrogen fertilizer and (13) spontaneous vegetation without nitrogen fertilization. This research showed that enrichment with forest legumes inoculated with diazotrophic bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi increased concentrations of available P, P-labile, P-moderately labile and P-occlude. The total phosphorus extracted in NaOH-EDTA and determined by the ^{31}P NMR spectroscopy ($^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total) ranged from 193 to 467 mg kg⁻¹ (representing 37 to 83% of the total soil P), of which between 50 and 200 mg kg⁻¹ were identified as organic P. The largest portion of organic P was found in the form of monoester (P-monoester)

orthophosphate at all sites (ranging from 52.6 to 191.9 mg kg⁻¹). DNA concentrations ranged from 4.1 to 17 mg kg⁻¹. The majority of the inorganic P found was identified as inorganic orthophosphate (ranging from 124.3 to 237.6 mg kg⁻¹) and pyrophosphate (ranging from 18.8 to 38.4 mg kg⁻¹). No phosphonates, organic and / or long chain inorganic polyphosphates were detected at all sites evaluated. The high concentration of pyrophosphate found in all sites with forest legumes and nitrogen fertilization showed a high cycling and P accumulation through soil microorganisms. The combined use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and sequential soil P extraction showed that plantations of different leguminous trees species in strongly degraded areas favor a high accumulation of organic and inorganic P compounds in these soils through of efficient P and N cycling in strongly weathered tropical soils.

Keywords: leguminous trees; nitrogen fertilization, soil organic phosphorus, sequential phosphorus extraction; solution ³¹P NMR spectroscopy

INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, e ao longo dos anos, as florestas tropicais estão sendo convertidas em pastagens e monoculturas agrícolas. No Brasil o resultado é o aparecimento de extensas áreas em ecossistemas fragmentados no bioma Mata Atlântica (Lobão et al., 2012). Um dos principais mecanismos adotados a fim de conciliar agricultura e a segurança alimentar com a proteção de ecossistemas nativos, é a adoção de sistemas agroflorestais. A adoção de agroflorestas permite uma melhoria na ciclagem de nutrientes, água e conservação do solo, além de uma diversidade biológica mais rica e interações tróficas mais complexas em relação aos sistemas tradicionais de produção de alimentos (Schroth et al., 2001; 2004). Nesse sentido, o enriquecimento com leguminosas florestais de ecossistemas tropicais fortemente degradados quanto ao solo e sua biodiversidade, é um dos principais mecanismos para a retomada da eficiência na ciclagem de nutrientes por processos biológicos, e o que possibilita uma acentuada redução dos custos ambientais na região da Mata Atlântica no Brasil.

Nitrogênio (N) e fósforo (P) são considerados um dos principais fatores nutricionais limitantes da produtividade primária na maioria dos ecossistemas terrestres (Lambers et al., 2008; Vitousek et al., 2010). Contudo, a grande limitação desses dois elementos é distinta com a pedogênese. N tende a limitar a produtividade de plantas em solos jovens, enquanto P torna-se cada vez mais limitante em solos fortemente intemperizados (Laliberté et al., 2013). Em florestas tropicais predominam solos fortemente intemperizados (Gama-Rodrigues et al., 2014), nos quais ocorre uma elevada abundância de espécies de leguminosas florestais fixadoras de N_2 em associação com bactérias diazotróficas em comparação as florestas das zonas temperadas e boreal, a despeito das condições gerais de enriquecimento de N de tais ecossistemas tropicais (Houlton et al., 2008; Nasto et al., 2014). Nessas condições ambientais com uma elevada abundância de espécies de leguminosas florestais, a hipótese corrente é que a adição de N_2 via fixação biológica pode permitir aos microorganismos do solo produzir uma maior concentração de enzimas fosfatases envolvidas na clivagem do P orgânico (P_o) do solo e assim contribuir para o aumento do suprimento local de P inorgânico (P_i) para as plantas (Nasto et al., 2014). Os solos tropicais florestais e agroflorestais podem apresentar elevados estoques de P_o (Turner e Engelbrecht, 2011; Zaia et al., 2012). Nesse ponto, as leguminosas florestais podem estender o seu sistema radicular ou até mesmo se associar a fungos micorrízicos arbusculares (FMA) a fim de ampliar significativamente à área de solo a ser explorado e assim aumentar a aquisição de P_o (Lambers et al., 2008).

Este tipo de interação N *versus* P possibilitaria a persistência das leguminosas fixadoras de N_2 em ecossistemas tropicais ricos em N e matéria orgânica do solo (MOS), mas substancialmente limitados por P. Assim, o aumento da disponibilidade de P afeta a quantidade de N dentro do ecossistema, enquanto o aumento da atividade das enzimas fosfatases afeta a taxa de ciclagem, porém não as concentrações totais de P dentro do ecossistema (Vitousek et al., 2010; Marklein e Houlton, 2012; Liu et al., 2014). Entretanto, trabalhos recentes não mostram o quanto à aceleração da ciclagem de P afeta os estoques de P_o na camada superficial do solo; pois, o incremento contínuo da disponibilidade de P via aumento da atividade da enzima da fosfatase levaria ao esgotamento da reserva de P_o no solo, limitando o desenvolvimento do ecossistema. Dessa maneira, o efeito das

leguminosas deveria garantir a reposição das reservas de P_o simultaneamente à atividade da enzima da fosfatase. Além disso, todos esses estudos trabalham na suposição do aumento de P na solução do solo, ou seja, o aumento do fluxo de P imediatamente mineralizado e prontamente disponível na solução às plantas e microrganismos. A complexa interação N *versus* P ainda apresentam questões em aberto em ecossistemas florestais tropicais.

O objetivo do estudo foi comparar os *pools* de P_o do solo que foram determinados pelo fracionamento sequencial (baseado na solubilidade química das formas de P) com os resultados obtidos através da solução de espectroscopia de ^{31}P RMN (baseado na natureza química das espécies de P), e assim, responder as seguintes questões: (1) Leguminosas florestais fixadoras de N afetam de maneira distinta as frações e espécies de P no solo? (2) Haveria aumento da reserva de P_i lábil com decréscimo de P_o lábil, com as demais frações e espécies de P não sendo afetadas? (3) A reserva de P total do solo se manteria constante ou haveria decréscimo? (4) A fertilização mineral de N proporcionaria o mesmo efeito das leguminosas florestais sobre a disponibilidade de P no solo? A resposta para essas questões melhorará a compreensão em como a disponibilidade de P é influenciada pelo uso de leguminosas florestais em ecossistemas florestais em solos fortemente intemperizados na região tropical.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e descrição dos sítios

As áreas de estudo estão localizadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, na região do bioma Mata Atlântica, nas fazendas “Fazenda Santo Antônio da Aliança” no município de Valença (22°22'22" S, 43°47'23" W) o clima é classificado como *Cwa* segundo Köppen, com temperatura média de 20.4°C, e pluviosidade média anual de 1,466 mm; na “Fazenda Carrapeta” no município de Conceição de Macabú (22°05'04" S, 41°52'07" W), e na área experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), no Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB) no município de Seropédica (22°44'29" S, 43°42'19" W), ambas as áreas de estudo estão situadas em clima tropical úmido do tipo *Aw* segundo Köppen, com

uma precipitação média anual bem distribuída de 1,400 mm e temperatura média anual de 25°C. Uma breve descrição dos sítios analisados com os 13 tratamentos de estudo segue:

No sítio 1, presente no município de Valença, foram plantadas leguminosas arbóreas fixadoras de N₂ de rápido crescimento como *Acacia auriculaeformis*, *Acacia mangium*, *Mimosa caesalpiniiifolia*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Pseudosamanea guachapele*. As leguminosas arbóreas foram distribuídas em tratamentos com proporções 0% (tratamento 1), 25 % (tratamento 2), 50 % (tratamento 3) e 75% (tratamento 4) do total de plantas utilizadas por parcela. Os tratamentos foram inoculados com estirpes selecionadas de bactérias fixadoras de N₂ atmosférico (*mix* das cepas BR 3465, BR 3609, BR 3407 e BR 3446) e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (*mix* de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*). Espécies florestais não leguminosas como o cedro africano (*Cedrus atlantica*), ipê amarelo (*Tabebuia serratifolia*) e sobrasil (*Colubrina glandulosa*) foram plantadas. As parcelas experimentais, com idade de 14 anos, possuem a dimensões de 35 x 25 m e dispostas em blocos de quatro tratamentos e três repetições. O espaçamento adotado foi de 2 x 2 m em quincôncio totalizando 204 árvores plantadas em curva de nível, com a aplicação na cova de 100 g de fosfato de rocha, 10 g de composto de micronutrientes (12 % de Zn, 1,6 % de Cu, 4 % de Mn e 1,8 % de B), 25 g de sulfato de potássio e 25 g de calcário dolomítico.

No sítio 2, presente no município de Conceição de Macabu, foram plantados plantações puros das leguminosas florestais de acácia (*Acacia auriculiformis*) (tratamento 5) e sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*) (tratamento 6), inoculadas com estirpes selecionadas de bactérias fixadoras de N₂ atmosférico (BR 3465 e BR 3609 para acácia; BR 3407 e BR 3446 para o sabiá) e fungos micorrízicos arbusculares (*mix* de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* em ambas as espécies de leguminosas), ambas as áreas possuem 19 anos de idade, e histórico anterior de uso da terra como uma pastagem degradada. Um fragmento florestal de Mata Atlântica em sucessão secundária, com espécies em diferentes estádios sucessionais (tratamento 7) com 40 anos. Uma pastagem degradada (tratamento 8) com predomínio de *Melinis minutiflora*, *Paspalum maritimum* e *Imperata brasiliensis*, e utilizada para pousio de animais com 40 anos.

No sítio 3, presente no município de Seropédica, foram plantadas leguminosas florestais fixadoras de nitrogênio de rápido crescimento como acácia (*Acácia angustíssima*) (tratamento 9), gliricídia (*Gliricidia sepium*) (tratamento 10), e uma leguminosa forrageira como a puerária (*Pueraria phaseoloides*) (tratamento 11). Os tratamentos foram inoculados com estirpes selecionadas de bactérias fixadoras de N₂ atmosférico (*mix* das cepas BR 3465, BR 3609, BR 3407 e BR 3446) e fungos micorrízicos arbusculares (*mix* de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum*). Um fragmento com vegetação espontânea com adubação nitrogenada (tratamento 12) e um fragmento com vegetação espontânea sem adubação nitrogenada (tratamento 13), formados predominantemente por capim colônio (*Panicum maximum*). Os tratamentos possuem com 14 anos de idade. As leguminosas florestais foram dispostas nas entrelinhas de banana (*Musa spp.*) e açaí (*Euterpe oleraceae*). As bananas foram transplantadas em 2005 com espaçamento de 3 x 3m. Em 2006 foi plantado Mogno africano (*Kaya senegalensis*), no centro das aleias de leguminosas, correspondendo a um indivíduo por parcela. As parcelas foram dispostas com dimensões de 9 x 9 m em blocos de cinco tratamentos e quatro repetições. Nos plantações do açaí e das leguminosas foram aplicados 100 g de fosfato de rocha (cerca de 30 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e 10 g de FTE-BR12 na cova de cada cultura. No plantio das bananeiras foram aplicados 5 kg de esterco bovino por cova (cerca de 120 kg ha⁻¹ de N), e repetida três meses após o plantio sob a cobertura. Em 2006, foram aplicados 300 g de fosfato (cerca de 130 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e 50 g de potássio (cerca de 60 kg ha⁻¹ de K₂O) em todos os tratamentos, e de 45 g de ureia (cerca de 50 kg ha⁻¹ de N) apenas nas parcelas referentes ao tratamento com N mineral.

Foram selecionados nove tratamentos em Latossolo Vermelho-Amarelo (sítio 1: Valença; sítio 3: Seropédica) e quatro tratamentos em Argissolo Vermelho-Amarelo (sítio 2: Conceição de Macabú) classificados segundo o Sistema Brasileiro de Classificação (Embrapa, 2013), e equivalentes ao *Oxisol* e *Ultisol* em *USDA Soil Taxonomy* (Soil Survey Staff, 2014). As parcelas fixas foram separadas entre si por pelo menos 100 m de distância com uniformidade em termos de homogeneidade do solo, declividade, histórico do uso da terra, densidade e idade das árvores. Em cada parcela foi retirada uma amostra composta de solo proveniente de 15 amostras simples na profundidade de 0-10 cm.

Caracterização físico-química do solo

As amostras de solo foram secas ao ar, homogeneizadas, preparadas e passadas através de peneiras de 2 mm. Essas amostras foram utilizadas para caracterização física e química e determinação de frações de P. O carbono do solo (C) e nitrogênio total (N) foram determinados através de combustão seca em sistema analisador elementar automatizado *PerkinElmer's Series II 2400 CHNS/O Analyzer* (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos físicos e químicos do solo (0-10 cm) sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil

Tratamento	Argila	pH (H ₂ O)	Mehlich-P	P	C	N	SB	T
	%		mg kg ⁻¹					
1	30,5	5,4	3,7	490	2,3	0,20	3,7	4,2
2	30,5	5,4	4,3	450	2,5	0,20	4,0	4,5
3	30,5	5,3	4,7	490	2,4	0,24	3,6	4,2
4	30,5	5,2	6,7	530	2,2	0,31	5,5	6,1
5	18,5	4,8	2,8	520	3,2	0,10	1,4	6,9
6	29,1	4,5	2,4	545	3,1	0,20	0,9	6,3
7	38,6	4,2	2,8	595	3,1	0,13	0,4	5,8
8	28,5	4,7	2,0	525	2,9	0,20	0,2	5,6
9	31,8	4,4	1,2	495	1,5	0,13	3,5	10,4
10	33,0	4,3	2,3	525	1,2	0,12	3,8	10,6
11	32,0	4,3	3,1	450	1,1	0,10	2,9	10,0
12	32,5	4,4	3,8	675	1,3	0,12	3,9	10,7
13	36,2	4,4	1,1	445	1,2	0,11	3,2	10,7

P: fósforo total do solo foi extraído por digestão com H₂SO₄-H₂O₂. SB: soma de bases. T: capacidade de troca de cátions a pH 7. Sítio 1: (1) 0% de leguminosas fixadoras de N₂; (2) 25% de leguminosas fixadoras de N₂; (3) 50% de leguminosas fixadoras de N₂; (4) 75% de leguminosas fixadoras de N₂; Sítio 2: (5) acácia (*Acacia auriculiformis*); (6) sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*); (7) floresta secundária; (8) pastagem; Sítio 3: (9) acácia (*Acácia angustíssima*); (10) gliricídia (*Gliricidia sepium*); (11) Puerária (*Pueraria phaseoloides*); (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada; (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada

O teor de argila foi obtido com o método da pipeta após pré-tratamento com 35% H₂O₂ e 1.0 mol L⁻¹ HCl para remover a matéria orgânica do solo e carbonatos (Embrapa, 2011). O pH foi mensurado com um eletrodo de vidro em uma suspensão de água 1:2.5. Ca, Mg e Al trocáveis foram extraídos com 1.0 mol L⁻¹ KCl, K foi extraído com Mehlich-1 e as concentrações de Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ nos extratos foram determinados por espectrofotômetro de absorção atômica e as concentrações de K

foram determinadas por espectrofotômetro de emissão de chama. A acidez potencial (H + Al) extraída com acetado de Ca a pH 7. A soma de bases (SB) correspondeu a soma das concentrações de $\text{Ca}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Mg}^{2+}$ e a capacidade de troca de cátions a pH 7 (T) por $\text{SB} + (\text{H} + \text{Al})$. O P total do solo foi extraído com a digestão em $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ de 5.0 g de solo e determinado através de colorimetria para P reativo ao molibdato de amônio em pelo método de Murphy e Riley (1962) em SPECORD 210 PLUS (*Analytik Jena, Jena, DE*).

Fracionamento sequencial de P do solo

As frações de P em amostras de solo foram extraídas sequencialmente utilizando o método de Hedley et al. (1982), que separa P de solo em cinco frações inorgânicas, três orgânicas e uma residual. O procedimento de extração foi iniciado com a pesagem de 0.5 g de solo, seco ao ar, em tubos falcon de 15 mL. As frações de P do solo foram extraídas sequencialmente utilizando a resina trocadora de ânions (RTA) com dimensões de 1 x 5 cm (ANION 204UZRA), NaHCO_3 0.5 mol L⁻¹ a pH 8.5, NaOH 0.1 mol L⁻¹, HCl 1.0 mol L⁻¹ e NaOH 0.1 mol L⁻¹ com ultrasonificação por 2 minutos. O fósforo residual (residual-P) foi obtido por digestão do solo com $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ em bloco digestor a 200 °C. Cada etapa da extração foi realizada durante 16 horas em agitador horizontal a 120 rpm e seguida de centrifugação a 5,000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi reservado e adicionaram-se 5 mL de NaCl 0.5 mol L⁻¹ aos solos remanescentes nos tubos, seguido de uma nova centrifugação a 5,000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi adicionado aos recipientes do extrato anterior. O fósforo total (P_t) em cada extrato de NaHCO_3 0.5 mol L⁻¹, NaOH 0.1 mol L⁻¹ e NaOH 0.1 mol L⁻¹ com ultrasonificação foi determinado em uma alíquota do extrato proveniente das etapas iniciais de extração que foi autoclavada a 121°C e 103 KPa por 3 h com 1 mL de H_2SO_4 24 mol L⁻¹ e 10 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Após resfriamento, o volume foi completado para 20 mL com água destilada. O P_i em extratos de resina, HCl, residual-P e P_t foram determinados a 880 nm pelo método de Murphy e Riley (1962). O P_i em extratos de NaHCO_3 , NaOH e NaOH com ultrasonificação foi determinado a 700 nm pelo método de Dick e Tabatabai (1977). O P_o foi calculado como a diferença entre P_t e P_i em cada extrato ($P_o = P_t - P_i$). Os extratos resultantes das extrações foram analisados através de colorimetria para P reativo ao molibdato de amônio em SPECORD 210 PLUS

(Analytik Jena, Jena, DE). Os valores das frações de P em amostras de solo dos sítios 2 e 3 foram parcialmente obtidos de Furlan (2015).

As frações de P do solo foram agrupadas segundo o seu grau de disponibilidade à cobertura vegetal (Aleixo et al., 2017): O P lábil (resina- P_i + NaHCO_3 - P_i + NaHCO_3 - P_o) representa formas prontamente disponíveis e adsorvidas com menor energia ao solo. O P moderadamente lábil (NaOH - P_i + NaOH - P_o) representa formas adsorvidas com mais energia na superfície dos óxidos de Fe e Al. O P-ocluído (sonic- P_i + sonic- P_o) representa o P retido no interior dos agregados. A fração de HCl - P_i representa as formas de P associado ao Ca (Ca-P, apatita), de disponibilidade muito restrita. A fração de residual-P corresponde às formas estáveis de P_o e formas de P_i relativamente insolúveis que não puderam ser extraídas pelas etapas anteriores.

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P

O P do solo (0-10 cm) foi extraído agitando 4.0 g de solo com 32 ml de uma solução contendo $0.25 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH} + 50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}$ durante 10 h a 25°C . Escolhemos um tempo de extração de 10 h para melhorar a recuperação de P total, e limitar assim a degradação dos compostos de P no extrato final. Após este passo, cada extrato foi centrifugado a 5,000 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de ésteres de celulose (nitrato 75-80% e acetato) de $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore Inc., Massachusetts, USA) para remover quaisquer precipitados ou materiais que não solubilizaram, foram congelados com nitrogênio líquido, liofilizados (~52h) e armazenados. Uma alíquota de cada extrato foi analisada quanto à digestão de P total em autoclave a 121°C e 103 KPa por 3 horas com 1 mL de H_2SO_4 24 mol L^{-1} e 10 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ e posterior análise por colorimetria para P reativo ao molibdato de amônio a 880 nm pelo método de Murphy e Riley (1962) em SPECORD 210 PLUS (Analytik Jena, Jena, DE), esse parâmetro de P de solo foi descrito como $P_{\text{NaOH-EDTA total}}$.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{31}P foi realizada solubilizando 200 mg de cada extrato liofilizado com 0.9 ml contendo $0.25 \text{ mols L}^{-1} \text{ NaOH} + 50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}$, 0.1 ml de óxido de deutério (D_2O) e 0.1 ml de uma solução de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido metilenodifosfônico (MDPA) como padrão interno,

cada extrato foi centrifugado e depois transferido para um tubo de RMN de 5mm. Os espectros de solução ^{31}P RMN foram adquiridos com desacoplamento de prótons e operando a 202,446 MHz usando um Bruker Avance DRX 500 MHz (Bruker, DE), utilizando um pulso de 6,0 μs (30°), com tempo de aquisição de 0.4 s, tempo de relaxamento de 0.5 s e operando a 21°C . Aproximadamente 30,000 *scans* foram realizados para cada amostra. Na literatura tempos T1 mais longos foram sugeridos (Cade-Menun 2015; 2017), entretanto, em nossa medida os tempos de aquisição e de relaxamento foram intencionalmente breves. Contudo, para o presente estudo realizamos testes em uma amostra representativa em diferentes condições para realizar a calibração dos comprimentos do pulso ^{31}P RF no espectrômetro antes da realização dos nossos experimentos; além disso, mensuramos os valores T1 em uma amostra de extratos aquosos de solos em NaOH-EDTA com conhecida concentração de P em diferentes testes para medir o intervalo de valores T1 no pico de maior amplitude no espectro gerado com um pulso de 30° como recomendado por Cade-Menum and Liu (2014) para que 99% dos átomos de fósforo retornem ao equilíbrio. Os resultados mostraram que apenas um pequeno desvio na intensidade do sinal, principalmente para o ortofosfato inorgânico, DNA e Pirofosfato, entre tempos curtos e longos, o que diminui a possibilidade de superestimação das concentrações de *ortho*-P e subestimação das concentrações de P-diéster.

Não obtivemos espectros replicados para cada extrato de solo. Os desvios químicos dos sinais (δ) foram determinados em partes por milhão (ppm) em relação a um padrão externo de H_2PO_4 a 85%. A concentração das espécies de P foi calculada multiplicando sua contribuição relativa ao sinal de RMN total pela concentração de MDPA como referência interna e padrão de concentração (17.56 δ ppm). Os espectros foram processados com o alargamento da linha de 5 Hz. Todas as áreas com processamento e pico espectral foram calculadas por meio de integração matemática utilizando o *Delta NMR Software* (Jeol Resonance Inc., Tokyo, JP). Os sinais atribuídos aos compostos P foram baseados em relatos da literatura de extratos de solo NaOH-EDTA, e que foram interpretados como sugerido por Cade-Menun (2015) e Doolette et al. (2009; 2011). Foi calculada e então comparada a proporção relativa de cada composto de P detectado nos $^{31}\text{P}_i$ RMN total (soma de *ortho*-P e pirofosfato) e $^{31}\text{P}_o$ RMN total (soma de P-monoéster e P-diéster) em relação ao $\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}}$ total, assim como a proporção dos $^{31}\text{P}_i$ RMN e $^{31}\text{P}_o$ RMN total

na composição do P total do solo obtido por digestão em $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Turner e Engelbrecht, 2011).

Análise estatística

Os tratamentos analisados nos sítios 1 e 3 foram considerados como um efeito-fixado devido a diversas causas de variação. Para o sítio 2 (Conceição de Macabú) adotou-se a pseudo-repetição como em trabalhos recentes em sistemas florestais e agroflorestais (Fontes et al., 2014; Aleixo et al., 2017). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e à análise de variância (ANOVA). Os dados foram transformados por \sqrt{X} quando não distribuídos normalmente (determinado por Kurtosis para valores significativamente diferentes de zero, $p < 0.05$). O teste de médias de *Tukey* ($p = 0.05$) foi utilizado para os dados obtidos com o fracionamento sequencial de P do solo. Os compostos de P do solo extraídos em NaOH-EDTA e determinados com ^{31}P RMN, fracionamento químico de P e as propriedades químicas e físicas dos solos foram analisadas pela correlação de Pearson utilizando o software R (www.r-project.org).

RESULTADOS

Fracionamento de P do solo

No sítio 1 (Valença) ocorreu aumento significativo dos teores de todas as frações de P no solo na maior densidade de plantio de leguminosas arbóreas – 75% (tratamento 4) (Tabela 2). Entretanto, a distribuição relativa de cada fração de P em relação ao $\text{P-total}_{(\text{frac})}$ foi similar em todos os tratamentos. Assim, do $\text{P-total}_{(\text{frac})}$, em média, a fração de resina- P_i correspondeu a 0.5%, a fração de $\text{NaHCO}_3\text{-P}_i$ 1.2%, a fração de $\text{NaHCO}_3\text{-P}_o$ 3.3%, a fração de NaOH-P_i 9%, a fração de NaOH-P_o 16.5%, a fração de sonic-P_i 11,4%, a fração de sonic-P_o 4.7%, a fração de HCl-P_i 1.1% e a fração de resíduo-P 52.5%. O $\text{P}_o\text{-total}_{(\text{frac})}$ ($\text{NaHCO}_3\text{-P}_o + \text{NaOH-P}_o + \text{sonic-P}_o$) representou em média 24.5% do $\text{P-total}_{(\text{frac})}$, e o $\text{P}_i\text{-total}_{(\text{frac})}$ ($\text{NaHCO}_3\text{-P}_i + \text{NaOH-P}_i +$

sonic-P_i + HCl-P_i) representou 23.1%. Assim, o P geoquímico (P_i-total_(frac) + resíduo-P) constituiu ao redor de 75.6% do P-total_(frac).

No tratamento 4, os maiores incrementos relativos foram nas frações de HCl-P_i (+49.3%), NaOH-P_o (+45.1%), resina-P_i (+42.7%) e NaHCO₃-P_i (+35.2%). Nas demais frações de P o incremento relativo variou na faixa de 16.7% (resíduo-P) a 23.7% (sonic-P_o). O incremento relativo do P_o-total_(frac) foi 37.5%, do P_i-total_(frac) foi 22.1% e do P-total_(frac) foi 22.9%. Houve incremento relativo de 27.3% da fração de P lábil (resina-P_i + NaHCO₃-P_i + NaHCO₃-P_o), 34.8% da fração de P moderadamente lábil (NaOH-P_i + NaOH-P_o), 21.2% da fração de P ocluso (sonic-P_i + sonic-P_o), e 17.3% da fração de P estável (HCl-P_i + residual-P). O P_o-total_(frac) correspondeu a 64.8%, 67.4% e 30%, respectivamente das frações de P lábil, P moderadamente lábil e P ocluso.

Nos tratamentos avaliados no sítio 2 (Conceição de Macabú) houve ampla variação significativa dos teores de todas as frações de P entre as coberturas vegetais (Tabela 2). Nas leguminosas arbóreas ocorreram aumentos significativos em todas as frações de P lábil (resina-P_i, NaHCO₃-P_i e NaHCO₃-P_o) em relação à pastagem. Ocorreram também aumentos significativos nas frações de NaOH-P_i, HCl-P_i e resíduo-P. A floresta secundária apresentou valores superiores e, ou similares estatisticamente em relação às leguminosas arbóreas para quase todas as frações de P, exceto para a fração de NaOH-P_i em relação ao sabiá. Assim, as duas leguminosas arbóreas (tratamentos 5 e 6) apresentaram teores superiores significativos de P_i-total_(frac) em relação à pastagem, mas similar à floresta secundária.

A acácia (tratamento 5) apresentou o menor teor de P_o-total_(frac), o sabiá (tratamento 6) e a pastagem foram similares entre si, e todas essas coberturas foram inferiores à floresta secundária. A fração de resina-P_i variou de 0.2 a 0.5% do P-total_(frac), a fração de NaHCO₃-P_i variou de 0.5 a 1.3%, a fração de NaHCO₃-P_o variou de 2.0 a 4.3%, a fração NaOH-P_i variou de 7.4% a 9.9%, a fração de NaOH-P_o variou de 12.1 a 16.9%, a fração de sonic-P_i variou de 3.9 a 5.4%, a fração de sonic-P_o variou de 1.5% a 4.2%, a fração de resíduo-P variou de 61.3 a 65.7%, enquanto a fração de HCl-P_i variou em torno de 0.1%. O P_o-total_(frac) representou 17.2 a 25% do P total extraído, e o P_i-total_(frac) representou 12.3 a 18.2%. Assim, o P geoquímico constituiu ao redor de 78.4% do P-total_(frac). Para o tratamento com plantio de acácia,

a proporção de $P_o\text{-total}_{(frac)}$ foi 66.2% da fração de P lábil, e em média 76.4% nas demais coberturas vegetais. Nas duas leguminosas arbóreas, o $P_o\text{-total}_{(frac)}$ correspondeu em média 55.5% da fração de P moderadamente lábil, enquanto na pastagem e floresta secundária o $P_o\text{-total}_{(frac)}$ foi em média 68.9%. O $P_o\text{-total}_{(frac)}$ correspondeu 22.1%, 36.9%, 44.1% e 46.9% da fração de P ocluso, respectivamente na acácia, sabiá, pastagem e floresta secundária. Nos tratamentos avaliados no sítio 3 (Seropédica) houve aumentos significativos dos teores de todas as frações de P do solo, à exceção para a fração de $NaHCO_3\text{-P}_o$, com a aplicação da adubação mineral de N e sob o plantio de gliricídia em relação à vegetação espontânea, acácia (sítio 9) e puerária (sítio 11) (Tabela 2). A adubação mineral de N foi superior (sítio 12) significativamente a gliricídia (sítio 10) em relação apenas as frações de $NaOH\text{-P}_i$, $sonic\text{-P}_i$, $HCl\text{-P}_i$ e resíduo-P. A gliricídia foi similar à acácia e a puerária na fração de $NaOH\text{-P}_o$, e na fração de $sonic\text{-P}_o$ não houve distinção estatística entre a gliricídia e as demais coberturas vegetais.

A fração de resina- P_i variou de 0.8 a 1% do $P\text{-total}_{(frac)}$, a fração de $NaHCO_3\text{-P}_i$ variou de 3.4 a 4.7%, a fração de $NaHCO_3\text{-P}_o$ variou de 2.2 a 3.7%, a fração de $NaOH\text{-P}_i$ variou de 15.2 a 18.3%, a fração de $NaOH\text{-P}_o$ variou de 15.6 a 17.3%, a fração de $sonic\text{-P}_i$ variou de 4.7 a 5%, a fração de $HCl\text{-P}_i$ variou de 0.3 a 0.7%, e a fração de resíduo-P de 47.2 a 52.7%. O $P_o\text{-total}_{(frac)}$ representou 22.7 a 25.2% do P total extraído, e o P_i total representou 24.7 a 29.7%. Assim, o P geoquímico constituiu ao redor de 76.1% do $P\text{-total}_{(frac)}$. Nos tratamentos de adubação mineral de N e plantio de gliricídia a proporção média de $P_o\text{-total}_{(frac)}$ foi 30% da fração de P lábil, enquanto que nos demais tratamentos foi 45%. Na fração de P moderadamente lábil o $P_o\text{-total}_{(frac)}$ correspondeu em média 47.8% nos tratamentos de adubação mineral de N e gliricídia, enquanto que nos demais tratamentos foi 52%. O $P_o\text{-total}_{(frac)}$ correspondeu em média 46.6% da fração de P ocluso em todos os tratamentos.

Tabela 2. Frações de P (mg Kg⁻¹) do solo (0–10 cm) sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil

Tratamentos	P lábil			P mod. lábil		P ocluso		P-Ca	P não lábil	P _i -total _(frac)	P _o -total _(frac)	P-total _(frac)
	resina-P _i	NaHCO ₃ -P _i	NaHCO ₃ -P _o	NaOH-P _i	NaOH-P _o	sonic-P _i	sonic-P _o	HCl-P _i	residual-P			
1	3,1c	7,8c	22,7b	62,3c	105,5c	77,8d	33,3b	6,9b	364,6d	158,0d	161,4b	684,0d
2	3,0c	7,8c	23,3b	64,3bc	107,8c	82,9c	33,3b	7,3b	382,7c	165,3c	164,4b	712,4c
3	3,6b	9,0b	24,5b	68,8b	128,2b	87,8b	33,3b	8,2b	404,1b	177,4b	186,0b	767,6b
4	4,5a	10,6a	27,8a	74,2a	153,1a	93,3a	41,1a	10,3a	425,3a	192,9a	222,0a	840,2a
Médias	3,6	8,8	24,6	67,4	123,7	85,5	35,3	8,2	394,2	173,4	183,5	751,1
CV(%)	0,6	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
5	3,8a	9,5a	25,9b	78,7ab	88,1c	39,4bc	11,2c	1,0b	468,9c	132,3a	125,2c	726,3c
6	3,6a	7,3b	37,1a	85,5a	118,5b	43,9ab	25,7b	1,2ab	538,6b	141,5a	181,3b	861,4b
7	3,1a	9,6a	41,2a	71,7bc	159,5a	45,6a	40,2a	1,4a	589,8a	131,3a	240,9a	962,0a
8	1,6b	3,9c	16,7c	62,9c	138,3ab	32,0c	25,3b	0,6c	538,6b	100,9b	180,2b	819,7b
Médias	3,0	7,6	30,2	74,7	126,1	40,2	25,6	1,0	534,0	126,5	181,9	842,3
CV(%)	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1	0,4	0,3	0,1	0,1	0,2	0,1
9	6,7b	24,1b	25,1a	108,7c	118,7bc	33,5c	28,0b	2,2c	346,9c	175,1c	171,8b	693,9c
10	8,8a	40,2a	20,9a	155,9b	137,2ab	42,3b	36,3ab	5,3b	404,5b	252,5b	194,5ab	851,5b
11	6,4b	26,4b	26,8a	108,6c	123,8bc	33,8c	29,8b	2,3c	357,6c	177,5c	180,4b	715,5c
12	9,0a	41,3a	21,2a	169,8a	161,3a	46,7a	43,4a	6,3a	446,1a	273,0a	225,9a	945,0a
13	5,7b	23,4b	22,8a	107,6c	108,3c	32,8c	26,6b	2,1c	366,1c	171,6c	157,7b	695,4c
Médias	7,3	31,1	23,4	130,1	129,9	37,8	32,8	3,7	384,3	210,0	186,1	780,3
CV(%)	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,5	0,1	0,2	0,1	0,1

Na mesma coluna, valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($p = 0.05$). P_i-total_(frac): soma de resina-P_i, NaHCO₃-P_i, NaOH-P_i, sonic-P_i e HCl-P_i. P_o-total_(frac): soma de NaHCO₃-P_o, NaOH-P_o e sonic-P_o. P-total_(frac): soma de P_i-total_(frac) e P_o-total_(frac). Sítio 1: (1) 0% de leguminosas fixadoras de N₂; (2) 25% de leguminosas fixadoras de N₂; (3) 50% de leguminosas fixadoras de N₂; (4) 75% de leguminosas fixadoras de N₂; Sítio 2: (5): acácia (*Acacia auriculiformis*); (6) sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*); (7) floresta secundária; (8) pastagem; Sítio 3: (9) acácia (*Acácia angustissima*); (10) gliricídia (*Gliricidia sepium*); (11) puerária (*Pueraria phaseoloides*); (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada; (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada.

Quanto às correlações entre as frações de P do solo e atributos químicos e físicos do solo, o SOC foi correlacionado com as frações resina- P_i ($r = -0.84$, $p < 0.01$, $n = 9$), $\text{NaHCO}_3\text{-}P_i$ ($r = -0.88$, $p < 0.01$, $n = 9$), $\text{NaOH-}P_i$ ($r = -0.80$, $p < 0.01$, $n = 9$), resíduo-P ($r = 0.72$, $p < 0.05$, $n = 9$), e com as formas de P moderadamente lábil ($r = -0.72$, $p < 0.05$, $n = 9$) e P geoquímico ($r = 0.75$, $p < 0.05$, $n = 9$). O N-total foi correlacionado com o sonic- P_i ($r = 0.75$, $p < 0.05$, $n = 9$) e com o P-ocluso ($r = 0.72$, $p < 0.05$, $n = 9$). A fração argila foi correlacionada com $\text{NaOH-}P_o$ ($r = 0.76$, $p < 0.05$, $n = 9$), sonic- P_o ($r = 0.75$, $p < 0.05$, $n = 9$) e $P\text{-total}_{(\text{frac})}$ ($r = 0.75$, $p < 0.05$, $n = 9$). O pH foi correlacionado com o sonic- P_i ($r = 0.75$, $p < 0.05$, $n = 9$) e com o P geoquímico ($r = 0.71$, $p < 0.05$, $n = 9$).

Espectroscopia de ^{31}P RMN do solo

Identificação de P

A partir da solução de espectroscopia de ^{31}P RMN foram detectados diferentes compostos no solo de diferentes plantações de leguminosas florestais, floresta secundária e pastagem (figuras 1, 2 e 3). Os espectros foram mostrados de modo a permitir uma comparação direta entre os tratamentos dentro de cada sítio analisado versus a intensidade dos sinais característicos. O P inorgânico foi detectado como *orto*-P ($6,0 \delta \text{ ppm}$, $n = 9$) e pirofosfato (média \pm erro padrão, $-4,89 \pm 0,02 \delta \text{ ppm}$, $n = 9$). A região de P-monoéster dos espectros variou de $5,81$ a $3,0 \delta \text{ ppm}$, $n = 9$. Picos específicos nesta região foram detectados a $4,89 \pm 0,07$; $4,69 \pm 0,02$; $4,49 \pm 0,03$; $4,38 \pm 0,01$; $4,22 \pm 0,01$; $4,2 \pm 0,02$; $3,9 \pm 0,02$; $3,71 \pm 0,03$; $3,51 \pm 0,02 \delta \text{ ppm}$ $n = 9$; $5,81 \pm 0,09 \delta \text{ ppm}$ $n = 6$; $3,9 \pm 0,02 \delta \text{ ppm}$ $n = 5$, mas não foram especificamente identificados. Na região P-diéster apenas o DNA foi especificamente detectado e identificado ($-0,98 \pm 0,05 \delta \text{ ppm}$, $n = 9$). Os fosfonatos não foram detectados, e estão geralmente distribuídos de $38,4$ a $9,9 \delta \text{ ppm}$, e também polifosfatos orgânicos e/ou inorgânicos de cadeia longa, geralmente distribuídos de $-4,0$ a $-20,9 \delta \text{ ppm}$.

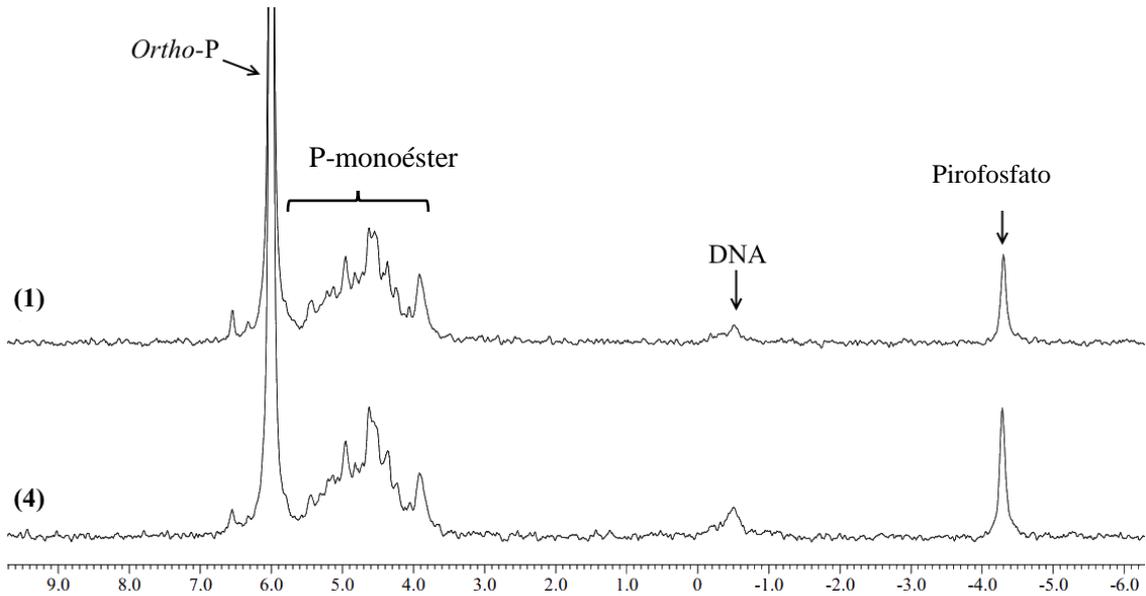


Figura 1. Espectros obtidos com a solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA em solos sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil. A escala dos espectros foram ajustados em relação ao pico de ortofosfato inorgânico (6.0 δ ppm) com 5 Hz. Sítio 1: (1) 0% de leguminosas fixadoras de N_2 ; (4) 75% de leguminosas fixadoras de N_2 .

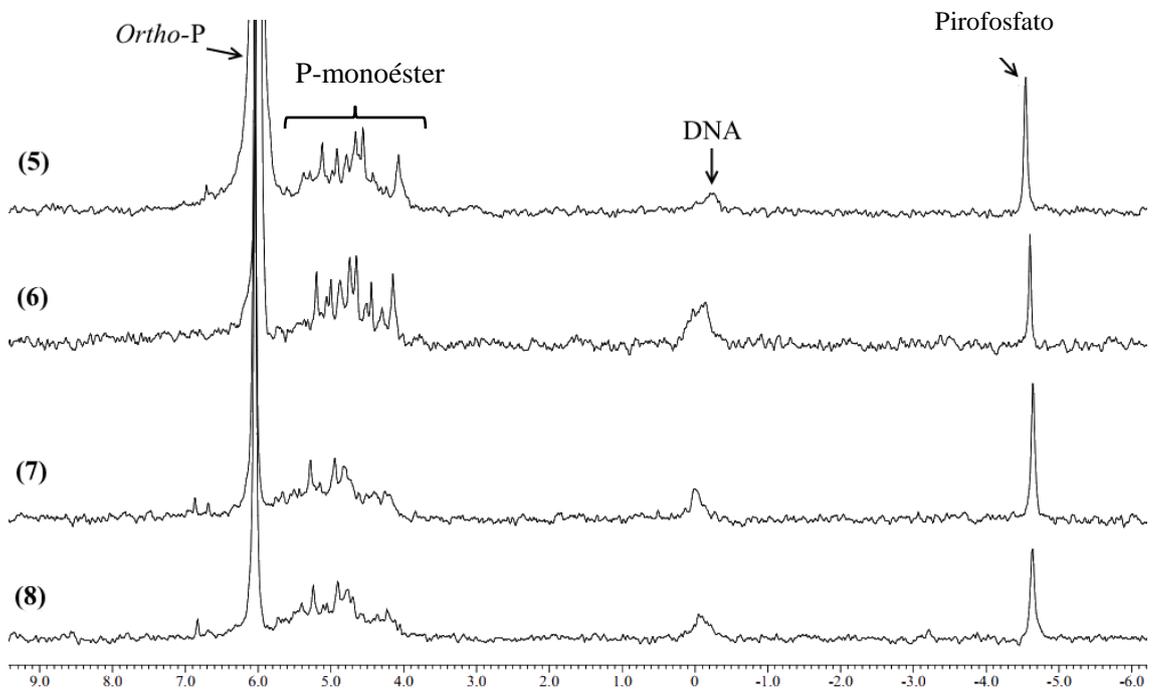


Figura 2. Espectros obtidos com a solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA em solos sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil. A escala dos espectros foram ajustados em relação ao pico de ortofosfato inorgânico (6.0 δ ppm) com 5 Hz. Sítio 2: (5) acácia (*Acacia auriculiformis*); (6) sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*); (7) floresta secundária; (8) Pastagem.

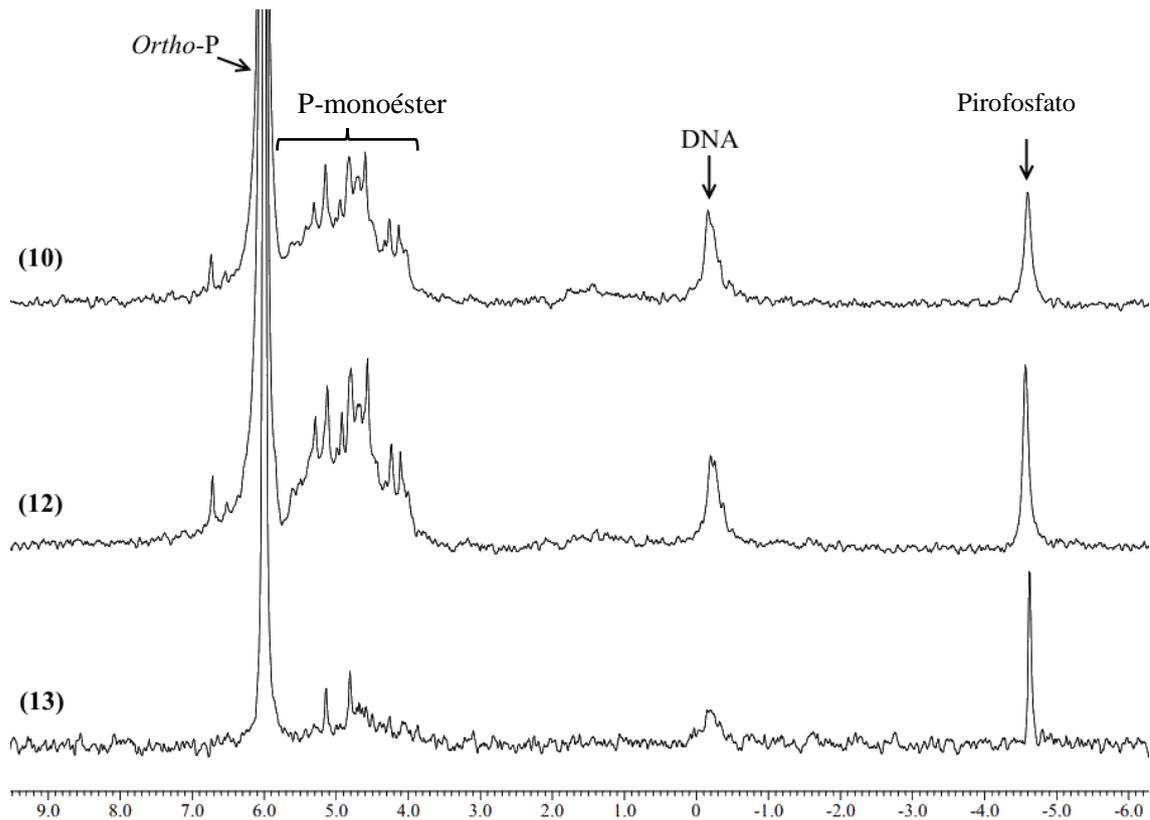


Figura 3. Espectros obtidos com a solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA em solos sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil. A escala dos espectros foram ajustados em relação ao pico de ortofosfato inorgânico (6.0 δ ppm) com 5 Hz. Sítio 3: (10) gliricídia (*Gliricidia sepium*); (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada; (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada.

Totais de ^{31}P RMN do solo

O P total dos solos extraídos em NaOH-EDTA e determinados por espectroscopia de ^{31}P RMN (^{31}P RMN total) em solução variou entre 193,1 e 467,4 mg kg^{-1} (média \pm erro padrão, $340 \pm 32,1 \text{ mg kg}^{-1}$), representando entre 37 e 83% (média de $63 \pm 5,3\%$) do P total do solo (Tabela 3). Valores totais determinados em extratos por colorimetria ($\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}}$ total) foram similares para aqueles determinados por ^{31}P RMN total, variando entre 211,4 e 558,1 mg kg^{-1} (média de $373 \pm 37,1 \text{ mg kg}^{-1}$) e representando entre 40 e 85% (média de $69 \pm 5,7\%$) do P total do solo (Tabela 3). Os valores de ^{31}P RMN total corresponderam em média a 91% do $\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}}$ total. Uma regressão linear com o intercepto forçado através da origem entre ^{31}P RMN total e $\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}}$ total foi descrita pela seguinte equação:

$$* \sqrt{(\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}} \text{ total})} = 1.04814 \pm 0.008 * \sqrt{(^{31}\text{P}_{\text{RMN}} \text{ total})}; r^2 = 0.979; p < 0.0001; n = 9.$$

Tabela 3. Frações de P inorgânico e orgânico determinadas pela solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA de solos (0–10 cm) sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil

Tratamentos	Extração em NaOH-EDTA (mg kg^{-1})			
	$^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total	$^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total	$^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total	$\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}}$ total
1	183,9 (38)	83,9 (17)	267,7 (55)	293,0 (60)
4	216,6 (41)	170,2 (32)	286,8 (73)	423,4 (80)
5	230,9 (44)	200,4 (39)	431,3 (83)	442,0 (85)
6	219,9 (40)	176,9 (32)	396,9(73)	434,4 (80)
7	172,8 (29)	78,1 (13)	251,0 (42)	272,2 (46)
8	143,2 (27)	49,9 (10)	193,1 (37)	211,4 (40)
10	244,5 (47)	156,5 (30)	401,0 (76)	438,9 (84)
12	275,3 (41)	192,2 (28)	467,4 (69)	558,1 (83)
13	191,6 (43)	72,5 (16)	264,1 (59)	289,1 (65)

Os valores entre parênteses são proporções (%) do fósforo total do solo. $^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total: soma de *ortho*-P e pirofosfato. $^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total: soma de P-monoéster e DNA. $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total: soma de $^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total e $^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total. $\text{P}_{\text{NaOH-EDTA}}$ total: P total extraível em NaOH-EDTA e analisado por colorimetria reativa ao molibdato. Sítio 1: (1) 0% de leguminosas fixadoras de N_2 ; (4) 75% de leguminosas fixadoras de N_2 ; Sítio 2: (5): acácia (*Acacia auriculiformis*); (6) sabiá (*Mimosa caesalpiniiifolia*); (7) floresta secundária; (8) pastagem; Sítio 3: (10) gliricídia (*Gliricidia sepium*); (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada; (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada.

Concentrações das espécies de P

No sítio 1, na maior densidade de plantio de leguminosas arbóreas (tratamento 4) ocorreu aumento significativo dos teores na maioria das espécies de P nos solos extraídos em NaOH-EDTA e determinados por espectroscopia de ^{31}P RMN (Tabela 3), com uma concentração em $^{31}\text{P}_{\text{RMN}}$ total cerca de +44% superior ao tratamento sem enriquecimento de leguminosas florestais (tratamento 1). O $^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total dos solos (soma do *ortho*-P e pirofosfato) apresentou média $200,2 \text{ mg kg}^{-1}$, que representaram 39% do P total do solo (Tabela 3) A espécie com maior contribuição para o $^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total foi o *ortho*-P, com média de $168,2 \text{ mg kg}^{-1}$ que representou 84% do P_{i} extraído em NaOH-EDTA (Tabela 4). A concentração média do pirofosfato foi de $31,9 \text{ mg kg}^{-1}$ e que representou cerca de 16% do P_{i} extraído em NaOH-EDTA. O $^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total do solo (soma do P-monoéster e DNA) apresentou média de 127 mg kg^{-1} , que representaram 24,5% do P total do solo (Tabela 3). A maior parte do P_{o} ocorreu como P-monoéster, com média de 119 mg kg^{-1} , e correspondeu a 69% do $^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total (Tabela 4). No geral, o sítio 4 apresentou maiores incrementos relativo no P-monoéster (+160%), assim como para o P-diéster na forma de DNA com um

acúmulo de +59,8% em relação ao tratamento sem o enriquecimento com leguminosas florestais (tratamento 1).

Tabela 4. Concentração das espécies de P determinadas pela solução ^{31}P RMN em extratos de NaOH-EDTA de solos (0–10 cm) sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil.

Tratamentos	$^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total (mg kg ⁻¹)		$^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total (mg kg ⁻¹)		
	<i>ortho</i> -P	pirofosfato	P-monoéster	P-diéster	
				DNA	M/D
1	151,3	32,5	77,7	6,2	12,6
4	185,2	31,4	160,3	9,9	16,2
5	192,4	38,5	191,9	8,5	22,7
6	190,3	29,6	172,1	7,2	23,7
7	153,4	19,5	74,0	4,1	17,9
8	124,4	18,8	52,6	4,6	11,5
10	208,4	36,1	142,9	13,5	10,6
12	237,6	37,6	176,8	17,0	10,4
13	170,1	21,6	67,3	5,2	12,9

Sítio 1: (1) 0% de leguminosas fixadoras de N; (4) 75% de leguminosas fixadoras de N; Sítio 2: (5) acácia (*Acacia auriculiformis*); (6) sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*); (7) floresta secundária; (8) pastagem; Sítio 3: (10) gliricídia (*Gliricidia sepium*); (12) vegetação espontânea com adubação nitrogenada; (13) vegetação espontânea sem adubação nitrogenada.

No sítio 2 houve ampla variação significativa dos teores de todas as espécies de P entre as coberturas vegetais (Tabela 4). Nas leguminosas florestais ocorreram aumentos significativos tanto no $^{31}\text{P}_{\text{i RMN}}$ total quanto $^{31}\text{P}_{\text{o RMN}}$ total em relação à pastagem (tratamento 8) e a floresta secundária (tratamento 7). Em média, as leguminosas florestais foram superiores (tratamento 5 e 6) para o *ortho*-P em 25% em relação à floresta secundária e 54% a pastagem, assim como para o P-monoéster (+146 para floresta secundária e +245 para pastagem). As concentrações encontradas nas leguminosas florestais na forma de P-diéster na forma de DNA foram superiores à pastagem em 72% e a floresta secundária em 89%. A acácia foi superior ao sabiá para as espécies pirofosfato (+30%) e DNA (+17%).

No sítio 3 houve incremento significativo dos teores de todas as espécies de P do solo extraído em NaOH-EDTA e determinadas por espectroscopia de ^{31}P RMN (Tabela 5), tanto com a aplicação da adubação mineral de N (tratamento 12) quanto na gliricídia (tratamento 10) em relação à vegetação espontânea (tratamento 13). O

tratamento com adubação mineral de N apresentou ganhos em relação à glicíndia em 23% para P-monoéster e 26% para o DNA.

Relações entre as espécies e frações de P

O *ortho*-P foi correlacionado positivamente com o pirofosfato ($r = 0.78$, $p < 0.05$, $n = 9$), P-monoéster ($r = 0.85$, $p < 0.01$, $n = 9$) e DNA ($r = 0.90$, $p < 0.001$, $n = 9$). Enquanto o pirofosfato foi correlacionado com P-monoéster ($r = 0.83$, $p < 0.01$, $n = 9$) e DNA ($r = 0.81$; $p < 0.01$, $n = 9$). Por outro lado, o DNA foi correlacionado com o P-monoéster ($r = 0.75$, $p < 0.05$, $n = 9$). Quanto a correlações entre espécies e frações de P do solo, o *ortho*-P foi correlacionado positivamente com as frações resina- P_i ($r = 0.87$, $p < 0.01$, $n = 9$), $\text{NaHCO}_3\text{-}P_i$ ($r = 0.76$, $p < 0.05$, $n = 9$), $\text{NaOH-}P_i$ ($r = 0.81$, $p < 0.01$, $n = 9$), e com as formas de P lábil (resina P_i + $\text{NaHCO}_3\text{-}P_i$ + $\text{NaHCO}_3\text{-}P_o$) ($r = 0.81$, $p < 0.01$, $n = 9$) e P moderadamente lábil ($\text{NaOH-}P_i$ + $\text{NaOH-}P_o$) ($r = 0.84$, $p < 0.01$, $n = 9$). O DNA foi correlacionado positivamente com as frações resina- P_i ($r = 0.84$, $p < 0.01$, $n = 9$), $\text{NaHCO}_3\text{-}P_i$ ($r = 0.76$, $p < 0.05$, $n = 9$), $\text{NaOH-}P_i$ ($r = 0.81$, $p < 0.01$, $n = 9$), e com as formas de P moderadamente lábil ($r = 0.77$, $p < 0.05$, $n = 9$). O $^{31}\text{P}_i$ RMN total foi correlacionado com resina- P_i ($r = 0.84$, $p < 0.01$, $n = 9$), $\text{NaHCO}_3\text{-}P_i$ ($r = 0.73$, $p < 0.05$, $n = 9$), $\text{NaOH-}P_i$ ($r = 0.77$, $p < 0.05$, $n = 9$), e com as formas de P lábil ($r = 0.76$, $p < 0.05$, $n = 9$) e P moderadamente lábil ($r = 0.79$, $p < 0.01$, $n = 9$). Não houve correlações significativas entre $^{31}\text{P}_i$ RMN e $^{31}\text{P}_o$ RMN total e nem entre os atributos do solo com os dois grupos de P.

DISCUSSÃO

Leguminosas florestais e os ciclos de P e N

Os teores de P total extraído dos solos foram baixos em todos os sítios, no qual a proporção média das frações de residual-P $> 50\%$ e $\text{HCl-}P_i \leq 1\%$ revela a característica de solos tropicais fortemente intemperizados. Neste ambiente de solo, tanto as leguminosas florestais quanto a adubação mineral de N, em geral, afetaram positivamente os teores de todas as frações de P nas diversas condições de clima, sistema de produção e práticas de manejo que afetaram somente a taxa de

reciclagem de P; contudo não proporcionou alterações nas concentrações de P total do solo (Liu et al., 2014). Esta variação dos teores de cada fração de P indica que a dinâmica de transformação de P no solo foi alterada em função das condições ambientais de cada sítio. O maior incremento relativo de P_o total foi no sítio 1 (Valença), enquanto o P_i total teve os maiores incrementos nos sítios 2 (Conceição de Macabú) e 3 (Seropédica). No P lábil (resina- P_i + NaHCO_3 - P_i + NaHCO_3 - P_o), os maiores incrementos ocorreram no sítio 2, seguido dos sítios 3 e 1. Nesta fração, as formas de P_i foram mais responsivas do que o P_o .

Houve aumento significativo dos teores da fração residual-P com o uso de leguminosas e adubação mineral de N, o que mostrou a eficácia do método de Hedley et al. (1982) para extrair P anteriormente inacessível. É plausível que o *input* de N, no presente estudo, tenha favorecido o sistema radicular das árvores em absorver P do subsolo e enriquecer a camada superficial do solo através do aporte de resíduos ricos em P, ou até mesmo utilizar formas de P_o não disponíveis em curto prazo para transformação de P em frações de média a alta labilidade. O aumento significativo de N total do solo ocorreu somente no sítio 1, o que sugere uma forte influência das leguminosas florestais em enriquecer com N solos florestais. Contudo, a manutenção dos teores de N total nos sítios 2 e 3 não indica que não ocorreu modificações nas diversas formas de N, especialmente aumento do N orgânico lábil (e.g., potencialmente mineralizável) e do N mineral (i.e., NH_4^+ + NO_3^-), que contribuem para o incremento da disponibilidade de N no solo. Portanto, o aumento do teor de N nas leguminosas, fruto da fixação biológica de N_2 e do N disponível depositado pela biomassa microbiana senescente no solo, haveria condições para as diferentes espécies vegetais e microrganismos em aumentar a produção de enzimas da fosfatase extracelulares, que são ricas em N (Treseder e Vitousek, 2001), e secretadas pelas raízes. A correlação positiva encontrada entre o N total e NaOH-P_o ($r = 0.98$, $p < 0.05$, $n = 4$) sugere uma dinâmica entre N e formas moderadamente lábeis de P. Isto sugere um incremento potencial da taxa de mineralização de P_o no solo, e como consequência, contribuiria diretamente para aumento P disponível a cobertura vegetal em solos florestais, como indicado pelo aumento dos teores das frações lábeis de resina- P_i e NaHCO_3 - P_i (Tabela 2); e evidenciado pela estreita correlação entre N e as frações resina- P_i , NaHCO_3 - P_i ,

$\text{NaHCO}_3\text{-P}_o$, HCl-P_i ($r = 0.99$, $p < 0.01$, $n = 4$) e NaOH-P_i ($r = 0.96$, $p < 0.05$, $n = 4$) nos solos do sítio 1.

No sítio 3, a adubação mineral de N promoveu os maiores incrementos (+72.8%) na fração de P_i lábil (resina- P_i + NaHCO_3) em relação à vegetação espontânea. Este aumento na disponibilidade de P pode ser devido a uma maior produção de fosfatases extracelulares em resposta a adição de N mineral (Treseder e Vitousek, 2001; Olander e Vitousek, 2000; Marklein e Houlton, 2012). Contudo, a atividade das fosfatases na rizosfera das plantas tende a responder mais fortemente a fertilização de N do que a fosfatase da biomassa microbiana do solo (Marklein e Houlton, 2012), evidenciando uma nítida distinção na magnitude da ação entre plantas e microrganismos sobre a disponibilidade de P nesses solos tropicais com elevado grau de intemperismo. A adição de N modifica a qualidade da MOS, apesar de não ter ocorrido alterações significativas nos teores de C total que variou de médio a alta em todos os sítios avaliados (Tabela 1). Nesse sentido, como os sistemas florestais avaliados mostraram uma elevada produção e conservação de MOS (Costa et al., 2014), é provável que tenha ocorrido aumento da produção de ácidos orgânicos reativos que estariam competindo com o fosfato pelos sítios específicos de adsorção, e que também agem como ligantes orgânicos (Sato e Comerford, 2006), e assim deslocando uma parte do P adsorvido pela fase mineral para a solução do solo. Contudo, Olander e Vitousek (2000) reportaram que a fertilização nitrogenada aumentou os teores de P extraível, mas reduziu a força de adsorção de solos florestais no Hawaii. Concomitante ao papel dos ácidos orgânicos para a disponibilidade de P nos solos do presente estudo, a contínua transferência de P para o solo via *litterfall* pelas leguminosas arbóreas e demais espécies que compõem os sistemas florestais avaliados (Costa et al., 2014) podem também contribuir para aumentar a biodisponibilidade de P no solo; sobretudo através da adição de resíduos ricos em P aumentaria significativamente os teores de resina- P_i , $\text{NaHCO}_3\text{-P}_i$ e NaOH-P_i em solos tropicais fortemente intemperizados sob diversos sistemas agroflorestais (Nziguheba et al., 1998; Lehmann et al., 2001).

No sítio 2, o aumento dos teores das frações de P_i não foi em detrimento das frações de P_o ($\text{NaHCO}_3\text{-P}_o$, NaOH-P_o e sonic- P_o), nas quais ocorreram aumentos significativos e não diferiram estatisticamente das coberturas de referência, à exceção das frações de NaOH-P_o e sonic- P_o no solo sob acácia (tratamento 5)

(Tabela 2). Esses resultados não corroboraram a hipótese proposta por Olander e Vitousek (2000) baseado no modelo de McGill e Cole (1981), na qual a adição de N via fertilização ou fixação biológica de N_2 esgotaria o *pool* de P_o ao longo do tempo por aumentar a mineralização e a disponibilidade de P no solo; em específico com o decréscimo do P_o moderadamente lábil (NaOH- P_o) principalmente através da atividades fúngica (Fan et al., 2018), uma vez que esses mecanismos estão fortemente acoplados. Portanto, no presente estudo, o aumento ou manutenção dos teores das frações de P_o do solo sugere que a quantidade de P_i lábil disponível no solo excederia em muito a demanda das plantas e microrganismos na fase tardia do desenvolvimento dos sistemas florestais avaliados; o que resultaria em um *feedback* negativo na produção de fosfatase e manutenção dos níveis de P do solo próximo ao nível limite a inibição da produção dessa enzima. Nesse contexto, no sítio 2, a quantidade de P_i da fração lábil dos solos sob acácia (13 kg/ha) e sabiá (11 kg/ha) foi 3 a 5 vezes superior à quantidade anual de P requerida por essas coberturas baseado na quantidade de P transferido para o solo (2.6 a 3.7 kg/ha/ano) via produção de *litterfall* (Costa et al., 2014), enquanto que na floresta secundária a quantidade de P_i lábil foi 6.5 vezes maior do que a quantidade anual de P requerida (Tabela 2).

O incremento e/ou manutenção das concentrações de P_o nos solos dos tratamentos do presente estudo, especialmente de P lábil, indica que a taxa de transferência de P_o para solo via *litterfall* deve ser superior a sua mineralização. Corroborado por Vincent et al. (2010) ao relatar que a remoção da serapilheira em solos florestais tropicais no Panamá reduziu o teor de P_o na camada superficial desses solos. Os nossos resultados mostraram que o balanço entre acumulação e mineralização de P_o no solo variou entre os sítios florestais. No sítio 1, a proporção de relativa de P_o foi maior do que 60% nas frações lábeis e moderadamente lábeis na maior densidade de plantio de leguminosas florestais (tratamento 4); no sítio 2, a proporção relativa média de P_o nestas frações foi maior do que 75% nos solos sob as duas leguminosas florestais (e.g., acácia e sabiá), com os tratamentos de referência, pastagem e floresta secundária, correspondendo a mais de 65% para o P_o ; enquanto que no sítio 3, a proporção de P_o foi menor do que 50% nos solos sob gliricídia e no tratamento com adição de N mineral; com a proporção de P na fração oclusa (sonic- P_i + P_o) foi menor do que 50% em todos os sítios avaliados.

Leguminosas florestais e a especiação de P no solo

As elevadas concentrações de P do solo obtidas com o uso da solução extratora de NaOH-EDTA comparado ao P total do solo por digestão sulfúrica (média de 69% para o P_{NaOH-EDTA} total e 63% para o ³¹P_{RMN} total) demonstraram a eficiência do uso dessa solução fortemente básica para caracterizar a distribuição de P em solos florestais tropicais com elevado grau de intemperismo. O uso da solução extratora de NaOH-EDTA em conjunto com a espectroscopia de ³¹P RMN para a determinação e identificação das espécies de P no solo, e que corroborou os resultados obtidos com o fracionamento sequencial de P que se baseou na solubilidade química das formas P no solo de todos os sítios. O enriquecimento com leguminosas florestais, inoculadas com bactérias diazotróficas em conjunto com fungos micorrízicos arbusculares, de áreas fortemente degradadas influenciou diferentes espécies de P no solo; as espécies de P_o mais responsivas foram o DNA e *pool* P-monoéster, assim como o pirofosfato para as espécies de P_i.

As elevadas concentrações de DNA, uma forma de P-diéster, observadas nos solos dos tratamentos com leguminosas florestais (tratamento 4, 5, 6 e 10) e vegetação espontânea com adubação nitrogenada (tratamento 12), indica uma forte presença de formas lábeis de P nesses solos; onde foram encontradas correlações positivas entre o DNA, o P lábil e o P moderadamente lábil indicando uma estreita associação na dinâmica entre essas espécies de P e os diferentes graus de disponibilidade de P à cobertura vegetal. A acumulação de espécies P_o no solo depende de um conjunto de processos abióticos de estabilização. Dentre eles, a adsorção no solo mineral é o principal processo que afeta a acumulação seletiva de alguns compostos (Celi e Barberis, 2005). A complexação e precipitação com cátions polivalentes dessas espécies de P e a incorporação dentro das estruturas da MOS são também processos relevantes de controle do destino do P_o no ambiente do solo (Celi e Barberis, 2005; McLaren et al., 2015). O processo de agregação em solos tropicais fortemente intemperizados também contribui para a estabilização de P_o. No sítio 2, Rita et al. (2013) mostraram que a taxa de mineralização de P_o foi maior nos macroagregados do que nos microagregados, e a sua distribuição nas classes de agregados revelou a distinta habilidade dessas coberturas vegetais em reciclar o P no solo.

Os elevados teores de pirofosfato encontrados nos solos sob a vegetação espontânea com adubação nitrogenada e tratamentos com leguminosas florestais (Tabela 5) indicam uma alta atividade microbiana nesses solos. A síntese de pirofosfato ocorre no interior de fungos micorrízicos após a absorção de P_i , com a liberação e acumulação no solo após *turnover* microbiano (Koukol et al., 2006; 2008). A correlação positiva encontrada entre o pirofosfato e o DNA indica um estreitamento na dinâmica entre essas espécies de P_i e P_o nesses solos. Esta associação sugere que o DNA pode ser solubilizado pela ação de ácidos orgânicos secretados por FMA (Turner 2008) que por sua vez mineralizam esses compostos orgânicos através da produção de enzimas fosfodiesterase (Myers e Leake 1996, Makino e Cotner, 2004). A gênese e a contínua acumulação de pirofosfato nesses solos constitui num importante compartimento de reserva de P_i , e que pode ser utilizado pela cobertura vegetal em momentos de limitação de P no solo. No sítio 2, a baixa acumulação de pirofosfato tanto na pastagem quanto na floresta secundária indica uma forte dependência da cobertura vegetal desses tratamentos em relação às suas reservas de P no solo; associado a não possuírem um significativo *input* de P por deposição de *litterfall* rico em nutrientes comparado as leguminosas florestais (Costa et al., 2014).

A regeneração da floresta secundária, no sítio 2, sobre uma pastagem fortemente degradada não mostrou ganhos significativos nas concentrações das espécies de P no solo (Tabela 4); além disso, baixas concentrações de espécies P_o nesses solos mostra uma forte limitação em curto prazo da produção vegetal comparado as leguminosas florestais. Contudo, o incremento em 36% do teor de P_o total obtido com a ^{31}P RMN (Tabela 3), indicou que o enriquecimento com espécies vegetais espontâneas, que é característico de sistemas formados por floresta secundária, poderia estar agindo sobre a acumulação e a ciclagem de P de uma maneira mais eficiente que a pastagem no mesmo sítio; os estoques de P_o na camada superficial do solo (0-10 cm) com o enriquecimento com leguminosas florestais mostra um ganho superior a 250% para o sabiá e de 300% para a acácia em comparação ao estoque de P_o do solo da pastagem.

Como as leguminosas florestais do presente estudo foram inoculadas com FMA, e assumindo a persistência e efetividade desta simbiose, e a capacidade das hifas de produzir também fosfatases extracelular tão bem quanto às plantas (Turner,

2008), haveria então nesses solos florestais uma maior capacidade de absorção de P_i da solução do solo pela cobertura vegetal. Por sua vez, estudos futuros devem buscar os mecanismos dominantes de aquisição de P (e.g., fosfatase *versus* FMA) em resposta a adição de N (e.g., biológica ou mineral). Treseder e Vitousek (2001) sugerem que a alternância entre esses dois mecanismos pode ser mais eficiente em ecossistemas com forte limitação de P no solo, em função dos FMA requererem uma elevada fração do C líquido fixado pelas plantas, apesar da produção de fosfatases representar um substancial custo energético para as plantas em termos de investimento de N. Em decorrência disso, e considerando a dupla inoculação (e.g., bactérias diazotróficas + FMA) das leguminosas do presente estudo, se pode hipotetizar que uma simbiose tripartite (i.e., fotossíntese-C + fixação- N_2 + FMA-P) (figura 4) predominaria na fase inicial de crescimento das plantas, no qual os FMA seriam responsáveis pela ampliação do sistema radicular a fim de aumentar a aquisição P do solo, e com isso viabilizar a maximização da fixação de N_2 pelas bactérias diazotróficas endofíticas; enquanto na fase madura de desenvolvimento predominaria a produção de fosfatases extracelular em razão da maior disponibilidade de N, reduzindo assim o custo de C fixado alocado na simbiose. Ainda, nesses sistemas florestais e agroflorestais deve predominar a interação e complementaridade entre as diferentes espécies vegetais para não haver esgotamento das reservas de P_o ; uma vez que diferentes espécies de plantas podem acessar discretos *pools* de P_o , devido à habilidade delas em produzir enzimas específicas de fosfatase a fim de explorar diferentes compostos de P_o do solo (Turner 2008; Steidinger et al. 2015). Os resultados mostraram a importância da identificação de diferentes compostos quimicamente funcionais de P em solos florestais, e a influência das leguminosas fixadoras de nitrogênio em aumentar a disponibilidade de P no solo; evidenciando a estreita ligação entre os ciclos de P e N nesses solos; e possibilitando estabelecer estratégias de manejo de P em sistemas florestais tropicais de baixos insumos em solos fortemente intemperizados na região da Mata Atlântica no Brasil.

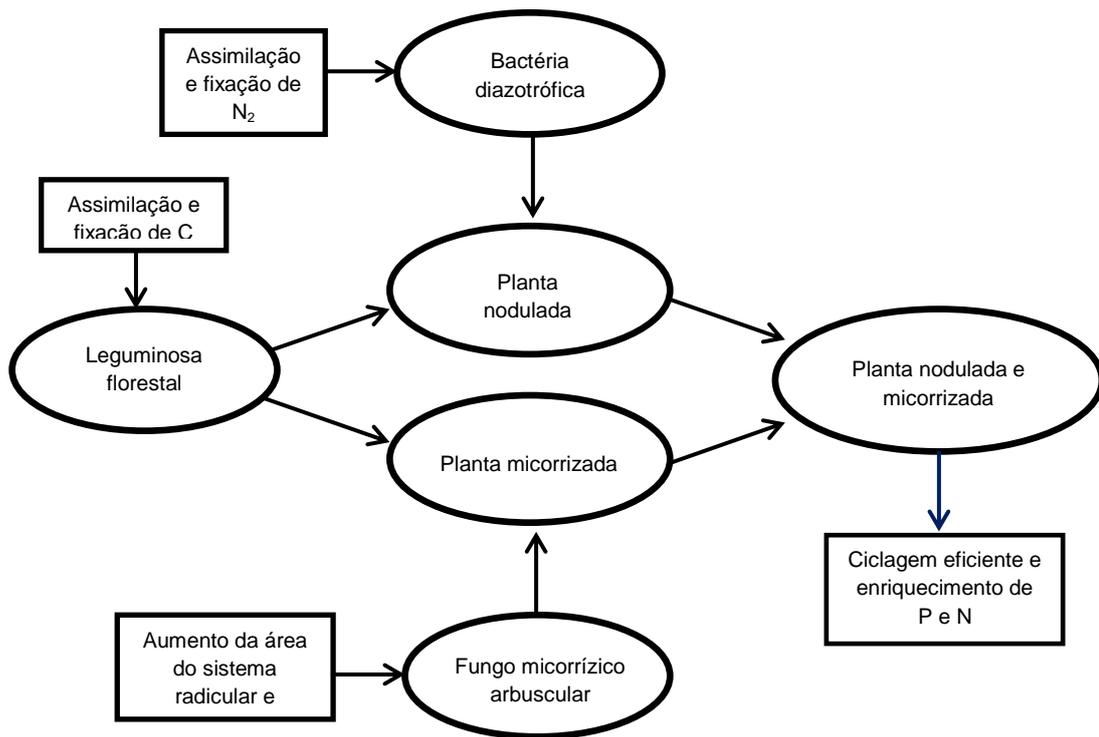


Figura 4. Modelo hipotético de simbiose tripartite entre espécies vegetais, bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em solos sob diferentes plantações de leguminosas florestais na região da Mata Atlântica no Brasil.

CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que as leguminosas florestais inoculadas com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares podem aumentar as concentrações de P no solo através da ciclagem e acumulação de compostos orgânicos e inorgânicos de P. Os resultados também destacaram que o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P em conjunto com a extração sequencial de P do solo melhorou a compreensão do ciclo de P e N para o funcionamento dos ecossistemas terrestres. No geral, o estudo destaca a importância de considerar o contexto ambiental do plantio de diferentes espécies de leguminosas florestais com a finalidade de recuperar áreas fortemente degradada, e que pode ser uma estratégia adequada através do manejo eficiente da ciclagem de P e N em solos tropicais fortemente intemperizados no domínio do bioma Mata Atlântica no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixo, S., Gama-Rodrigues, A.C., Costa, M.G., Sales, M.V.S., Gama-Rodrigues, E.F., Marques, J.R.B. (2017) P transformations in cacao agroforests soils in the Atlantic Forest region of Bahia, Brazil. *Agroforest. Syst.* 91(3), 423–437.
- Cade-Menun, B.J. (2015) Improved peak identification in ^{31}P -NMR spectra of environmental samples with a standardized method and peak library. *Geoderma* 257-258, 102–114
- Celi, L., Barberis, E. (2005) Abiotic stabilization of organic phosphorus in the environment. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds) *Organic phosphorus in the environment*. CABI, Wallingford, pp 113–132
- Chessel, D., Dufour, A.B., Thioulouse, J. (2004) The ade4 package I: one-table methods. *R News* 4, 5–10.
- Costa, A.C, Gama-Rodrigues, A.C., Zaia, F.C., Gama-Rodrigues, E.F. (2014) Leguminosas arbóreas para recuperação de áreas degradadas com pastagem em Conceição de Macabu, Rio de Janeiro, Brasil. *Scientia Forestalis* 42(101), 101–112
- Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1977) Determination of orthophosphate in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. *Journal of Environmental Quality*, 6, 82-85.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J. (2010) Rapid decomposition of phytate applied to a calcareous soil demonstrated by a solution ^{31}P NMR study. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 563–575.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2011) *Manual de análise química de solos, plantas e fertilizantes*. Embrapa solos, Brasília. 379 p.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2013) *Sistema brasileiro de classificação de solos*. Embrapa solos, Brasília, 3.ed., 353 p.
- Fan, Y., Lin, F., Yang, L. (2018) Decreased soil organic P fraction associated with ectomycorrhizal fungal activity to meet increased P demand under N application in a subtropical forest ecosystem. *Biol Fertil Soils* 54, 149.
- Fontes, A.G., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Sales, M.V.S., Costa, M.G., Machado, R.C.R. (2014) Nutrient stocks in litterfall and litter in cocoa agroforests in Brazil. *Plant and Soil* 383, 313–335.

- Furlan, D.A. (2015) Frações de fósforo do solo em diferentes usos da terra no Estado do Rio de Janeiro. Campos dos Goytacazes, RJ: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 44p. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Gama-Rodrigues, A.C., Sales, M.V.S., Silva, P.S.D, Comerford, N. B., Cropper, W. P., Gama-Rodrigues, E. F. (2014) An exploratory analysis of phosphorus transformations in tropical soils using structural equation modeling. *Biogeochemistry*, 118, 453-469.
- He, Z.Q., Oik, D.C., Cade-Menun, B.J. (2011) Forms and lability of phosphorus in humic acid fractions of Hord silt loam soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 75, 1712–1722.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan, B.S. (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 970-976.
- Houlton, B.Z., Wang, Y.P., Vitousek, P., Field, C. (2008) A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* 454, 327–330.
- Jarosch, K.A., Doolette, A.L., Smernik, R.J., Frossard, F.T.E., Bünemann, E.K., (2015) Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of ³¹P NMR spectroscopy and enzyme addition assays. *Soil Biol. Biochem.* 91, 298–309.
- Koukol, O., Novák, F., Hrabal, R., Vosátka, M. (2006) Saprotrophic fungi transform organic phosphorus in spruce needle litter, *Soil Biol. Biochem.* 38, 3372–3379.
- Koukol, O., Novák, F., Hrabal, R. (2008) Composition of the organic phosphorus fraction in basidiocarps of saprotrophic and mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2464–2467.
- Laliberté, E., Grace, J.B., Huston, M.A., Lambers, H., Teste, F.P., Turner, B.L., Wardle, D.A. (2013) How does pedogenesis drive plant diversity? *Trends Ecol.* 28(6), 331–340.
- Lambers, H., Raven, J.A., Shaver, G.R., Smith, S.E. (2008) Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends Ecol Evol* 23, 95–103
- Lehmann, J., Günther, D., Socorro Da Mota, M., Pereira De Almeida, M., Zech, W., Kaiser, K. (2001) Inorganic and organic soil phosphorus and sulfur pools in

- an amazonian multistrata agroforestry system. *Agroforest. Syst.* 53(2), 113–124.
- Liu, X., Meng, W., Liang, G., Li, K., Xu, W., Huang, L., Yan, J. (2014) Available phosphorus in forest soil increases with soil nitrogen but not total phosphorus: evidence from subtropical forests and a pot experiment. *PLoS One* 9:e88070
- Lobão, D.E., Setenta, W.C., Lobão, E.S.P., Curvelo, K., Valle, R.R. (2012) Cacau cabruca-sistema agrossilvicultural tropical. In: Valle, R.R. (Ed.), *Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacaueiro*. CEPLAC/CEPEC, Brasília, pp. 467–506
- Makino, W., Cotner, J.B. (2004) Elemental stoichiometry of a heterotrophic bacterial community in a freshwater lake: implications for growth- and resource-dependent variations. *Aquat Microb Ecol* 34, 33–41
- Marklein, A.R., Houlton, B.Z. (2012) Nitrogen inputs accelerate phosphorus cycling rates across a wide variety of terrestrial ecosystems. *New Phytologist* 193, 696–704.
- McGill, W.B., Cole, C.V. (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26, 267–268
- McLaren, T.I., Smernik, R.J., McLaughlin, M.J., McBeath, T.M., Kirby, J.K., Simpson, R.J., Guppy, C.N., Doolette, A.L., Richardson, A.E. (2015) Complex forms of soil organic phosphorus—a major component of soil phosphorus. *Environ. Sci. Technol.* 49, 13238–13245.
- Murphy, J., Riley, J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta* 27, 31–36.
- Myers, M.D., Leake, J.R. (1996) Phosphodiesterases as mycorrhizal P sources. II. Ericoid mycorrhiza and the utilization of nucleic acids as a phosphorus and nitrogen source by *Vaccinium macrocarpon*. *New Phytol* 132, 445–451.
- Nasto, M.K., Alvarez-Clare, S., Lekberg, Y., Sullivan, B.W., Townsend, A.R., Cleveland, C.C. (2014). Interactions among nitrogen fixation and soil phosphorus acquisition strategies in lowland tropical rain forests. *Ecol Lett* 17, 1282–1289.
- Nziguheba, G., Palm, C.A., Buresh, R.J., Smithson, P.C. (1988) Soil phosphorus fractions and adsorption as affected by organic and inorganic sources. *Plant Soil* 198, 159-168.

- Olander, L.P., Vitousek, P.M. (2000) Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49(2), 175–191.
- Rita, J.C.O., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Zaia, F.C., Nunes, D. A.D. (2013) Mineralization of organic phosphorus in soil size fractions under different vegetation covers in the north of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 37, 1207-1215.
- Sato, S., Comerford, N.B. (2006) Organic anions and phosphorus desorption and bioavailability in a humid Brazilian Ultisol. *Soil Sci.* 171, 695–705.
- Schneider, K.D., Cade-Menun, B.J., Lynch, D.H., Voroney, R.P. (2016) Soil phosphorus from organic and conventional forage fields. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 80, 328–340.
- Schroth, G., Lehmann, J., Rodrigues, M.R.L., Barros, E., Macêdo, J.L.V. (2001) Plant-soil interactions in multistrata agroforestry in the humid tropics. *Agroforest. Syst.* 53, 85–102.
- Schroth, G., Fonseca, G.A.B., Harvey, C.A., Vasconcelos, H.L., Gascon, C., Izar, A.M.N. (2004) *Agroforestry and biodiversity conservation in tropical landscapes*. Island Press, Washington, DC
- Soil Survey Staff (2014) *Soil survey field and laboratory methods manual*. In: Burt, R. (Eds), *Soil Survey Investigations Report n 51 Version 1.0*. U.S. Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service.
- Steidinger, B.S., Turner, B.L., Corrales, A., Dalling, J.W. (2015) Variability in potential to exploit different soil organic phosphorus compounds among tropical montane tree species. *Functional Ecology* 29, 121–130.
- Treseder, K., Vitousek, P. (2001) Effects of Soil Nutrient Availability on Investment in Acquisition of N and P in Hawaiian Rain Forests. *Ecology* 82(4), 946-954.
- Turner, B.L., (2008) Resource partitioning for soil phosphorus: a hypothesis. *Journal of Ecology* 96, 698–702.
- Turner, B.J., Engelbrecht, B.M.J. (2011) Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry* 103, 297–315.
- Turner, B.L., Cheesman, A.W., Godage, H.Y., Riley, A.M., Potter, B.V.L. (2012) Determination of *neo*- and *D-chiro*-inositol hexakisphosphate in soils by solution ^{31}P NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 46(9), 4994–5002.

- Vincent, A.G., Turner, B.L., Tanner, E.V.J. (2010) Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 48–57.
- Vitousek, P., Porder, S., Houlton, B.Z., Chadwick, O.A. (2010) Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen-phosphorus interactions. *Ecological Applications* 20, 5–15.
- Zaia, F.C., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Moço, M.K.S., Machado, R.C.R., Baligar, V.C. (2012) Carbon, nitrogen, organic phosphorus, microbial biomass and N mineralization in soils under cacao agroforestry systems in Bahia, Brazil. *Agroforest. Syst.* 86, 197–212.
- Young, E.O., Ross, D.S., Cade-Menun, B.J., Liu, C.W. (2013) Phosphorus speciation in riparian soils: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy and enzyme hydrolysis study. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 77(5), 1636-1647.

RESUMO E CONCLUSÕES

O uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P no solo melhorou a compreensão das transformações de P em agroflorestas de cacau em solos tropicais fortemente intemperizados no domínio do bioma Mata Atlântica. A distribuição das espécies de P no solo variou de acordo com as diferentes práticas de manejo (fertilização de P, espécies arbóreas e densidade de árvores) e tempo de estabilidade (diferentes idades) das agroflorestas de cacau com baixo *input* de fertilizante fosfato. Esta pesquisa mostrou que a recente conversão de uma floresta natural ou pastagem em agroflorestas de cacau levou a uma diminuição da concentração de P-lábil na forma de DNA. No entanto, essas espécies de P_o lábeis podem ser fortemente adsorvidas na matéria orgânica do solo e em minerais de fração de argila; o que promovem a estabilização e proteção dos processos de mineralização nesses solos. Além disso, encontramos evidências de que o longo tempo de estabilidade e a ausência de pastoreio intensivo de ruminantes em pastagem contribuem para o aumento de P-monoéster e que se constituem na maior parcela de espécies de P_o não lábil nesses solos. As altas concentrações de pirofosfato encontradas em todas as agroflorestas de cacau mostraram uma elevada ciclagem e acumulação de P através da ação dos microorganismos presentes nesses solos. Além disso, as altas concentrações e proporções relativas das espécies que compõem o P orgânico, assim como a espécie pirofosfato, revelaram um alto potencial de oferta de P para plantas numa eventual remoção da fertilização fosfatada inorgânica nesses sistemas agroflorestais de cacau e seringueira. Os

resultados mostraram que as leguminosas florestais inoculadas com bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares podem aumentar as concentrações de P no solo através da ciclagem e acumulação de compostos orgânicos e inorgânicos de P. Os resultados também destacaram que o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{31}P em conjunto com a extração sequencial de P do solo melhorou a compreensão do ciclo de P e N para o funcionamento dos ecossistemas terrestres. No geral, o estudo destaca a importância de considerar o contexto ambiental do plantio de diferentes espécies de leguminosas florestais com a finalidade de recuperar áreas fortemente degradada, e que pode ser uma estratégia adequada através do manejo eficiente da ciclagem de P e N em solos tropicais fortemente intemperizados no domínio do bioma Mata Atlântica no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixo, S., Gama-Rodrigues, A.C., Costa, M.G., Sales, M.V.S., Gama-Rodrigues, E.F., Marques, J.R.B. (2017) P transformations in cacao agroforests soils in the Atlantic Forest region of Bahia, Brazil. *Agroforest. Syst.* 91(3), 423–437.
- Backnäs, S., Laine-Kaulio, H., B. Kløve. (2012) Phosphorus forms and related soil chemistry in preferential flowpaths and the soil matrix of a forested podzolic till soil profile. *Geoderma* 189–190, 50–64.
- Barber, S.A. (1995) *Soil nutrient bioavailability: A mechanistic approach*. 2.ed. New York, John Wiley & Sons, p.414.
- Bol, R., W. Amelung, L. Haumaier. (2006) Phosphorus-31-nuclear magnetic resonance spectroscopy to trace organic dung phosphorus in a temperate grassland soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 169,69–75.
- Bourke, D., P. Dowding, H. Tunney, J.E. O'Brien, D.W. Jeffrey. (2008) The organic composition of an Irish grassland soil. *Biol. Environ.: Proc. R. Irish Acad.* 108, 17–28.
- Bowman, R.A., Cole, C.V. (1978) An exploratory method for fractionation of organic phosphorus from grassland soils, *Soil Sci.* 125,49-54.
- Bowman, R.A., J.O. Moir. (1993) Basic EDTA as an extractant for soil organic phosphorus. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57, 1516–1518.
- Briceño, M., M. Escudey, G. Galindo, D. Borchardt, A. Chang. (2006) Comparison of extraction procedures used in determination of phosphorus species by ³¹P-NMR in Chilean volcanic soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 37, 1553–1569.

- Bünemann, E.K., P. Marschner, R.J. Smernik, M. Conyers, A.M. McNeill. (2008) Soil organic phosphorus and microbial community composition as affected by 26 years of different management strategies. *Biol. Fertil. Soils* 44, 717–726.
- Cade-Menun, B.J., C.W. Liu, R. Nunlist, J.G. McColl. (2002) Soil and litter phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy: Extractants, metals and phosphorus relaxation times. *J. Environ. Qual.* 31, 457–465.
- Cade-Menun, B.J. (2005) Characterizing phosphorus in environmental and agricultural samples by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Talanta* 66, 359–371.
- Cade-Menun, B.J. Liu, C.W. (2014) Solution ^{31}P -NMR spectroscopy of soils from 2005-2013: A review of sample preparation and experimental parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 78(1), 19-37.
- Cade-Menun, B.J., He, Z.Q., Zhang, H., Endale, D.M., Schomberg, H.H., Liu, C.W. (2015) Stratification of phosphorus forms from long-term conservation tillage and poultry litter application. *Soil Science Society of America Journal* 79(2), 504-516.
- Cade-Menun, B.J. (2017) Characterizing phosphorus forms in cropland soils with solution ^{31}P -NMR: past studies and future research needs. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4, 19.
- Cardoso, I., Janssen, B., Oenema, O., Kuyper, T. (2003) Phosphorus pools in Oxisols under shaded and unshaded coffee systems on farmers fields in Brazil. *Agroforestry Systems* 58(1), 55-64.
- Cheesman, A.W., Dunne, E.J., Turner, B.L., Reddy, K.R. (2010a) Soil phosphorus forms in hydrologically isolated wetlands and surrounding pasture uplands. *J. Environ. Qual.* 39, 1517–1525.
- Cheesman, A.W., Turner, B.L., Inglett, P.W., Reddy, K.R. (2010b) Phosphorus transformations during decomposition of wetland macrophytes. *Environ. Sci. Technol.* 44(24), 9265-71.
- Cheesman, A.W., Turner, B.L., Reddy, K.R. (2010c) Interaction of phosphorus compounds with anion-exchange membranes: Implications for soil analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 74, 1607–1612.
- Condon, L.M., Newman, S. (2011) Revisiting the fundamentals of phosphorus fractionation of sediments and soils. *J. Soils Sediments* 11, 830–840.

- Condrón, L.M., Turner, B.L., Cade-Menun, B.J. (2005) Chemistry and dynamics of soil organic phosphorus. In: Sharpley, A.N., Sims, J.T. (eds) Phosphorus: agriculture and the environment. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, pp 87–121.
- Costa, M.G., Gama-Rodrigues, A.C., Gonçalves, J.L.D.M., Gama-Rodrigues, E.F., Sales, M.V.D.S., Aleixo, S. (2016) Labile and Non-Labile Fractions of Phosphorus and Its Transformations in Soil under Eucalyptus Plantations, Brazil. *Forests* 7(1), 15.
- 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, 197-214.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J. (2010) Rapid decomposition of phytate applied to a calcareous soil demonstrated by a solution ^{31}P NMR study. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 563–575.
- Doolette, A.L., Smernik, R.J., Dougherty, W.J. (2011) A quantitative assessment of phosphorus forms in some Australian soils. *Soil Res.* 49, 152–165.
- Fontes, A.G., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Sales, M.V.S., Costa, M.G., Machado, R.C.R. (2014) Nutrient stocks in litterfall and litter in cocoa agroforests in Brazil. *Plant and Soil* 1-23.
- Frossard, E., Condrón, L.M., Oberson, A., Sinaj, S., Fardeau, J.C. (2000) Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *J. Environ. Qual.* 29, 12–53.
- Gatiboni, L.C., Brunetto, G., Rheinheimer, D.S., Kaminski, J., Pandolfo, C.M., Veiga, M., Flores, A.F.C., Lima, M.A.S., Girotto, E., Copetti, A.C.C. (2013) Spectroscopic quantification of soil phosphorus forms by ^{31}P -NMR after nine years of organic or mineral fertilization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 37(3), 640-648.
- Grierson, P.F., Smithson, P., Nziguheba, G., Radersma, S., Comerford, N.B. (2004) Phosphorus dynamics and mobilization by plants. In: Noordwijk, M., Cadisch, G., Ong, C.K. (Eds) *Below-ground interactions in tropical agroecosystems: Concepts and models with multiple plant components*, CABI International, Wallingford, pp 127-142.
- Haggar, J., Barrios, M., Bolaños, M., Merlo, M., Moraga, P., Munguia, R., Ponce, A., Romero, S., Soto, G., Staver, C., de Virginio, E.M.F. (2011) Coffee agroecosystem performance under full sun, shade, conventional and organic

- management regimes in Central America, *Agroforestry Systems*, 82(3), 285-301.
- Hartemink, A.E. (2005) Nutrient stocks, nutrient cycling, and soil changes in cocoa ecosystems: a review. *Adv. Agron.* 86, 227–253.
- Hawkes, G.E., Powlson, D.S., Randall, E.W., Tate, K.R. (1984) P nuclear magnetic resonance study of the phosphorus species in alkali extracts of soils from long-term field experiments. *J. Soil Sci.* 35, 35-45.
- He, Z., C.W. Honeycutt, B.J. Cade-Menun, Z.N. Senwo, I.A. Tazisong. (2008) Phosphorus in poultry litter and soil: Enzymatic and nuclear magnetic resonance characterization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72, 1425–1433.
- Hedley, M.J., Stewart, J.W.B., Chauhan., B.S. (1982) Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 970–976.
- Jarosch, K.A., Doolette, A.L., Smernik, R.J., Frossard, F.T.E., Bünemann, E.K., (2015) Characterisation of soil organic phosphorus in NaOH-EDTA extracts: A comparison of ^{31}P NMR spectroscopy and enzyme addition assays. *Soil Biol. Biochem.* 91, 298–309.
- Kanmegne, J., Dugma, B., Henrot, J., Isirimah, N.O. (1999) Soil Fertility Enhancement by Planted Tree-fallow Species in the Humid Lowlands of Cameroon. *Agroforestry Systems*, 46, 239-249.
- Laclau, J.P., Ranger, J., Gonçalves, J.L.M., Maquère, V., Krusche, A.V., M'Bou, A.T. (2010) Biogeochemical cycles of nutrients in tropical Eucalyptus plantations main features shown by intensive monitoring in Congo and Brazil. *Forest Ecology and Management.* 259(9), 1771-1785.
- Lehmann, J., Günther, D., Socorro Da Mota, M., Pereira De Almeida, M., Zech, W., Kaiser, K. (2001) Inorganic and organic soil phosphorus and sulfur pools in an amazonian multistrata agroforestry system. *Agroforestry Systems* 53(2), 113-124.
- Lehmann, J., Lan, Z., Hyl, and, C., Sato, S., Solomon, D., Ketterings., Q.M. (2005) Long-term dynamics of phosphorus forms and retention in manureamended soils. *Environ. Sci. Technol.* 39, 6672–6680.
- Makarov, M.I., Haumaier, L., Zech., W. (2002) The nature and origins of diéster phosphates in soils: A ^{31}P -NMR study. *Biol. Fertil. Soils* 35, 136–146.

- Martinazzo, R., Rheinheimer, D.S., Gatiboni, L.C., Brunetto, G., Kaminskil, J. (2007) Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel, *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31, 563-570.
- Melo, A.C.G., Neto, P.J.S., Martins, A.C.S. (2001) Enfoques sobre cacauzeiros em sistemas agroflorestais. *In: Silva Neto, P.J., et al. Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira*. Belém, CEPLAC, p.125.
- McDowell, R.W., Scott, J.T., Stewart, I., Condon, L.M. (2007) Influence of aggregate size on phosphorus changes in a soil cultivated intermittently: Analysis by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Biol. Fertil. Soils*. 43, 409–415.
- Monaghan, E., Ruttenger, R.C. (1999) Dissolved organic phosphorus in the coastal ocean: Reassessment of available methods and seasonal phosphorus profiles from the Eel River Shelf. *Limnol. Oceanogr.* 44, 1702–1714.
- Monroe, P.H.M., Gama-Rodrigues, E.F., Gama-Rodrigues, A.C., Marques, J.R.B. (2016) Soil carbon stocks and origin under different cacao agroforestry systems in Southern Bahia, Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 221, 99–108.
- Müller, M.W., Gama-Rodrigues, A.C. (2012) Sistemas agroflorestais com cacauzeiro. *In: Valle, R.R. Ciência, Tecnologia e Manejo do Cacauzeiro*. 2.ed, CEPLAC, Brasília, p.407-435.
- Negassa, W., Leinweber, P. (2009) How does the Hedley sequential phosphorus fractionation reflect impacts of land use and management on soil phosphorus: A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172, 305–325.
- Newman, R.H., Tate, K.R. (1980) Soil phosphorus characterization by ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 11, 835–842.
- Novais, R.F., Smyth, T.J. (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.399.
- Novais, R.F., Smyth, T.J., Nunes, F.N. (2007) Fósforo. *In: Novais, R.F., Alvarez, V.H., Barros, N.F., Fontes, R.L.F., Cantarutti, R.B., Neves, J.C.L. (eds.) Fertilidade do solo, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência de Solo*, p.471-550.
- Oberson, A., Pypers, P., Bünemann, E.K., Frossard, E. (2011) Management impacts on biological phosphorus cycling in cropped soils. *In: Bünemann, E.K.,*

- Oberson, A., Frossard, E. Phosphorus in Action, Vol. 100, Soil Biology, Springer Berlin Heidelberg, p.431-458.
- Ohno, T., Hiradate, S., He, Z. (2011) Phosphorus solubility of agricultural soils: A surface charge and phosphorus-³¹P NMR speciation study. Soil Sci. Soc. Am. J. 75,1704–1711.
- Radersma, S. (2002) Tree effects on crop growth on a phosphorus-fixing ferralsols, Tese (Pós-doutorado), Wageningen University Research Center - Wageningen. NL. Richardson, A.E, p.183.
- Rheinheimer, D.S., Anghinoni, I., Conte, E. (2000) Fósforo da biomassa microbiana em solos sob diferentes sistemas de manejo, Revista Brasileira de Ciência do Solo 24, 589-597.
- Rheinheimer, D.S., Anghinoni, I., Flores, A.F. (2002) Organic and inorganic phosphorus as characterized by phosphorus-31 by nuclear magnetic resonance in subtropical soils under management systems, Communications in Soil Science and Plant Analysis 33(11-12), 1853-1871.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J. (2011) Soil microorganisms mediating phosphorus availability, Plant Physiology 156, 989-996.
- Rita, J.C.O., Gama-Rodrigues, E.F., Gama-Rodrigues, A.C., Polidoro, J.C., Machado, R.C.R., Baligar, V.C. (2011) C and N content in density fractions of whole soil and soil size fraction under cacao agroforestry systems and natural forest in Bahia, Brazil. Environ. Manage. 48, 134–141.
- Shafqat, M.N., Pierzynski, G.M., Xia, K. (2009) Phosphorus source effects on soil organic phosphorus: A ³¹P NMR study. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 40, 1722–1746.
- Silva, F.C., RAIJ, B. (1999) Disponibilidade de fósforo em solos avaliada por diferentes extratores, Pesq. Agropec. Bras. 34, 267-288.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. (1994) Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Rio de Janeiro, GuanabaraKoogan, 387p.
- Slazak, A., Freese, D., Matos, E.S., Huettl, R.F. (2010) Soil organic phosphorus fraction in pine-oak forest stands in Northeastern Germany. Geoderma 158, 156-162.

- Steidinger, B.S., Turner, B.L., Corrales, A., Dalling, J.W. (2015). Variability in potential to exploit different soil organic phosphorus compounds among tropical montane tree species. *Functional Ecology*. 29, 121–130.
- Stewart, J.W.B., Tiessen, H. (1987) Dynamics of soil organic phosphorus. *Biogeochemistry* 4, 41-60.
- Szott, L.T., Melendez, G. (2001) Phosphorus availability under annual cropping, alley cropping, and multistrata agroforestry systems. *Agroforestry Systems* 53, 125-132.
- Syers, J.K., Craswell, E.T. (1995) Role of soil organic matter in sustainable agricultural systems. In: Lefroy, R.D.B., Blair, G.J., Craswell, E.T. (ed.) *Soil organic matter management for sustainable agriculture*. Canberra: ACIAR, p.7-14.
- Taranto, M.T., Adams, M.A., Polglase, P.J. (2000) Sequential fractionation and characterisation (^{31}P NMR) of phosphorus-amended soils in *Banksia integrifolia* (L.f.) woodland and adjacent pasture. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 169-177.
- Tiessen, H., Moir, J. (2007) Characterization of available P by sequential extraction. In: Carter, M.R., Gregorich, E.G. (eds.) *Soil sampling and methods of analysis*. Canadian Society of Soil Science, p.293-306.
- Turner, B.L. (2008) Soil organic phosphorus in tropical forests: An assessment of the NaOH–EDTA extraction procedure for quantitative analysis by solution ^{31}P NMR spectroscopy. *Eur. J. Soil Sci.* 59, 453–466.
- Turner, B.L., Blackwell, M.S.A. (2013) Isolating the influence of pH on the amounts and forms of soil organic phosphorus. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 249–259.
- Turner, B.L., Cheesman, A.W., Godage, H.Y., Riley, A.M., Potter, B.V.L. (2012) Determination of neo- and D-chiro-inositol hexakisphosphate in soils by solution ^{31}P NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 46, 4994–5002.
- Turner, B.J., Engelbrecht, B.M.J. (2011) Soil organic phosphorus in lowland tropical rain forests. *Biogeochemistry* 103, 297–315.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condon, L.M. (2003) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectral assignments of phosphorus compounds in soil NaOH–EDTA extracts. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67, 497–510.

- Turner, B.L., Newman, S. (2005) Phosphorus cycling in wetland soils: The importance of phosphorus diesters. *J. Environ. Qual.* 34, 1921–1929.
- Turner, B.L., Newman, S., Reddy, K.R. (2006) Overestimation of organic phosphorus in wetland soils by alkaline extraction and molybdate colorimetry. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3349–3354.
- Turner, B.L., Wells, A., Condon, L.M. (2014) Soil organic phosphorus transformations along a coastal dune chronosequence under New Zealand temperate rain forest. *Biogeochemistry* 121, 595–611.
- Turrion, M.B., Lafuente, F., Aroca, J.J., López, O., Mulas, R., Ruipérez, C. (2010) Characterization of soil phosphorus in a fire-affected forest Cambisol by chemical extractions and ^{31}P -NMR spectroscopy analysis. *Sci. Total Environ.* 408, 3342–3348.
- Vestergren, J., Vincent, A.G., Jansson, M., Persson, P., Ilstedt, U., Gröbner, G. (2012) High-resolution characterization of organic phosphorus in soil extracts using 2D ^1H – ^{31}P correlation spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 46, 3950–3956.
- Vincent, A.G., Turner, B.L., Tanner, E.V.J. (2010) Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest. *Eur. J. Soil Sci.* 61, 48–57.
- Young, E.O., Ross, D.S., Cade-Menun, B.J., Liu, C.W. (2013) Phosphorus speciation in riparian soils: A phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy and enzyme hydrolysis study. *Soil Sci. Soc. Am. J.* (in press).
- Zaia, F.C., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Machado, R.C.R. (2008) Fósforo orgânico em solos sob agroecossistemas de cacau. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32, 1987-1995.
- Zaia, F.C., Gama-Rodrigues, A.C., Gama-Rodrigues, E.F., Moço, M.K.S., Fontes, A.G., Machado, R.C.R., Baligar, V.C. (2012) Carbon, nitrogen, organic phosphorus, microbial biomass and N mineralization in soils under cacao agroforestry systems in Bahia, Brazil, *Agroforestry Systems* 86(2), 197-212.