

**KASSIANO FELIPE ROCHA**

**DINÂMICA DO NITROGÊNIO EM ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO**

**Botucatu**

**2017**



**KASSIANO FELIPE ROCHA**

**DINÂMICA DO NITROGÊNIO EM ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp – Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de Doutor  
em Agronomia (Agricultura)

Orientador: Prof. Dr. Ciro Antonio Rosolem

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

R672d Rocha, Kassiano Felipe, 1989-  
Dinâmica do nitrogênio em rotações de forrageiras com milho / Kassiano Felipe Rocha. - Botucatu: [s.n.], 2017  
141 p.: il., color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Ciro Antonio Rosolem  
Inclui bibliografia

1. Nitrogênio - Fixação. 2. Fertilizantes nitrogenados  
3. Minerais na nutrição de plantas. 4. Milho - Produtividade. I. Rosolem, Ciro Antonio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

\*Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte\*

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE: DINÂMICA DO NITROGÊNIO EM ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO**

**AUTOR: KASSIANO FELIPE ROCHA**

**ORIENTADOR: CIRO ANTONIO ROSOLEM**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CIRO ANTONIO ROSOLEM

Depto de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu

Prof. Dr. LUIS IGNACIO PROCHNOW

IFNI / IPNI - International Plant Nutrition Institute

DR. JOSÉ ANTONIO QUAGGIO

Centro de Solos e Recursos Agroambientais / INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS

DOUTOR HEITOR GANZARELLA

IAC / INSTITUTO AGRÔNOMICO DE CAMPINAS

DR. EDUARDO MARIANO

DEPTO DE PRODUÇÃO E MELHORAMENTO VEGETAL / FCA - PÓS-DOUTORANDO

Botucatu, 26 de setembro de 2017



À minha noiva Josi,  
Aos meus pais Valdir e Dirce,  
Dedico

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me deu forças e me guiou até aqui.

À minha noiva Josi que sempre está ao meu lado.

Aos meus queridos pais, Valdir e Dirce, pelos conselhos e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e demais familiares, que quando precisei sempre estiveram prontos a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Ciro Rosolem, primeiramente pela confiança, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade e exemplo de professor, além de me proporcionar a oportunidade de crescimento e conquistas profissionais.

Ao departamento de Agricultura da FCA – UNESP e ao programa de Pós Graduação que abriram as portas para mim e me deram suporte para que eu pudesse alcançar esse importante objetivo em minha carreira profissional.

À equipe da Fazenda Lageado, FCA – UNESP, que me auxiliou com insumos agrícolas e nas atividades de campo para aquisição de resultados de alta qualidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro, concedido por meio de bolsa de doutorado.

Ao CENA e ESALQ-USP, em especial aos professores Tsai Siu Mui e Paulo Cesar Ocheuze Trivelin e suas respectivas equipes, pelo apoio e ensinamentos à parte deste trabalho que foi realizada em parceria.

Ao IPNI que me premiou no IPNI Scholar Award em 2015 com o tema da presente tese, que, além de realização profissional, me auxiliou em minha carreira profissional.

Aos amigos e colegas que sempre estiveram juntos nas atividades teóricas, intelectuais e práticas, de campo e laboratório deste curso, mantendo a mais elevada qualidade e confiabilidade de resultados, posso dizer que sem eles nada disso teria acontecido, mas que também estiveram juntos nos momentos de festas e descontração, amigos que levarei para sempre comigo.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra estiveram presentes me ajudando a construir essa grande conquista.

Muito obrigado!





## RESUMO

Forrageiras do gênero *Urochloa* podem alterar a dinâmica do N no solo, afetando processos microbiológicos do ciclo do N, sua disponibilidade no solo e perdas no sistema. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do cultivo de *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha* e *Panicum maximum* na dinâmica do N no solo, ou seja, potencial de nitrificação, atividade de microrganismos amonificantes, nitrificantes e fixadores de N, bem como possíveis rotas de saída de N do sistema por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização  $\text{N-NH}_3$  e o seu efeito no milho cultivado em sucessão, bem como na recuperação do N-fertilizante pela cultura. Foi conduzido um experimento em um Nitossolo Vermelho distroférico de textura argilosa. Foram utilizadas as forrageiras *U. ruziziensis* cv. Comum, *U. brizantha* cv. Marandú, e *P. maximum* cv. Tanzânia. Na cultura do milho foram aplicadas as doses de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>, sendo a dose de 140 kg N ha<sup>-1</sup> enriquecida com <sup>15</sup>N. As gramíneas forrageiras permaneceram na área por 11 meses (outubro/2014 a setembro/2015) quando foram dessecadas e o milho foi semeado em semeadura direta. O processo de amonificação não é diminuído no solo cultivado com *U. ruziziensis*, mas o milho cultivado após esta espécie produz menos em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*. Em sistemas de produção de alta resposta a N, o cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, mesmo com a adição de até 210 kg ha<sup>-1</sup> de N, não diferem em potencial de provocar perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização de  $\text{N-NH}_3$ . A recuperação do N aplicado via fertilizante pelo milho foi de apenas 35%, indicando que 65% do N utilizado pelo milho é proveniente do N do solo e assim tendo alta dependência da dinâmica das gramíneas forrageiras sobre a disponibilidade de N em sistemas integrados de produção. As evidências de que a FBN está ocorrendo em sistemas de produção com *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, aumentando a quantidade de nitrogênio total no solo, mostram uma importante entrada de N no sistema de produção. Mais estudos devem ser conduzidos em sistemas de produção em clima tropical com gramíneas do gênero *Urochloa* a fim de observar com mais detalhes o processo de FBN e processos de nitrificação do  $\text{N-NH}_4^+$  no solo cultivado com estas gramíneas.

**Palavras-chave:** Disponibilidade de N. Produtividade de milho. Sistema de produção.



## ABSTRACT

Forages of the *Urochloa* genus can change the soil N dynamics, affecting microbiological processes of the N cycle, their availability in the soil and losses in the system. The objective of this work was to evaluate the effect of the cultivation of *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa brizantha* and *Panicum maximum* on N soil dynamics, that is, nitrification potential, activity of ammonificants, nitrifying and N fixers microorganisms, as well as possible loss routes by N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching, N-NH<sub>3</sub> volatilization and N-N<sub>2</sub>O emission and its effect on corn grown in succession, as well as N-fertilizer recovery by the crop. An experiment was carried on a clayey Typic Rhodustult in a factorial design 3x4 in randomized blocks with three forage species and four N doses in four replications. Were used the forage species *U. ruziziensis* cv. Common, *U. brizantha* cv. Marandú, and *P. maximum* cv. Tanzânia. In the corn crop, the doses of 0, 70, 140 and 210 kg N ha<sup>-1</sup> were applied, and the dose of 140 kg N ha<sup>-1</sup> was enriched with <sup>15</sup>N. Forage grasses remained in the area for 11 months (October/2014 to September/2015) when they were desiccated and corn was sown in no-tillage. The ammonification process isn't decreased in soil cultivated with *U. ruziziensis*, but corn yield, after this species, is lower than after *U. brizantha* and *P. maximum*. In high-N response systems, the cultivation of *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum*, even with 210 kg ha<sup>-1</sup> of N, don't differ in potential to cause N losses by N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching, N-NH<sub>3</sub> volatilization and N-N<sub>2</sub>O emission. The N-fertilizer recovery applied on corn was only 35%, indicating that 65% of the N used by corn comes from soil N and thus having high dependence on the dynamics of forage grasses on the availability of N in integrated production systems. Evidence that BNF is occurring in production systems with *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum*, increasing the amount of total nitrogen in the soil, show an important N input in the production system. More studies should be conducted in tropical climate production systems with grasses of the *Urochloa* genus in order to observe in more detail the BNF process and N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nitrification processes in the soil cultivated with these grasses.

**Keywords:** N availability. Corn Yield. Production systems.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*) e do milho em sucessão. .... 29
- Figura 2 – Teor de  $N-NH_4^+$  (A, C e E) e  $N-NO_3^-$  (B, D e F) no solo nas camadas de 0,0-0,1, 0,1-0,2 e 0,2-0,4 m de profundidade, respectivamente, aos 0, 6, 8 e 11 meses após a semeadura de *U. ruziziensis*, *U. Brizantha* e *P. maximum*. Barras verticais indicam diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .... 37
- Figura 3 – Quantidade acumulada de N-mineral ( $N-NH_4^+$  +  $N-NO_3^-$ ) no solo nas camadas de 0,0-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,4, 0,4-0,6 e 0,6-0,8 m de profundidade 11 meses após a semeadura de *U. ruziziensis*, *U. Brizantha* e *P. maximum* por ocasião da dessecação das gramíneas (A) e após o cultivo de milho (B). Média de quatro doses de N (0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>) para a quantidade acumulada de N-mineral após o milho. Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). .... 38
- Figura 4 – Nitrogênio total nas camadas de 0,0-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,4, 0,4-0,6 e 0,6-0,8 m de profundidade no início do experimento e após os cultivos de *U. ruziziensis*, *U. Brizantha* e *P. maximum* por 11 meses e um cultivo de milho em sucessão. Médias de quatro doses de N (0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>). \*Diferença significativa pelo teste de Dunnett ( $p > 0,05$ ) em relação à quantidade de N-total no início do experimento. .... 39
- Figura 5 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*). \*MAS = Meses após a semeadura das gramíneas forrageiras. .... 55
- Figura 6 – Abundância de genes 16S *Achaea* (A), 16S *Bacteria* (B), *amoA* (C), *amoB* (D), *nifH* (E) e microrganismos amonificantes (F) em solo durante o cultivado com *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*. Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula dentro de cada espécie de gramínea forrageira e minúscula dentro de cada época de amostragem, diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Barras indicam o desvio padrão. 61
- Figura 7 – Estimativas de correlação de Pearson do teor de amônio ( $N-NH_4^+$ ) do solo e a abundância de bactéria oxidantes de amônio (*amoB*) em solo cultivado por 11 meses com *U. brizantha* amostrado aos 0, 6, 8 e 11 meses após a semeadura. \*Significativo pelo teste t ( $p < 0,05$ ). .... 62
- Figura 8 – Estimativas de correlação de Pearson do teor de amônio ( $N-NH_4^+$ ) do solo e a abundância total de arqueia (A) e bactéria (B), bactérias oxidantes de amônio (C) e microrganismos fixadores de nitrogênio (D) em solo cultivado por 11 meses com *U. ruziziensis* amostrado aos 0, 6, 8 e 11 meses após a semeadura. \*Significativo pelo teste t ( $p < 0,05$ ). .... 63
- Figura 9 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*) e do milho em sucessão. .... 76
- Figura 10 – Representação da microparcela utilizada para aplicação de sulfato de amônio enriquecido com <sup>15</sup>N, áreas de amostragem de solo, palha e plantas de milho. .... 80

Figura 11 – Nitrogênio no solo proveniente do fertilizante (NSPF) (A) e nitrogênio residual no solo (NRS) (B) no estágio de maturação fisiológica do milho cultivado após <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> .....	83
Figura 12 – Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) (A) e eficiência de uso do nitrogênio (EUN) (B) pelo colmo, folha, sabugo + palha da espiga e grãos de milho cultivado após <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> .....	85
Figura 13 – Nitrogênio total proveniente do fertilizante (NTPF) (A) e recuperação total do nitrogênio proveniente do fertilizante (RTNPF) (B) pelo solo, gramíneas forrageiras e milho.....	85
Figura 14 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras ( <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> ) e do milho em sucessão.....	97
Figura 15 – Teor de nitrogênio na folha diagnose de milho cultivado após 11 meses de cultivo de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha <sup>-1</sup> . <i>p</i> = Probabilidade a 5%.....	105
Figura 16 – Matéria seca total de plantas inteiras de milho (colmo + folhas + espiga + sabugo + grão) cultivado com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha <sup>-1</sup> (A) após <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> (B). <i>p</i> = Probabilidade a 5%. Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem pelo teste de Tukey ( <i>p</i> <0,05).....	106
Figura 17 – Teor de nitrogênio no tecido (A) e nitrogênio acumulado (B) em plantas inteiras de milho (colmo + folhas + espiga + sabugo + grão) cultivado após <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> , e <i>P. maximum</i> , com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha <sup>-1</sup> . <i>p</i> = Probabilidade a 5%.....	106
Figura 18 – Produtividade de grãos de milho cultivado após <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha <sup>-1</sup> . <i>p</i> = Probabilidade a 5%. Barras indicam DMS Tukey ( <i>p</i> <0,05). .....	107
Figura 19 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras ( <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> ) e do milho em sucessão.....	122

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,00 – 0,20 m de profundidade.	30
Tabela 2 – Quantidade acumulada de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-mineral (N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) e N-total (N-mineral + N-orgânico) no solo antes da implantação do experimento.	30
Tabela 3 – Lixiviação de nitrato acumulado abaixo de 0,80 m de profundidade em sistema de rotações com 11 meses de cultivo de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> e uma safra de milho com 0, 70, 140 e 210 kg ha <sup>-1</sup> de N.	40
Tabela 4 – Emissão de N-N <sub>2</sub> O acumulado durante 11 meses de cultivo de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> , um cultivo de milho e total no sistema de rotação de forrageiras com milho (16 meses).	40
Tabela 5 – Quantidade acumulada de N-NH <sub>3</sub> em sistema de produção após 11 meses de cultivo de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> e um cultivo de milho com aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg ha <sup>-1</sup> de N.	41
Tabela 6 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,00 – 0,20 m de profundidade.	56
Tabela 7 – Genes alvo, primers, sequências e condições de amplificação utilizados para determinação de microrganismos fixadores de nitrogênio, oxidantes de amônio e <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> total no solo.	59
Tabela 8 – Potencial de nitrificação de amostras de solo cultivado por 11 meses com <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> nas camadas de 0-0,10 e 0,10-0,20 m de profundidade.	60
Tabela 9 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,0 – 0,20 m de profundidade.	77
Tabela 10 – Nitrogênio na palha das forrageiras proveniente do fertilizante (NPFPF) e porcentagem do nitrogênio na palha das forrageiras proveniente do fertilizante (PNPFPF) após o cultivo de milho.	84
Tabela 11 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0–0,2 m de profundidade.	98
Tabela 12 – Produção de matéria seca, teor de nitrogênio no tecido vegetal e nitrogênio acumulado em <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> aos 3, 6, 8 e 11 meses após a semeadura.	102
Tabela 13 – Matéria seca exportada, teor de nitrogênio no tecido e nitrogênio exportado no tecido vegetal de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> , devido à simulação de pastejo aos 6 e 8 meses após a semeadura.	104
Tabela 14 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,00 – 0,20 m de profundidade.	123
Tabela 15 – Precipitação acumulada e entrada de nitrogênio no sistema de produção em esquema de rotações de forrageiras com milho.	129
Tabela 16 – Saídas de nitrogênio por lixiviação de nitrato (N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), volatilização de amônia (N-NH <sub>3</sub> ) e emissão de óxido nitroso (N-N <sub>2</sub> O) em sistema de rotações de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> cultivado por 11 meses com um ciclo de milho com 0, 70, 140 e 210 kg ha <sup>-1</sup> de N.	130
Tabela 17 – Nitrogênio exportado no tecido vegetal de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> aos 6 e 8 meses após a semeadura.	131



Tabela 18 – Nitrogênio exportado via grãos de milho cultivado após <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha <sup>-1</sup> . .....	131
Tabela 19 – Balanço de nitrogênio em sistema de rotações de <i>U. ruziziensis</i> , <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> cultivado por 11 meses com um ciclo de milho em sucessão com 0, 70, 140 e 210 kg ha <sup>-1</sup> de N. ....	132

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	23
<b>CAPÍTULO 1 - DINÂMICA NO SOLO E PERDAS DE NITROGÊNIO EM ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO.....</b>	<b>25</b>
Resumo.....	25
Abstract .....	25
1.1 Introdução .....	26
1.2 Material e métodos.....	28
1.2.1 Caracterização da área .....	28
1.2.2 Delineamento experimental e tratamentos.....	31
1.2.3 Instalação e condução do experimento.....	31
1.2.4 Nitrato e amônio no perfil do solo .....	32
1.2.5 Nitrogênio total e pH.....	33
1.2.6 Lixiviação de nitrato .....	33
1.2.7 Emissão de óxido nitroso.....	34
1.2.8 Volatilização de amônia.....	35
1.2.9 Análise estatística.....	36
1.3 Resultados.....	36
1.3.1 Dinâmica do amônio e nitrato no solo.....	36
1.3.2 Nitrogênio mineral acumulado.....	37
1.3.3 Nitrogênio total no solo .....	38
1.3.4 Lixiviação de nitrato .....	39
1.3.5 Emissão de óxido nitroso.....	40
1.3.6 Volatilização de amônia.....	41
1.4 Discussão .....	41
1.4.1 Dinâmica do amônio e nitrato no solo.....	41
1.4.2 Nitrogênio mineral acumulado.....	42
1.4.3 Nitrogênio total no solo .....	43
1.4.4 Perdas de nitrogênio.....	44
1.5 Conclusão.....	46
1.6 Referências.....	46
<b>CAPÍTULO 2 - POTENCIAL DE NITRIFICAÇÃO, MICRORGANISMOS FIXADORES E OXIDANTES DE NITROGÊNIO EM SOLO CULTIVADO COM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS.....</b>	<b>51</b>
Resumo.....	51

<b>Abstract</b> .....	<b>51</b>
<b>2.1</b> Introdução .....	<b>52</b>
<b>2.2</b> Material e métodos.....	<b>54</b>
<b>2.2.1</b> Caracterização da área do experimento .....	<b>54</b>
<b>2.2.2</b> Delineamento experimental e tratamentos.....	<b>56</b>
<b>2.2.3</b> Instalação e condução do experimento .....	<b>56</b>
<b>2.2.4</b> Amostragem de solo.....	<b>56</b>
<b>2.2.5</b> Potencial de nitrificação .....	<b>57</b>
<b>2.2.6</b> Quantificação de microrganismos amonificantes .....	<b>57</b>
<b>2.2.7</b> Quantificação de microrganismos nitrificantes e fixadores de nitrogênio.....	<b>58</b>
<b>2.2.8</b> Análise estatística.....	<b>59</b>
<b>2.3</b> Resultados .....	<b>60</b>
<b>2.3.1</b> Potencial de nitrificação.....	<b>60</b>
<b>2.3.2</b> Abundância de microrganismos amonificantes, nitrificantes e fixadores de nitrogênio .....	<b>60</b>
<b>2.3.3</b> Correlações de abundância de microrganismos de solo e nitrogênio mineral no solo .....	<b>62</b>
<b>2.4</b> Discussão.....	<b>63</b>
<b>2.4.1</b> Potencial de nitrificação.....	<b>63</b>
<b>2.4.2</b> Abundância de microrganismos amonificantes, nitrificantes e fixadores de nitrogênio .....	<b>64</b>
<b>2.4.3</b> Correlações de abundância de microrganismos de solo e nitrogênio mineral no solo .....	<b>66</b>
<b>2.5</b> Conclusão .....	<b>67</b>
<b>2.6</b> Referências .....	<b>67</b>
<b>CAPÍTULO 3 - RECUPERAÇÃO DO NITROGÊNIO DO FERTILIZANTE PELO MILHO CULTIVADO APÓS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS</b> .....	<b>72</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>72</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>72</b>
<b>3.1</b> Introdução .....	<b>73</b>
<b>3.2</b> Material e métodos.....	<b>75</b>
<b>3.2.1</b> Caracterização da área .....	<b>75</b>
<b>3.2.2</b> Delineamento experimental e tratamentos.....	<b>77</b>
<b>3.2.3</b> Instalação e condução do experimento .....	<b>77</b>
<b>3.2.4</b> Produção e aplicação do sulfato de amônio enriquecido com <sup>15</sup> N.....	<b>79</b>
<b>3.2.5</b> Amostragem de solo, palha das gramíneas forrageiras e de plantas de milho..	<b>79</b>
<b>3.2.6</b> Nitrogênio no solo e planta .....	<b>81</b>

3.2.7	Análise estatística.....	82
3.3	Resultados.....	83
3.3.1	Nitrogênio residual no solo proveniente do fertilizante .....	83
3.3.2	Nitrogênio na palha das forrageiras proveniente do fertilizante .....	83
3.3.3	Recuperação do nitrogênio proveniente do fertilizante pelo milho .....	84
3.3.4	Nitrogênio no solo, palha e no milho proveniente do fertilizante.....	85
3.4	Discussão.....	86
3.4.1	Nitrogênio residual no solo e na palha das gramíneas forrageiras proveniente do fertilizante.....	86
3.4.2	Recuperação do nitrogênio proveniente do fertilizante pelo milho .....	87
3.4.3	Recuperação do nitrogênio proveniente do fertilizante no solo, palha das gramíneas forrageiras e milho .....	89
3.5	Conclusão.....	90
3.6	Referências.....	90
	<b>CAPÍTULO 4 - PRODUÇÃO E NITROGÊNIO NAS PLANTAS EM SISTEMA DE ROTAÇÃO MILHO COM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS .....</b>	<b>94</b>
	Resumo.....	94
	Abstract .....	94
4.1	Introdução .....	95
4.2	Material e métodos.....	96
4.2.1	Caracterização da área .....	96
4.2.2	Delineamento experimental e tratamentos.....	98
4.2.3	Instalação e condução do experimento.....	98
4.2.4	Produção de matéria seca e matéria seca exportada das gramíneas forrageiras.....	100
4.2.5	Produção de matéria seca de milho e produtividade de grãos .....	100
4.2.6	Teor e acúmulo de nitrogênio nas gramíneas forrageiras e no milho.....	101
4.2.7	Análise estatística.....	101
4.3	Resultados.....	102
4.3.1	Produção e acúmulo de matéria seca e nitrogênio das gramíneas forrageiras.....	102
4.3.2	Exportação de matéria seca e nitrogênio pelas gramíneas forrageiras.....	103
4.3.3	Folha diagnose de milho .....	104
4.3.4	Matéria seca, teor de N no tecido e N acumulado no milho.....	105
4.3.5	Produtividade de grãos de milho .....	107
4.4	Discussão .....	108
4.4.1	Produção e acúmulo de matéria seca e nitrogênio das gramíneas forrageiras.....	108
4.4.2	Matéria seca e nitrogênio exportado pelas gramíneas forrageiras .....	109

4.4.3	Folha diagnose de milho .....	111
4.4.4	Matéria seca, teor de N no tecido e N acumulado no milho.....	111
4.4.5	Produtividade de grãos de milho.....	113
4.5	Conclusão .....	113
4.6	Referências .....	114
	<b>CAPÍTULO 5 - BALANÇO DE NITROGÊNIO EM SISTEMA DE ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO .....</b>	<b>118</b>
	Resumo.....	118
	Abstract .....	118
5.1	Introdução .....	119
5.2	Material e métodos.....	122
5.2.1	Caracterização da área .....	122
5.2.2	Delineamento experimental e tratamentos.....	123
5.2.3	Instalação e condução do experimento .....	124
5.2.4	Entradas de N via chuva e fertilizante .....	125
5.2.5	Saídas de N via lixiviação de nitrato, emissão de oxido nitroso e volatilização de amônia.....	125
5.2.6	Saída de N via exportação de forragem e grãos de milho .....	127
5.2.7	Balanço de nitrogênio .....	128
5.2.8	Análise estatística.....	129
5.3	Resultados .....	129
5.3.1	Entrada de N via chuva e fertilizante .....	129
5.3.2	Saída de N via lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de óxido nitroso .....	129
5.3.3	Exportação de N via gramíneas forrageiras e grãos de milho.....	130
5.3.4	Balanço de N nos sistemas de produção.....	131
5.4	Discussão.....	132
5.4.1	Entradas de nitrogênio no sistema de produção.....	132
5.4.2	Saídas de nitrogênio no sistema de produção .....	133
5.4.3	Balanço de nitrogênio no sistema de produção.....	135
5.5	Conclusão .....	136
5.6	Referências .....	137
	<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>141</b>
	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>143</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>144</b>

<b>ANEXO A – Medidas de umidade do solo (A) e amostragem de solução do solo (B) para estimar lixiviação de nitrato, amostragem de gás (C) para estimativas de emissão de óxido nitroso, coletor de amônia (D) para estimativas de volatilização e amostragem de solo (E) para estimar N-mineral, N- total e atividade microbiana do ciclo do nitrogênio. ....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO B – pH (CaCl<sub>2</sub>) do solo nas camadas de 0,00-0,10, 0,10-0,20, 0,20-0,40, 0,40-0,60 e 0,60-0,80 m de profundidade após o cultivo de <i>U. ruziziensis</i>, <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> por 11 meses e um cultivo de milho adubado com 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO C – Estágios de desenvolvimento da <i>U. ruziziensis</i> (A e D), <i>U. brizantha</i> (B e E) e <i>P. maximum</i> (C e F) aos 5 (A, B e C) e aos 6 (D, E e F) meses após a semeadura. ....</b>	<b>148</b>
<b>ANEXO D – Estágios de desenvolvimento da <i>U. ruziziensis</i> (A e D), <i>U. brizantha</i> (B e E) e <i>P. maximum</i> (C e F) aos 8 (A, B e C) e aos 11 (D, E e F) meses após a semeadura. ....</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO E – Dessecação das gramíneas forrageiras (A), semeadura (B) e colheita (C) do milho. ....</b>	<b>150</b>
<b>ANEXO F – Milho cultivado após <i>U. ruziziensis</i> (A), <i>U. brizantha</i> (B) e <i>P. maximum</i> (C) sem nitrogênio a frente e com 140 kg ha<sup>-1</sup> ao fundo aos 50 dias após a semeadura. ....</b>	<b>150</b>
<b>ANEXO G – Entradas, saídas e balanço de nitrogênio em sistemas de produção com rotações de <i>U. ruziziensis</i>, <i>U. brizantha</i> e <i>P. maximum</i> com milho fertilizado com 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.....</b>	<b>151</b>







## INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os fatores que afetam a disponibilidade de nitrogênio (N) em sistemas agrícolas, encontram-se a adição de fertilizantes nitrogenados, a fixação biológica de N (FBN), adições de N pelas chuvas, perdas por lixiviação de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) e por emissão de óxido nitroso ( $\text{N-N}_2\text{O}$ ) e volatilização amônia ( $\text{N-NH}_3$ ). Sistemas conservacionistas como a semeadura direta podem, com o tempo, melhorar a eficiência de uso do N presente no perfil do solo, onde o pH, a relação carbono/nitrogênio (C/N) e a atividade microbiana são os principais fatores reguladores (CANTARELLA, 2007). Gramíneas do gênero *Urochloa* normalmente possuem alta relação C/N, principalmente nas raízes, o que pode resultar em imobilização de N (ROSOLEM et al., 2012). Outro fator que pode afetar a disponibilidade de N no solo é a exsudação de compostos pelas raízes, modificando a microbiota do solo, diminuindo ou inibindo processos de amonificação e nitrificação (SUBBARAO et al., 2007; ÚLEHLOVÁ et al., 1988). Recentemente foi demonstrado que gramíneas do gênero *Urochloa* (Sin. *Brachiaria*) poderiam alterar a dinâmica do N no solo. A *Urochloa humidicola* apresentou inibição da nitrificação através da exsudação de Brachialactone (SUBBARAO et al., 2009), aumentando a relação amônio/nitrato ( $\text{N-NH}_4^+/\text{N-NO}_3^-$ ) do solo (SUBBARAO et al., 2013). Entretanto Castoldi et al. (2013) não conseguiram demonstrar esse efeito em solos com pH mais alto e mais ricos em N. Quando as urochloas são dessecadas com glifosato podem ocorrer perdas de  $\text{N-NH}_3$  por volatilização, mas essas perdas não são grandes, e são equivalentes para *U. brizantha* e *U. ruziziensis* (CASTOLDI et al., 2014). Essa é uma evidência de que as diferenças observadas provavelmente não são devidas a esse tipo de perda de N do sistema.

É conhecido o efeito de gramíneas, principalmente, na redução do N disponível no solo, sendo esse efeito relacionado à relação C/N, qualidade da matéria seca e até efeitos alelopáticos (ROSOLEM et al., 2012). Entretanto, não foram encontradas referências ao efeito de espécies de gramíneas afetando o N do solo através da ação sobre populações amonificadoras.

Em Botucatu, São Paulo, foi constatada diminuição da produtividade de milho em áreas cultivadas previamente com *U. ruziziensis*, mas onde se cultivou *U. brizantha* antes do milho esse efeito não se pronunciou (MARQUES, 2015). Segundo Marques (2015), o milho cultivado após *U. ruziziensis* teve crescimento menor que quando

cultivado após *U. brizantha*, e apresentava sintomas típicos de deficiência de N. Uma análise preliminar mostrou maiores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  no solo cultivado com *U. Brizantha*, onde havia mais microrganismos amonificantes. Além do mais, a adubação nitrogenada corrigiu os sintomas. Foi verificada maior resposta do algodoeiro ao N em solo que continha raízes de *U. ruzizensis*, efeito atribuído à competição pelo  $\text{N-NO}_3^-$  do solo (Echer et al. 2012). Entretanto, se fosse simplesmente competição pelo  $\text{N-NO}_3^-$ , efeito semelhante deveria ser observado com outras espécies de urochloas, que não foi o caso. Assim, há evidências de que a *U. ruzizensis* poderia diminuir a disponibilidade de N às culturas, embora não se conheça o mecanismo de ação.

A hipótese é de que a *U. ruzizensis* promove diminuição na atividade de amonificação do N no solo, de modo a diminuir a disponibilidade de N para o milho em sucessão em relação à *U. brizantha*, diminuindo a produtividade do milho e aumentando o requerimento de fertilizante nitrogenado em sistemas de produção envolvendo *U. ruzizensis*. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito das gramíneas forrageiras *U. ruzizensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* cultivadas por 11 meses, antes do milho, na dinâmica e estoque do N no solo, quantificando o potencial de nitrificação, atividade de microrganismos amonificantes, nitrificantes e fixadores de N, bem como o efeito das gramíneas forrageiras e de um cultivo de milho sobre as perdas de N do sistema por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização de  $\text{N-NH}_3$  e o efeito sobre o aproveitamento do fertilizante nitrogenado.

## CAPÍTULO 1

### DINÂMICA NO SOLO E PERDAS DE NITROGÊNIO EM ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO

#### Resumo

Forrageiras do gênero *Urochloa* podem alterar a dinâmica do N no solo, podendo indisponibilizá-lo às plantas e promovendo perdas por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , volatilização de  $\text{N-NH}_3$  e emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  afetando o montante de N-total no solo. O objetivo do trabalho foi verificar a variabilidade dos teores e na quantidade acumulada de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  (N-mineral) e N-total no solo durante 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* e no milho cultivado em sucessão com a aplicação de 0, 70, 140 e 210  $\text{kg ha}^{-1}$  de N. Objetivou-se também quantificar as perdas de N do sistema de produção, no período de desenvolvimento das gramíneas forrageiras e do milho, via lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , volatilização de  $\text{N-NH}_3$  e emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$ . Foi conduzido um experimento em um Nitossolo Vermelho distroférico de textura argilosa com três espécies de gramíneas forrageiras e quatro doses de N num delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, em quatro repetições. Em sistemas de alta resposta a N, o teor de N-mineral do solo, independente de variações em seu teor, não supre as necessidades da cultura do milho para produtividade de grãos acima de 10.000  $\text{kg ha}^{-1}$ . O *P. maximum* e *U. ruziziensis* aumentam o estoque de N-total no solo em relação à *U. ruziziensis*. As espécies de gramíneas forrageiras e as doses de sulfato de amônio aplicadas no milho não afetam perdas de N por lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de óxido nitroso que foram menores que 13  $\text{kg ha}^{-1}$  de N. As perdas de N por lixiviação  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização de  $\text{N-NH}_3$  foram pequenas e, assim, não são suficientes para reduzir a disponibilidade de N para o milho em sucessão às gramíneas forrageiras.

### SOIL DYNAMIC AND NITROGEN LOSSES IN FORAGE-CORN ROTATIONS

#### Abstract

Forages of the *Urochloa* genus can alter the N dynamics in the soil and can make them unavailable to plants and promote losses by  $\text{N-NO}_3^-$  leaching,  $\text{N-NH}_3$  volatilization and  $\text{N-N}_2\text{O}$  emission affecting the amount of N-total in the soil. The objective of this work was to verify the variability of the contents and the accumulated amount of  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_3^-$  (N-mineral) and N-total in the soil during 11 months cultivated *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum* and one season of corn in succession with 0, 70, 140 and 210  $\text{kg ha}^{-1}$  of N application. Was aimed also quantify N losses in the production system during the development of forage grasses and corn, by  $\text{N-NO}_3^-$  leaching,  $\text{N-NH}_3$  volatilization and  $\text{N-N}_2\text{O}$  emission. An experiment was carried on a clayey Typic Rhodustult in a factorial design 3x4 in randomized blocks with three forages species and four N doses in four replications. In high-N response systems, the N-mineral content of the soil, regardless the content variations, doesn't satisfy the corn crop requirements for grain yields above of 10,000  $\text{kg ha}^{-1}$ . *P. maximum* and *U. ruziziensis* increase the N-total stock in the soil in

relation to *U. ruziziensis*. Forage grasses species and the doses of ammonium sulphate applied to corn don't affect N losses by  $\text{N-NO}_3^-$  leaching,  $\text{N-NH}_3$  volatilization and  $\text{N-N}_2\text{O}$  emission, that were lower than  $13 \text{ kg ha}^{-1}$  of N.  $\text{N-NO}_3^-$  leaching,  $\text{N-NH}_3$  volatilization and  $\text{N-N}_2\text{O}$  emission were small and, thus, not sufficient to reduce N availability to corn in succession to forage grasses.

## 1.1 Introdução

Aproximadamente 95% do N-total do solo está na forma orgânica (KEENEY & NELSON, 1982). Apesar de ser na sua maioria indisponível para as plantas, o N-orgânico é importante fonte de N desde que ocorra sua mineralização. Não se observou incremento na produtividade com as doses de N aplicadas ao milho em muitos trabalhos, em solos com matéria orgânica acima de 5%, (ROCHA et al., 2014), devido à capacidade de suprimento de N por meio da mineralização do N-orgânico (HUMPHREYS, 1994).

Dos 5% de N que compõem a fração mineral do nutriente no solo (KEENEY & NELSON, 1982), amônio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) e nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ) são as formas absorvidas pelas plantas. Estas devem estar em quantidade suficiente na solução do solo para que a cultura possa absorvê-las e expressar o seu potencial produtivo (ROS et al., 2003). A variabilidade das condições edafoclimáticas, associada aos processos que interferem na dinâmica do N no solo e nas suas relações com a planta, podem ocasionar modificações na disponibilidade desse nutriente para a planta (ESPINDULA et al., 2010). O processo de mineralização/imobilização do N contido no material vegetal, matéria orgânica e no solo é dependente de fatores como umidade, temperatura e pH. Os microrganismos que atuam nesse processo operam preferencialmente em faixas de pH próximas a neutralidade, ainda que existam grupos que atuam em pH ácido (CANTARELLA, 2007).

A mineralização do N ocorre em duas etapas distintas, amonificação e nitrificação. Do N-orgânico presente no solo, parte é representado por agrupamentos amins com um radical livre ( $\text{R-NH}_2$ ), que quando utilizados por microrganismos são reduzidos à amônia ( $\text{N-NH}_3$ ) que, encontrando um íon hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) conclui o processo de amonificação formando íons  $\text{N-NH}_4^+$ . Fungos, bactérias, arqueias e actinomicetos atuam no processo de amonificação, uma vez que há grande variedade de material vegetal e os microrganismos são específicos para cada fração de material a ser mineralizado (ÚLEHLOVÁ et al., 1988). A nitrificação por sua vez é um processo dependente da amonificação ou de alguma fonte que lhe forneça N-

$\text{NH}_4^+$ . Através da atividade de bactérias do gênero *Nitrossomonas*, em meio aeróbio, ocorre a oxidação do  $\text{N-NH}_4^+$  até a formação de nitrito ( $\text{N-NO}_2^-$ ). O  $\text{N-NO}_2^-$  por sua vez é rapidamente oxidado pela atividade de bactérias do gênero *Nitrobacter* e assim o  $\text{N-NO}_3^-$  é obtido. Porém quando esses eventos são intensificados, estes podem estar sujeitos a perdas, através das transformações que o N pode sofrer no solo, que segundo Fernandes et al. (2011), ocorrem por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$  e emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  pela desnitrificação.

A imobilização de N no solo resulta em menor crescimento das culturas nos períodos iniciais de desenvolvimento. A relação carbono/nitrogênio (C/N) do material a ser decomposto é o principal componente que promove a imobilização, que ocorre devido à utilização do N mineral do solo ( $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$ ) pelos microrganismos como alimento. Rosolem et al. (2012) verificaram menor crescimento e menor acúmulo de matéria seca de plantas de algodão cultivado sobre palha de *U. ruziziensis* devido à imobilização de N, anulando esse efeito quando N foi aplicado.

Por se tratar de um cátion, o  $\text{N-NH}_4^+$  possui capacidade de se adsorver às cargas negativas dos colóides do solo e aumentar a sua permanência no mesmo, quando comparado com o  $\text{N-NO}_3^-$ , que é um ânion livre e está sujeito a perdas por lixiviação (ROSOLEM et al., 2003), quando as condições forem favoráveis. Dynia et al. (2006), trabalhando com N mineral e lodo de esgoto em um Latossolo de textura argilosa, verificaram que grande parte do  $\text{N-NO}_3^-$  presente no solo, após a aplicação dos fertilizantes, foi lixiviada pela ação da água das chuvas, inicialmente a camadas de solo de até 0,6 m de profundidade, fora do alcance da maioria das culturas cultivadas.

A desnitrificação é um processo que ocorre através da queda da oxigenação do solo causada pela sua saturação ou por compactação, onde o  $\text{N-NO}_3^-$  é reduzido a formas voláteis de N, como o óxido nitroso ( $\text{N-N}_2\text{O}$ ) e gás nitrogênio ( $\text{N-N}_2$ ), principalmente, que se perdem para a atmosfera (SUBBARAO et al., 2013). Apesar de possuir alto potencial de causar o efeito estufa, é uma forma de perda de N, mas sem grande magnitude (CASTOLDI, 2014). Carmo et al. (2005) observaram fluxo de emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  entre 0,85 e 2,18  $\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$  em pastagens de *U. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente. As perdas de  $\text{N-N}_2\text{O}$  em áreas com *U. ruziziensis* têm sido menores que 9  $\text{kg ha}^{-1}$  por ano, concentrando-se em momentos em que há mobilização da área, como ocorre na semeadura, sendo muito próximas de zero durante outros períodos (Castoldi, 2014). Castoldi (2014) ainda afirma que as perdas

de N via volatilização de N-NH<sub>3</sub> e emissão de N-N<sub>2</sub>O em cultivos do sorgo granífero e do consórcio *U. ruziziensis* + sorgo granífero, são dependentes do acúmulo de N no tecido vegetal.

Perda de N por volatilização de N-NH<sub>3</sub> do sistema de produção também pode ocorrer, e segundo Tasca et al. (2011) é a principal forma de perda de N do sistema podendo representar mais de 50 % do N aplicado. Sua maior contribuição em volatilização de N-NH<sub>3</sub>, normalmente, está ligada a aplicação de ureia, fertilizante nitrogenado amplamente utilizado, que em condições climáticas desfavoráveis é perdido (DUARTE, 2006). A volatilização de N-NH<sub>3</sub> pode ocorrer também devido a áreas de alcalinidade do solo, o que em sistemas conservacionistas é possível através da aplicação superficial do calcário. A perda ocorre quando íons N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> encontram-se em presença de íons hidroxilas (OH<sup>-</sup>), onde estes reagem e a N-NH<sub>3</sub> é formada. A volatilização ainda pode ocorrer pela emissão de N-NH<sub>3</sub> pelos estômatos das folhas das plantas, dependendo do ponto de compensação nos tecidos subestomáticos (FARQUHAR et al., 1980). Franco et al. (2008) verificaram perdas de N por volatilização de N-NH<sub>3</sub> a partir de plantas de *Urochloa decumbens* em solos com maior umidade, muito provável pelo aumento do fluxo de massa na planta. Se o balanço for negativo nos tecidos subestomáticos, pode haver também a absorção de N-NH<sub>3</sub> pelas plantas, onde a N-NH<sub>3</sub> que estava sendo perdida a partir do solo pode ser reabsorvida pela parte aérea da cultura.

O objetivo do trabalho foi verificar a variabilidade dos teores e na quantidade acumulada de nitrato, amônio (N-mineral) e N-total no solo durante 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* e no milho cultivado em sucessão com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>. Objetivou-se também quantificar as perdas de N do sistema de produção, no período de desenvolvimento das gramíneas forrageiras e do milho, via lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, volatilização de N-NH<sub>3</sub> e emissão de N-N<sub>2</sub>O.

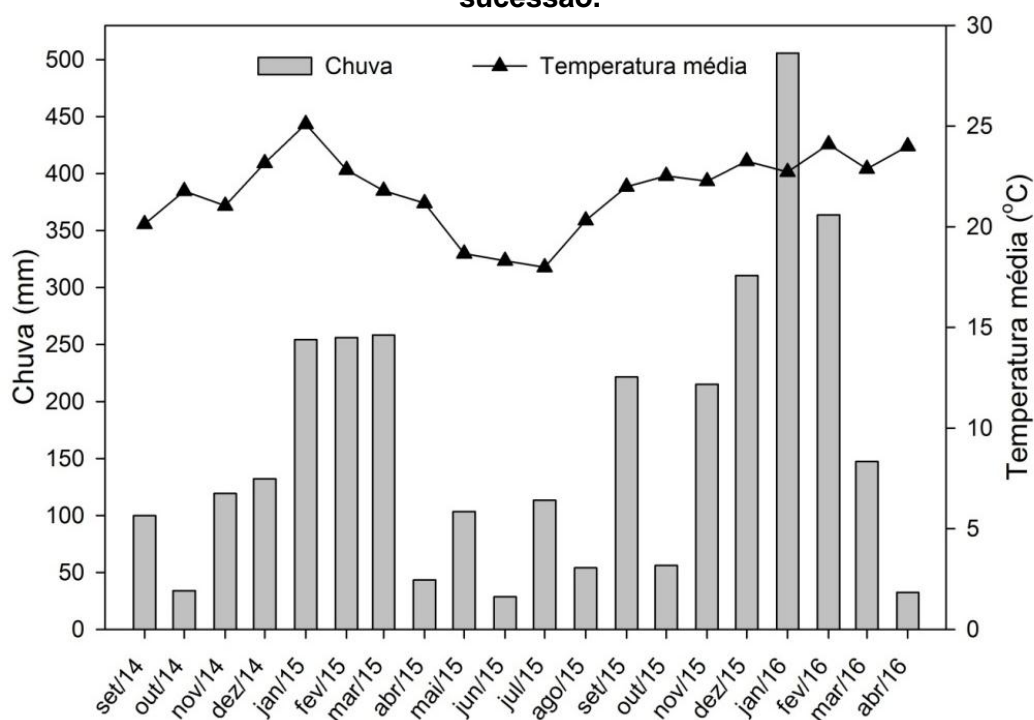
## 1.2 Material e métodos

### 1.2.1 Caracterização da área

Foi conduzido um experimento de campo em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, 22°49' Latitude Sul e 48° 25' Longitude Oeste de Greenwich, com altitude

média de 770 metros e declividade de 3%. O solo da área é classificado como Nitossolo Vermelho distroférico estruturado (EMBRAPA, 1999), ou *Typic Rhodustult* (USDA, 2010), de textura muito argilosa, com 626 g kg<sup>-1</sup> de argila, com menos de 3 % de declividade. A área estava há quatro anos sem cultivo, recoberta por plantas espontâneas, predominando plantas daninhas gramíneas. O clima é Cwa, pela classificação de Köppen, subtropical úmido, com precipitação média anual de 1400 mm, temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C e do mês mais frio entre 3 e 18 °C. Os dados climáticos obtidos durante o experimento foram adquiridos por meio de uma estação meteorológica localizada a cerca de 500 m da área experimental e estão apresentados Figura 1.

**Figura 1 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*) e do milho em sucessão.**



Antes da instalação do experimento foi realizada amostragem de solo na camada de 0,00-0,20 m de profundidade para caracterização química de rotina da área. O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado de acordo com método descrito por Walkley & Black (1934) e o pH em solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (CaCl<sub>2</sub>) foi determinado com auxílio de potenciômetro digital (RAIJ et al., 2001). O teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado por destilação conforme descrito por Keeney & Nelson (1982). A acidez potencial a pH 7,0 (H+Al) foi determinada de acordo com

Raij et al. (2001). O teor de fósforo (P), cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) trocáveis foram extraídas com resina trocadora de íons (Raij et al., 1986). A concentração de P foi determinada em espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão) e os teores de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  foram determinados utilizando espectrômetro de absorção atômica modelo AAS7000 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão). Os resultados estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,00 – 0,20 m de profundidade.**

MO	pH	$\text{N-NH}_4^+$	$\text{N-NO}_3^-$	P (resina)	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{Mg}^{+2}$	H+Al	V
$\text{g dm}^{-3}$	$\text{CaCl}_2$	-----	$\text{mg kg}^{-1}$	-----	-----	$\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$	-----		%
20	5,9	5,4	6,3	15	1,2	34	23	37	60

MO= Matéria orgânica; V = Saturação por Bases.

No início do experimento, também foram tomadas amostras de solo das camadas 0,0-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,4, 0,4-0,6 e 0,6-0,8 m de profundidade para determinação das quantidades acumuladas de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_3^-$ , N-mineral ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$ ) e N-total (Tabela 2). O teor e quantidade de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  foram determinados pelo método de destilação descrito por Keeney & Nelson (1982). A quantidade de N-mineral ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$ ) foi obtida pela soma da quantidade de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$ . A quantidade de N-total no solo foi quantificada por combustão em analisador elementar modelo FP628 marca LECO (SWIFT, 1996).

**Tabela 2 – Quantidade acumulada de  $\text{N-NH}_4^+$ ,  $\text{N-NO}_3^-$ , N-mineral ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$ ) e N-total (N-mineral + N-orgânico) no solo antes da implantação do experimento.**

Profundidade	$\text{N-NH}_4^+$	$\text{N-NO}_3^-$	N-mineral	N-total
m	-----	$\text{kg ha}^{-1}$	-----	$\text{Mg ha}^{-1}$
0,0-0,1	7,7	6,7	14,4	1,3
0,1-0,2	5,8	9,2	15,0	1,2
0,2-0,4	13,7	12,2	25,9	2,2
0,4-0,6	9,5	9,9	19,4	1,6
0,6-0,8	9,8	10,8	20,7	1,5
<b>Total</b>	<b>46,6</b>	<b>49,0</b>	<b>95,6</b>	<b>8,0</b>



### 1.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, em quatro repetições. Foram utilizadas três espécies de gramíneas forrageiras e quatro doses de N aplicadas na cultura em sucessão. As espécies utilizadas foram: braquiária ruziziensis cv. Comum (*Urochloa ruziziensis*), braquiária brizanta cv. Marandú (*Urochloa brizantha*) e capim colômbio cv. Tanzânia (*Panicum maximum*). Após o cultivo das gramíneas forrageiras foi realizado um cultivo de milho. No cultivo de milho foram aplicadas as doses de 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.

### 1.2.3 Instalação e condução do experimento

A área do experimento foi previamente dessecada com pulverização de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato com 720 g kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i. a.). A semeadura das gramíneas forrageiras ocorreu no dia 22 outubro de 2014 com uma semeadora de fluxo contínuo da marca Semeato modelo Personale Drill 21. As gramíneas forrageiras foram semeadas sem adubação em semeadura direta com densidade de 10 kg ha<sup>-1</sup> de sementes viáveis, considerando 500 pontos de valor cultural ha<sup>-1</sup> e valor cultural de 50%. O espaçamento utilizado foi de 0,2 m entre fileiras. As parcelas continham dimensões de 9,0 x 20,0 m totalizado 180 m<sup>2</sup>. As gramíneas forrageiras permaneceram na área por 11 meses e após esse período foram dessecadas para a implantação da cultura do milho. Para dessecação foi utilizado 4,0 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.), no dia 08/10/2015, e após uma semana desta aplicação, realizou-se a aplicação de 3,0 L ha<sup>-1</sup> de paraquat (200 g L<sup>-1</sup> i. a.) + diuron (100 g L<sup>-1</sup> i. a.). Na dessecação foi utilizado também 0,15 L ha<sup>-1</sup> de lambda-cialotrina (50 g L<sup>-1</sup> i. a.) + clorantraniliprole (100 g L<sup>-1</sup> i. a.) com objetivo de baixar população de lagartas.

A semeadura do milho foi realizada em semeadura direta no dia 26/10/2015, utilizando o híbrido simples 2B810 da empresa Dow Agrosience. O espaçamento utilizado foi 0,75 m entre linhas e a população de plantas foi de 65.000 plantas ha<sup>-1</sup>, conforme recomendada pelo obtentor. Foi semeado em parcelas contendo dimensões de 4,5 x 10 m totalizado 45 m<sup>2</sup>. A adubação utilizada foi de 120 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> e 120 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> utilizando as fontes cloreto de potássio e superfosfato triplo, respectivamente, aplicados no sulco de semeadura. A produtividade esperada foi de

13.000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, de acordo com a recomendação do estado de São Paulo (RAIJ et al., 1996). As doses de N de 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> foram aplicadas de forma que 30 kg N ha<sup>-1</sup> foi aplicado superficialmente, concentrado sobre a linha de semeadura, imediatamente após a semeadura. O N restante foi aplicado em uma única vez no estágio de V4-V5 (RITCHIE & HANWAY, 1986) a lanço, no dia 20/11/2015 aos 25 dias após a semeadura do milho, concentrado sobre o solo, 0,02 m ao lado da linha de semeadura. A fonte nitrogenada utilizada foi o sulfato de amônio.

Os tratos culturais referentes ao controle de plantas daninhas, pragas e doenças foram realizados mediante monitoramento. Aos 10 e 16 dias após a semeadura (DAS) foi aplicado 0,3 L ha<sup>-1</sup> de tiametoxam (141 g L<sup>-1</sup> i. a.) + lambda-cialotrina (106 g L<sup>-1</sup> i. a.) para o controle de percevejos, sendo que na segunda aplicação 2,0 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.) foi aplicado para controle de plantas daninhas. Aos 35 DAS foram aplicados 1,2 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.), 0,3 L ha<sup>-1</sup> de tiametoxam (141 g L<sup>-1</sup> i. a.) + lambda-cialotrina (106 g L<sup>-1</sup> i. a.), 0,3 L ha<sup>-1</sup> de azoxistrobina (200 g L<sup>-1</sup> i. a.) + ciproconazol (80 g L<sup>-1</sup> i. a.) e 0,4 L ha<sup>-1</sup> de lufenuron (50 g L<sup>-1</sup> i. a.), visando o controle de plantas daninhas, percevejos, doenças e lagarta, respectivamente. Todas as aplicações ocorreram juntamente com 0,6 L ha<sup>-1</sup> do produto assist que é adjuvante para melhor distribuição dos produtos. O volume de calda aplicada em todas as pulverizações foi de 200 L ha<sup>-1</sup> aplicado com auxílio de trator e pulverizador montado.

O pleno florescimento do milho, estágio VT (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 08/01/2016, 74 dias após a semeadura. A maturação fisiologia, estágio R6 (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 25/02/2016 e a colheita no dia 07/03/2016, 122 e 133 dias após a semeadura, respectivamente.

#### **1.2.4 Nitrato e amônio no perfil do solo**

Foi amostrado solo nas camadas 0,00-0,10, 0,10-0,20, 0,20-0,40, 0,40-0,60 0,60-0,80 m de profundidade em três momentos durante o experimento. Amostrou-se solo antes da instalação do experimento para a caracterização da área, no momento da semeadura e colheita do milho, nos dias 14 de outubro de 2014, 25 de outubro de 2015 e 10 de março de 2016, respectivamente. Amostragens nas camadas de 0,00-0,10, 0,10-0,20 e 0,20-0,40 m de profundidade ocorreram aos 06, 08 e 11 meses

após a semeadura (MAS) das gramíneas forrageiras, nos dias 20 de abril de 2015, 17 de junho de 2015 e 07 de outubro de 2015, respectivamente. As amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo e posteriormente congelada a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise, a fim de manter inalterados os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  (MATTOS JR. et al., 1995) e reduzir a atividade microbiana (WARDLE, 1992). As amostras foram analisadas através de extração com solução de KCl 1,0 M, destilação e titulação através de metodologia proposta por Keeney & Nelson et al. (1982). No momento da análise uma medida de cada amostra foi tomada para secagem em estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  até obter massa constante para correção da umidade das amostras, uma vez que serão realizadas com umidade natural.

### **1.2.5 Nitrogênio total e pH**

O teor de nitrogênio total (N-total) foi determinado através de um analisador elementar automático modelo FP628 marca LECO (SWIFT, 1996) e o pH em  $\text{CaCl}_2$  através da metodologia proposta por Raij et al. (2001). As amostras foram coletadas nas camadas de 0,00-0,10, 0,10-0,20, 0,20-0,40, 0,40-0,60 0,60-0,80 m de profundidade, sendo uma amostragem realizada para caracterização da área antes da implantação do experimento, 14 de outubro de 2014, e outra após a colheita do milho, em 10 de março de 2016.

As amostras coletadas foram secas ao ar, moídas e peneiradas para obter diâmetro  $\leq 2\text{ mm}$  para determinação de pH. Para determinação de N-total as amostras foram moídas em moinho de bola e peneiradas até obter diâmetro  $\leq 0,15\text{ mm}$ .

### **1.2.6 Lixiviação de nitrato**

A umidade do perfil do solo foi monitorada utilizando sondas de capacitância, modelo Diviner 2000® da empresa Sentek (ANEXO A). Foram instalados, em cada parcela, tubos de acesso até 1,0 m de profundidade e a umidade foi avaliada em intervalos de 0,1 m. Foram realizadas leituras semanais da umidade no perfil do solo, tanto nas gramíneas forrageiras como na cultura do milho. Com as leituras de umidade foi possível estimar a drenagem de água abaixo de 0,8 m de profundidade, pressupondo que esta água está fora do alcance das culturas. Foi considerada água

drenada a que excedeu o ponto de saturação do solo. As estimativas de drenagem de água foram realizadas com o auxílio do software IrriMax® (Sentek). Com a quantidade de água drenada em cada amostragem foi possível calcular a área abaixo da curva e assim estimar o montante de água drenada (JAGGER & RICHARDS, 2008).

Foram instalados, além dos tubos de acesso de monitoramento de umidade do solo, tubos de PVC com 0,5 polegada de diâmetro e 0,8 m de comprimento em cada parcela. Na extremidade do tubo foi acoplada uma cápsula porosa onde por aplicação de vácuo a solução do solo entra e é armazenada, similar à metodologia descrita por Reichardt et al. (1977). Imediatamente após eventos de chuva, vácuo foi aplicado às capsulas e as amostras da solução do solo foram coletadas 2 a 3 dias após a ocorrência de chuva (ANEXO A). As amostras foram congeladas a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. Foi determinado o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  na solução por espectrofotometria de absorção ultravioleta (EATON et al., 1993), em um equipamento UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão). A estimativa de perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$  foi realizada através da concentração de  $\text{NO}_3^-$  da amostra multiplicado pelo volume de água drenado.

### **1.2.7 Emissão de óxido nitroso**

A emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  foi quantificada utilizando câmaras conforme metodologia descrita por Bowden et al. (1990). As medidas de emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  foram realizadas nas parcelas contendo as três espécies de gramíneas forrageiras e nas doses de 0 e  $140\text{ kg ha}^{-1}$  de N no milho. Foram instaladas bases metálicas nas parcelas com bordas enterradas a 0.07 m de profundidade, para a acoplagem das câmaras. As câmaras foram utilizadas somente no momento das amostragens (ANEXO A). Os gases no interior das câmaras foram coletados a 0, 5, 10 e 20 minutos após a montagem das câmaras sobre as bases metálicas, com seringas de nylon de 20 mL (BOWDEN et al., 1990). A concentração de  $\text{N-N}_2\text{O}$  foi determinada por cromatografia gasosa. No momento das amostragens, medidas de temperatura e umidade do solo foram realizadas. O esquema de amostragem levou em consideração os trabalhos de La Scala Junior et al. (2009), Teixeira et al. (2010) e Castoldi (2014), tendo como data referência a semeadura das culturas. Assim, as

coletas de gás foram realizadas a 1, 3, 5, 8, 15, 30 e 60 dias após a semeadura e dessecação das gramíneas e após a semeadura do milho, sempre entre as 08 e 10 horas da manhã. Nos outros períodos do ano, foi realizada uma amostragem mensal.

### **1.2.8 Volatilização de amônia**

As perdas de N do sistema por volatilização de  $N-NH_3$  foram quantificadas pelo método de coletores abertos com absorvedores de espuma (OLIVEIRA et al., 2008) (ANEXO A). Cada absorvedor foi composto por uma espuma e uma placa de acrílico. As espumas utilizadas possuíam dimensão de 8 x 8 cm e densidade de  $20 \text{ kg m}^{-3}$  e foram embebidas com 11 mL de solução de ácido fosfórico 0,5 N + 4% glicerina (v/v). Embebidas, as espumas foram colocadas sobre placas de acrílico de 10,0 x 10,0 x 0,2 cm e envolvidas por uma camada de fita de politetrafluoroetileno (fita veda-rosca), que é permeável à  $N-NH_3$  e impermeável à água. Até a sua alocação no campo, os absorvedores ficaram armazenados em sacos plásticos e refrigerados, para evitar contaminação com  $N-NH_3$  presente no ambiente. Nas gramíneas forrageiras e no milho, os absorvedores foram instalados sobre o dossel das plantas ajustando-as quando necessário. As coletas foram realizadas a cada duas semanas no primeiro mês e mensalmente até a dessecação. Logo após a dessecação foi realizado um ciclo de coletas por 20 dias, espaçadas de quatro em quatro dias. Na cultura do milho foram realizados dois ciclos de coletas de 15 dias espaçados em cinco dias após a semeadura e a aplicação da adubação nitrogenada de cobertura. Nos demais períodos do ciclo do milho realizou-se uma amostragem mensal.

Recolhidos os absorvedores, as espumas foram embaladas individualmente e acondicionadas em geladeira a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ou analisadas. Para a determinação as espumas foram lavadas com volume de 100 mL de solução 0,0005 N de ácido sulfúrico por imersão e extração manual do conteúdo da espuma. As alíquotas extraídas foram analisadas em duplicata por colorimetria pelo método azul de salicílico descrito por Qiu et al. (1987), em um equipamento UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão).

### 1.2.9 Análise estatística

Os dados dos caracteres avaliados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância (teste de Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilk). Atendidos estes pressupostos, os dados seguiram para análise de variância pelo teste F 5% ( $p < 0,05$ ). Ocorrendo significância, as médias do fator espécie, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os tratamentos com doses de N foram submetidos à análise de regressão, e, em caso de interação, regressão das doses de N para cada espécie testada. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS 9.2.

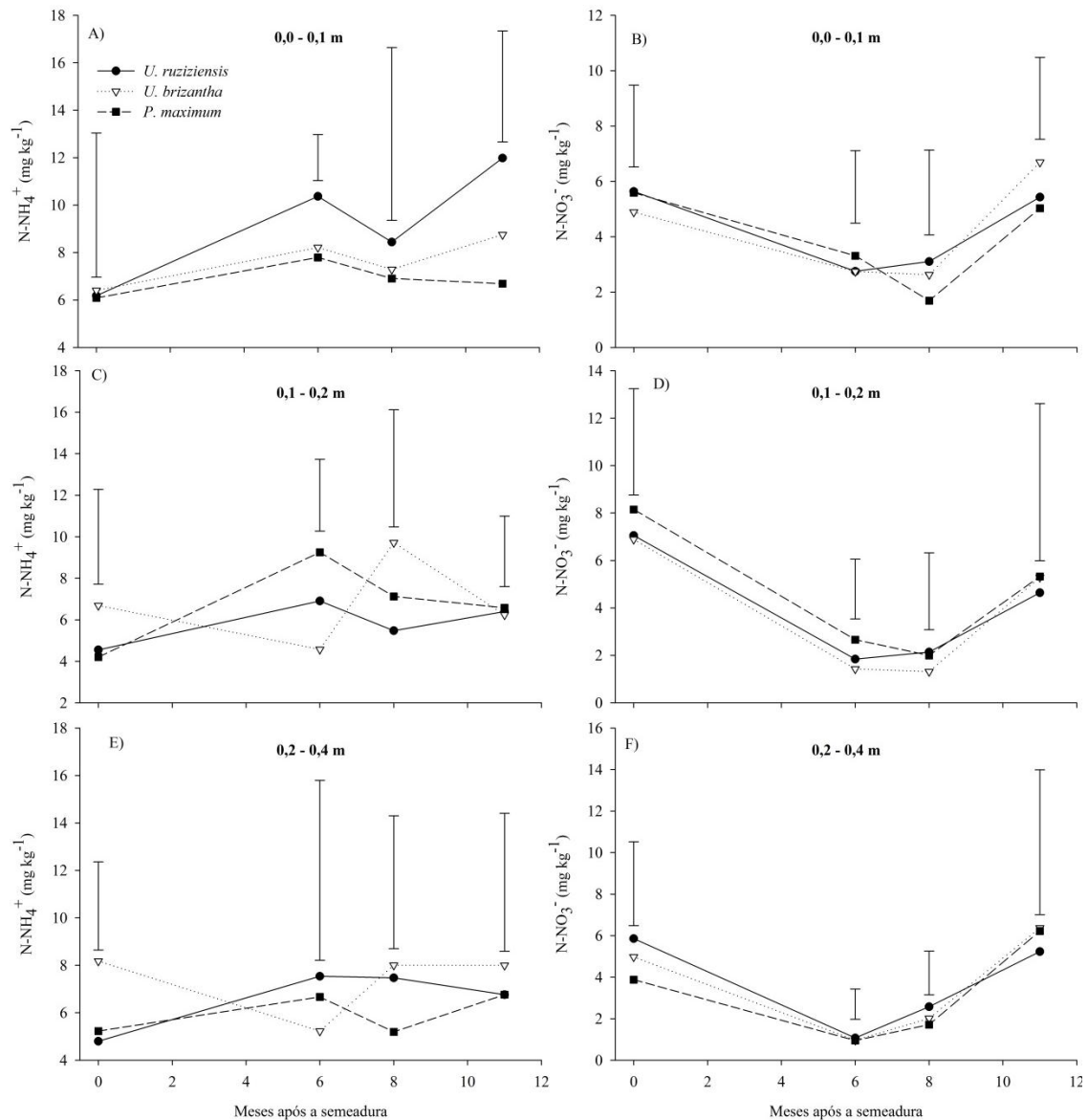
## 1.3 Resultados

### 1.3.1 Dinâmica do amônio e nitrato no solo

A dinâmica do teor de N-mineral no solo ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$ ) até 0,4 m de profundidade apresentou bastante oscilação no decorrer dos 11 meses de permanência das gramíneas forrageiras no campo (Figura 2). Entretanto, os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  foram baixos, abaixo de 12 e 6  $\text{mg kg}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$ , respectivamente, independente da camada amostrada. O teor de  $\text{N-NH}_4^+$ , apesar de baixo, teve oscilações que não permitiram a definição de um comportamento padrão para qualquer das espécies forrageiras testadas.

O teor de  $\text{N-NO}_3^-$  tendeu a diminuir aos 6 e 8 MAS das gramíneas forrageiras, independente da espécie. Aos 11 MAS o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  se elevou novamente, mas sem diferenciar espécies de gramínea forrageira e tendo mesmo comportamento em todas as profundidades de solo amostradas.

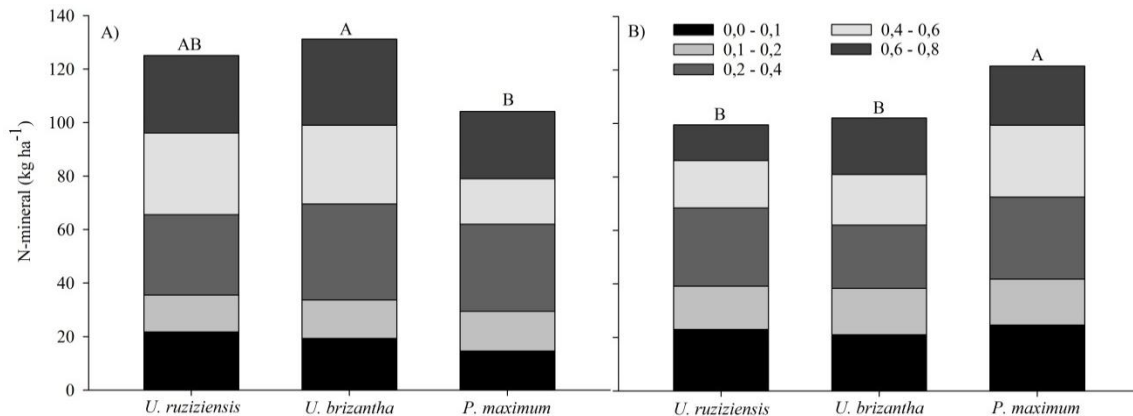
Figura 2 – Teor de  $\text{N-NH}_4^+$  (A, C e E) e  $\text{N-NO}_3^-$  (B, D e F) no solo nas camdas de 0,0-0,1, 0,1-0,2 e 0,2-0,4 m de profundidade, respectivamente, aos 0, 6, 8 e 11 meses após a semeadura de *U. ruziziensis*, *U. Brizantha* e *P. maximum*. Barras verticais indicam diferença mínima significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



### 1.3.2 Nitrogênio mineral acumulado

A quantidade de N-mineral,  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  no solo, no momento da semeadura das gramíneas forrageiras, foi abaixo de  $130 \text{ kg ha}^{-1}$  até 0,8 m de profundidade (Figura 3A). Nas parcelas que receberiam o cultivo de *U. brizantha* pôde-se observar maior acúmulo de N-mineral em relação as parcelas que receberiam o *P. maximum*. As parcelas a serem cultivadas com *U. ruziziensis* tinham acumulado N-mineral intermediário às demais parcelas.

**Figura 3 – Quantidade acumulada de N-mineral ( $\text{N-NH}_4^+ + \text{N-NO}_3^-$ ) no solo nas camadas de 0,0-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,4, 0,4-0,6 e 0,6-0,8 m de profundidade 11 meses após a semeadura de *U. ruziziensis*, *U. Brizantha* e *P. maximum* por ocasião da dessecação das gramíneas (A) e após o cultivo de milho (B). Média de quatro doses de N (0, 70, 140 e 210  $\text{kg N ha}^{-1}$ ) para a quantidade acumulada de N-mineral após o milho. Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).**



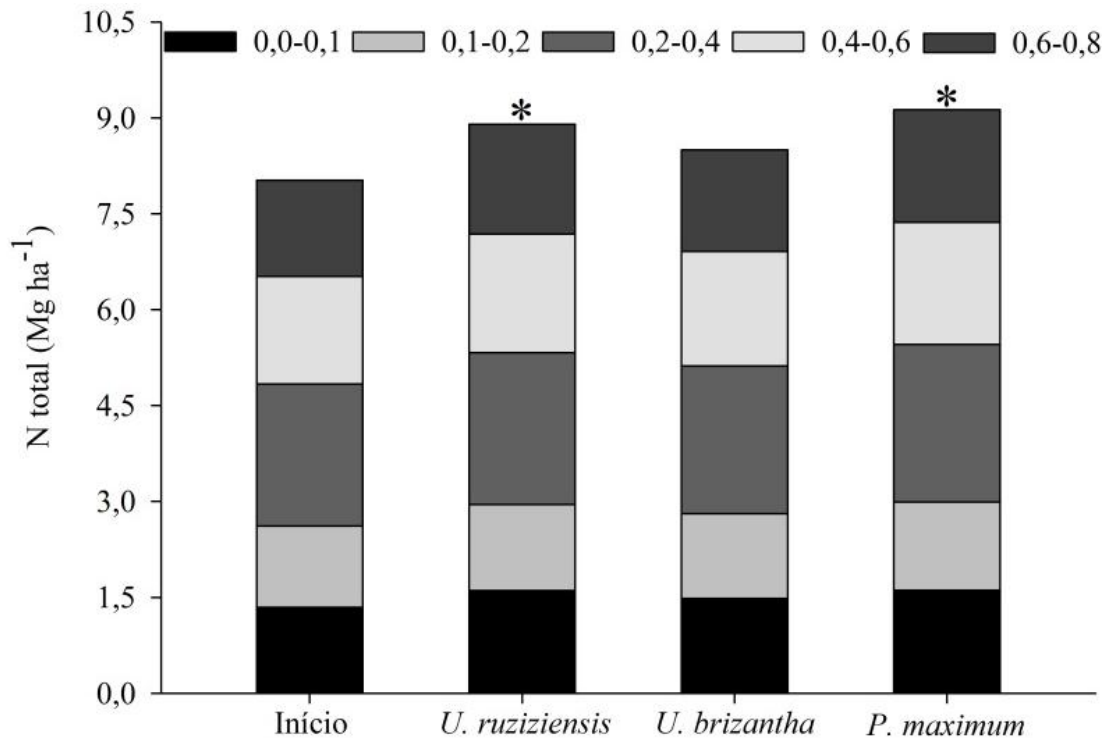
Após 11 MAS a quantidade acumulada de N-mineral no solo, cultivado com *P. maximum*, até 0,8 m de profundidade foi superior às demais espécies cultivadas (Figura 3B). O solo cultivado com *P. maximum* acumulou em torno de 20  $\text{kg ha}^{-1}$  de N-mineral a mais em relação à *U. brizantha* e *U. ruziziensis*. A quantidade de N-mineral acumulada no solo cultivado com *U. brizantha* e *U. ruziziensis* foi em torno de 100  $\text{kg ha}^{-1}$  até 0,8 m de profundidade.

### 1.3.3 Nitrogênio total no solo

Não foi significativa a diferença das doses de N aplicadas no milho na quantidade de N-total no solo ao final do ciclo do milho. A quantidade de N-total no solo aumentou quando *U. ruziziensis* e *P. maximum* estavam no sistema de rotações com milho em relação a quantidade de N-total no solo no início do experimento (Figura 4). A *U. ruziziensis* e o *P. maximum* acumularam, até 0,80 m de profundidade, 1,1 e 0,87  $\text{Mg ha}^{-1}$  de N-total, respectivamente, desde o início do experimento. O sistema de rotação de *U. brizantha* com milho não aumentou a quantidade de N-total no solo após 11 meses de cultivo das gramíneas forrageiras e um ciclo de milho em relação a quantidade inicial de N-total no solo.



**Figura 4 – Nitrogênio total nas camadas de 0,0-0,1, 0,1-0,2, 0,2-0,4, 0,4-0,6 e 0,6-0,8 m de profundidade no início do experimento e após os cultivos de *U. ruziziensis*, *U. Brizantha* e *P. maximum* por 11 meses e um cultivo de milho em sucessão. Médias de quatro doses de N (0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>). \*Diferença significativa pelo teste de Dunnett ( $p>0,05$ ) em relação à quantidade de N-total no início do experimento.**



#### 1.3.4 Lixiviação de nitrato

A lixiviação de nitrato abaixo de 0,80 m não apresentou diferença para as espécies durante os 11 meses que permaneceram no campo, tendo média geral de 0,30 kg ha<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Tabela 3). Durante o ciclo do milho foi perdido em média 0,17 kg ha<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, não havendo diferença para as espécies de gramíneas forrageiras testadas, doses de N e a interação dos fatores. O total de N perdido durante os 11 meses de permanência das gramíneas forrageiras e do ciclo de milho foi de apenas 0,47 kg ha<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**Tabela 3 – Lixiviação de nitrato acumulado abaixo de 0,80 m de profundidade em sistema de rotações com 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* e uma safra de milho com 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.**

Dose de N (kg ha <sup>-1</sup> )	Espécie			Média
	<i>U. ruziziensis</i>	<i>U. brizantha</i>	<i>P. maximum</i>	
	----- N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (kg ha <sup>-1</sup> ) -----			
0	0,41 <sup>ns</sup>	0,48	0,41	0,43
70	0,56	0,35	0,47	0,46
140	0,34	0,46	0,56	0,45
210	0,46	0,51	0,66	0,54
Média	0,44	0,45	0,53	0,47

<sup>ns</sup>Não significativo.

### 1.3.5 Emissão de óxido nitroso

As perdas de N por emissão N-N<sub>2</sub>O não apresentaram diferença significativa para o período de desenvolvimento das gramíneas forrageiras (Tabela 4). A emissão de óxido nitroso no período de desenvolvimento das gramíneas forrageiras, 11 meses, foi de 0,29, 0,32 e 0,32 kg ha<sup>-1</sup> de N-N<sub>2</sub>O para *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente. No ciclo de milho, de cinco meses, perda de N por emissão de óxido nitroso não foi diferente para as gramíneas forrageiras, milho e interação dos fatores.

O uso de N não afetou a emissão de óxido nitroso. O total de emissão de N-N<sub>2</sub>O foi superior onde o *P. maximum* foi cultivado, em relação às demais espécies de gramíneas forrageiras (Tabela 4). A *U. ruziziensis* e a *U. brizantha* não diferenciaram o montante de N-N<sub>2</sub>O emitido em 16 meses, compreendendo 11 meses de cultivo das gramíneas forrageiras e um ciclo de milho.

**Tabela 4 – Emissão de N-N<sub>2</sub>O acumulado durante 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, um cultivo de milho e total no sistema de rotação de forrageiras com milho (16 meses).**

Espécie	Gramíneas forrageiras	Milho	Total
	----- kg ha <sup>-1</sup> N-N <sub>2</sub> O -----		
<i>U. ruziziensis</i>	0,29	0,20	0,49 b
<i>U. brizantha</i>	0,32	0,19	0,51 b
<i>P. maximum</i>	0,32	0,35	0,68 a

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre pelo teste de Tukey (p<0,05).

### 1.3.6 Volatilização de amônia

No período de permanência das forrageiras no campo não foi observada diferença na volatilização de amônia entre as espécies de gramíneas forrageiras cultivadas. Nos 11 meses de permanência das gramíneas forrageiras no campo a perda média de N por volatilização de amônia foi de 8,85 kg N-NH<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup>. O ciclo de milho teve perdas médias de 3,3 kg N-NH<sub>3</sub> ha<sup>-1</sup> ao longo do ciclo, não diferindo as quantidades perdidas entre as espécies de forrageiras nem pela dose de N aplicada. No ciclo inteiro de cultivo, envolvendo o período em que as forrageiras e o milho ficaram no campo, foi observada diferença significativa para as gramíneas utilizadas (Tabela 5). O *P. maximum* foi a espécie que emitiu menor quantidade de N-NH<sub>3</sub>, diferindo da *U. brizantha* que teve maior média de emissão. A *U. ruziziensis* perdeu N-NH<sub>3</sub> de forma intermediária em relação as outras espécies.

**Tabela 5 – Quantidade acumulada de N-NH<sub>3</sub> em sistema de produção após 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* e um cultivo de milho com aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.**

Espécie	kg N-NH <sub>3</sub> ha <sup>-1</sup>
<i>U. ruziziensis</i>	12,1 ab
<i>U. brizantha</i>	12,6 a
<i>P. maximum</i>	12,0 b

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna, não diferem entre pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 1.4 Discussão

### 1.4.1 Dinâmica do amônio e nitrato no solo

A disponibilidade de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no solo sem a adição de fertilizante é regida pela amonificação do N contido na matéria orgânica do solo. Assim, grande variação no teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é esperada, uma vez que um grande grupo de microrganismos é responsável por esse processo. Fungos, bactérias e actinomicetos de vários gêneros e espécies são responsáveis pela amonificação (ÚLEHLOVÁ et al., 1988). Assim, muitos fatores ligados à atividade de cada grupo de microrganismos, como temperatura, umidade, pH e qualidade do material vegetal a ser amonificado, afeta a produção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no solo. Outro fator que pode estar relacionado à variação no

teor de  $\text{N-NH}_4^+$  no solo foi a baixa concentração do íon, difícil de quantificar com precisão em função das variações no solo. O baixo teor de  $\text{N-NH}_4^+$  pode ser agravado com a variação de sua distribuição e amostragem de solo. Em sistemas de alta oferta de N com cultivos de *U. ruziziensis*, *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola*, milheto e crotalária, Moro et al. (2013) observaram teor de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  variando, em média, de 15 a 25  $\text{mg kg}^{-1}$ . Isso indica que em solos mais ricos em N variações de 1,5  $\text{mg kg}^{-1}$  nas amostras, por exemplo, representam somente 5% de variação no teor de N-mineral, mas em um sistema de alta resposta essa diferença tem um percentual muito maior. Assim, é difícil afirmar com precisão o efeito das gramíneas forrageiras sobre os processos que envolvem a dinâmica do  $\text{N-NH}_4^+$  no solo, dado o método de análise utilizado.

O teor de  $\text{N-NO}_3^-$  diminuiu aos 6 e 8 MAS das gramíneas forrageiras devido a absorção do  $\text{N-NO}_3^-$  pelas plantas. Poderia se suspeitar que o  $\text{N-NO}_3^-$  estaria sendo lixiviado, uma vez que a precipitação pluviométrica durante o desenvolvimento das gramíneas forrageiras foi elevada (Figura 1). Mas esta perda não ocorreu, dado que no presente experimento as perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$  não ultrapassou 1,0 kg durante todo período de cultivo das gramíneas forrageiras e milho (Tabela 3). Aos 11 MAS das gramíneas forrageiras o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  se elevou novamente, muito provavelmente pela menor exploração do solo pelas raízes. Mas, mesmo assim, o teor não ultrapassou 6  $\text{mg kg}^{-1}$ , que totalizado até 0,4 m de profundidade, chegou apenas 25  $\text{kg ha}^{-1}$  de N, bem abaixo do que necessitaria a cultura do milho no período inicial de desenvolvimento (RAIJ et al., 1996).

#### 1.4.2 Nitrogênio mineral acumulado

A dinâmica do N no solo é muito complexa, uma vez que se tem várias formas em que o N pode estar, e nem sempre é a forma mineral. Assim, quantificá-lo com precisão é muito difícil, pois dadas as condições de ambiente, tipo de solo, aporte de N e qualidade de materiais a serem decompostos no sistema de produção a quantidade e disponibilidade de N no solo podem variar dentro de um espaço curto de tempo. Dessa forma, Espindula et al. (2010) apontam que as modificações na disponibilidade de N para as plantas dependem da variabilidade das condições edafoclimáticas associadas a processos que interferem na dinâmica do N no solo e nas suas relações com a planta.

O solo cultivado com o *P. maximum*, provavelmente, deixou mais N-mineral disponível para o milho cultivado após as gramíneas. Entretanto, o *P. maximum* é mais exigente em fertilidade do solo, e por esse motivo pode ter menor capacidade de afetar o N em relação a *U. brizantha* e *U. ruziziensis* (BORGHI & CRUSCIOL, 2007). Isso indica que as *Urochloas* têm maior potencial de esgotar N no solo em relação ao *Panicum*. A diferença na quantidade acumulada de N-mineral no solo até 0,8 m de profundidade entre o *P. maximum* e as *Urochloas* foi de apenas 20 kg ha<sup>-1</sup>, que, embora, baixa para um sistema de produção com milho de alta produtividade, foi suficiente para se produzir mais milho sobre a palha de *P. maximum* em relação às demais espécies (Capítulo 4).

O método utilizado, de destilação e titulação ácida, proposto por Keeney & Nelson (1982) pode afetar a acurácia das avaliações dos teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, uma vez que em sistemas de alta resposta a N a sensibilidade do método pode não quantificar com precisão pequenas diferenças. Assim propõe-se em caso de sistemas de produção de com teor de N abaixo de 10 mg kg<sup>-1</sup> a utilização de métodos mais sensíveis de detecção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como métodos espectrofotométricos com Analisador por fluxo de injeção (*Flow Injection Analyzer-FIA*) (LÓPEZ PASQUALI et al., 2007).

#### 1.4.3 Nitrogênio total no solo

O acréscimo de N-total no solo cultivado com *U. ruziziensis* e *P. maximum* evidencia que o sistema de produção empregado é efetivo para adicionar N no solo. Veras et al. (2016) também observaram incremento de N-total no solo em sistemas de produção com *U. ruziziensis* em relação a sistemas com *Cajanus cajan* (feijão guandu), *Canavalia brasiliensis* e *Sorghum bicolor* (Sorgo Forrageiro), porém, em sistema de baixa resposta a N. No presente trabalho o aumento do estoque de N-total poderia estar ligado à adição de N via fertilizante, entretanto, o montante de N-total adicional ultrapassa as doses de N aplicadas no milho. Assim, pode-se inferir que a FBN das gramíneas forrageiras pode ter contribuído para o aumento do estoque de N-total no solo. Evidências de FBN realizada pelas gramíneas forrageiras do presente trabalho estão apresentadas no Capítulo 2. No caso do *P. maximum*, evidências de FBN foram reportadas por Miranda et al. (1990) que ao testar 25 genótipos de *P. maximum*, demonstraram que estes possuem capacidade

de utilizar 16 a 49% do N via FBN. Já para o gênero *Urochloa*, Boddey & Victoria (1986) constataram que cerca de 30 a 40% do N em plantas de *U. humidicola* e *U. decumbens* é proveniente da FBN, ou seja, nas condições do estudo isso representa 30 a 45 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Entretanto, pouco tem sido reportado sobre esse efeito em solo cultivado com *U. brizantha* e *U. ruziziensis*.

#### 1.4.4 Perdas de nitrogênio

Apesar do grande volume de chuva acumulado durante o cultivo das gramíneas forrageiras e do milho (Figura 1), a perda de N por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi pequena, abaixo de 1,0 kg ha<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, durante 16 meses de experimento. O presente trabalho foi conduzido em um sistema de alta resposta a N, o que justifica o pequeno montante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> lixiviado. Castoldi (2014) observou perdas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> acima de 17 kg ha<sup>-1</sup> em sistema de produção envolvendo cultivos de soja, crotalária, milho e sorgo, mesmo sem adição de fertilizante nitrogenado. Esse autor ainda evidenciou acúmulo de N-total no solo acima de 8,0 Mg ha<sup>-1</sup>, comprovando ser um sistema de alta oferta de N, o que favorece a lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Perdas por emissão de N-N<sub>2</sub>O possuem maior importância do ponto de vista de potencial de aquecimento global em relação ao potencial de causar diminuição da oferta de N nos sistemas de produção. Perdas de 1,0 até 9,0 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> são reportadas por Carmo et al. (2005) e Castoldi (2014). Entretanto, o presente trabalho foi conduzido em um sistema de alta resposta a N, sendo que a baixa quantidade de N perdida por emissão de N-N<sub>2</sub>O era esperada. Apesar do solo cultivado com *P. maximum* apresentar maior perda por emissão de N-N<sub>2</sub>O, ela foi muito baixa. Em 16 meses de avaliação, sendo 11 com as gramíneas forrageiras e cinco com o milho, o sistema de produção com *P. maximum* perdeu somente 0,68 kg ha<sup>-1</sup> de N-N<sub>2</sub>O. Os sistemas de produção com *U. ruziziensis* e a *U. brizantha* perderam 0,49 e 0,51 kg ha<sup>-1</sup> de N-N<sub>2</sub>O, respectivamente. A necessidade de N pela cultura do milho, para produtividade de 13.000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, nas condições desse trabalho, é de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N (RAIJ et al. 1996). Assim, perdas inferiores a 0,50 kg ha<sup>-1</sup> por emissão de N-N<sub>2</sub>O não causariam deficiência de N e redução de produtividade, como reportado por Marques et al. (2015). As perdas de N-N<sub>2</sub>O no tratamento com *P. maximum* foram intensificadas após a dessecação. O *P. maximum* acumula mais N em seu tecido em relação às demais espécies, assim pode ter perdido mais N após a

dessecação. Castoldi (2014) e Pivetta (2015) observaram que o período entre a dessecação das culturas de entressafra, sorgo granífero, crotalária, *U. ruziziensis* e milho, e a semeadura das culturas de verão, no caso a soja, as perdas por emissão de N-N<sub>2</sub>O são intensificadas.

Embora as espécies forrageiras tenham apresentado taxa de volatilização de N-NH<sub>3</sub> diferentes entre si, essa perda de N não afetou a produtividade dos grãos de milho. Castoldi (2014) também constatou perda de N-NH<sub>3</sub> de 11 a 17 kg ha<sup>-1</sup> emitido em sistema com *U. ruziziensis*, sorgo granífero e o consorcio entre as duas espécies. Isso indica que essa forma de perda de N não seria o fator que está diminuindo a oferta de N para o milho em sucessão. Sendo assim, a perda de produtividade de milho em sucessão a gramíneas forrageiras provavelmente seria proveniente de outra via na dinâmica do N em sistemas de produção. As perdas por volatilização de N-NH<sub>3</sub> foram relativamente baixas, tanto no ciclo das gramíneas como no ciclo de milho. Isso se deve provavelmente à baixa oferta de N para as gramíneas, mas também pelo fato de que foram cultivadas por 11 meses sem a adição de fertilizante nitrogenado. Já, na cultura de milho, houve adição de N, porém de forma amoniacal, pouco sujeita a perdas por volatilização em solo sem zonas de alcalinidade. Segundo Volk (1959) o sulfato de amônio, não sofre volatilização de nitrogênio amoniacal quando o pH é inferior a 7,0, mesmo sendo aplicado sobre restos de cultura.

Ao observar as perdas por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, emissão de N-N<sub>2</sub>O e volatilização de N-NH<sub>3</sub> somadas em todo período de desenvolvimento das gramíneas e do milho, menos de 14 kg ha<sup>-1</sup> de N foi perdido (Capítulo 5). Pode-se observar também que a perda por volatilização de N-NH<sub>3</sub> representou quase que a totalidade das perdas de N nos sistemas de rotações de forrageiras com milho, com quase 13 kg ha<sup>-1</sup> de N perdido. Assim, conclui-se que a volatilização de N-NH<sub>3</sub> é a forma de perda de N mais importante a ser mitigada.

Considerando que para o milho produzir de 10.000 a 12.000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, nas condições do presente trabalho, de acordo com Raij et al. (1996) é necessário adicionar à cultura 170 kg ha<sup>-1</sup>. Dessa forma, as perdas por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e emissão de N-N<sub>2</sub>O, que somaram em torno de 1 kg ha<sup>-1</sup>, não foram significantes ao ponto de afetar a produtividade de milho. Já, perdas por volatilização de N-NH<sub>3</sub> representam em torno de 10% do N aplicado, que, no entanto, foi muito semelhante para as espécies forrageiras, permitindo inferir-se que esta não é a forma de

diminuição da oferta de N que causaria queda na produtividade de milho mais acentuada em sistema de rotação com *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha* e *P. maximum* (Capítulo 4).

## 1.5 Conclusão

Em sistemas de alta resposta a N, o teor de N-mineral do solo, independentemente de suas variações, não supre as necessidades da cultura do milho.

O *P. maximum* e *U. ruziziensis* aumentam o estoque de N-total no solo em relação a *U. brizantha*.

O cultivo de gramíneas forrageiras, assim como a adubação do milho com sulfato de amônio, não afetam perdas de N por lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de óxido nitroso.

As perdas de N por lixiviação  $N-NO_3^-$ , emissão de  $N-N_2O$  e volatilização de  $N-NH_3$  não são suficientes para reduzir a disponibilidade de N para o milho cultivado em sucessão a gramíneas forrageiras.

## 1.6 Referências

BODDEY, R. M. & VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using  $^{15}N$  labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v.90, n.1–3, p.265–292, 1986.

BORGHI, E. & CRUSCIOL, C. A. C. Produtividade de milho, espaçamento e modalidade de consorciação com *Brachiaria brizantha* em sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 163–171, 2007.

BOWDEN, R. D.; STEUDLER, P. A.; MELILLO, J. M. Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soil in the northeastern United State. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v.95, p.13997-14005, 1990.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.7, p.375-470.

CARMO, J. B. do, ANDRADE, C. A. de, CERRI, C. C., PICCOLO, M de C. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de  $N_2O$  a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.735-746, 2005.



CASTOLDI, G. **Dinâmica do nitrogênio em sistemas de produção sob semeadura direta**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, 2014, 134p.

DUARTE, F. M. **Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia e eficiência da adubação nitrogenada na cultura do arroz irrigado**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006, 85p.

DYNIA, J. F.; SOUZA, M. D. de; BOEIRA R. C. Lixiviação de nitrato em Latossolo cultivado com milho após aplicações sucessivas de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.855-862, 2006.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. (Eds.) **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18. ed. Washington, DC: APHA, AWWA, WEF. 1993. 4500. 4-75/4-96.

ECHER, F. R.; CASTRO, G. S. A.; BOGIANI, J. C.; ROSOLEM, C. A. Crescimento inicial e absorção de nutrientes pelo algodoeiro cultivado sobre a palhada de *Brachiaria ruziziensis*. **Planta Daninha**, v.30, n.4, p.783–790, 2012.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1999. 412p.

ESPINDULA, M. C.; ROCHA, V. S.; SOUZA, M. A. de; GROSSI, J. A. S.; SOUZA, L. T. de. Doses e formas de aplicação de nitrogênio no desenvolvimento e produção da cultura do trigo. **Ciência e Agrotecnologia**, v.34, n.6, p.1404-1411, 2010.

FARQUHAR, G. D.; FIRTH, P. M.; WETSELAAR, R.; WEIR, B. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: Determination of the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, v.66, p.710-714, 1980.

FERNANDES, A. M.; ANDRADE, G. J. M. de; SOUZA, E. de F. C. de; ROSOLEM, A. *Brachiaria* species affecting soil nitrification. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.1, p.1699–1706, 2011.

FRANCO, H. C. J.; DAMIN, V.; FRANCO, A.; MORAES, M. F.; TRIVELIN, P. C. O. Perda de nitrogênio pela *Brachiaria decumbens* após a antese: relação com a umidade do solo. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.96-102, 2008.

HUMPHREYS, L.R. The maintenance of soil fertility I. Nitrogen and organic matter. In: **Tropical forages: Their role in sustainable agriculture**, p.23-72, 1994.

JAGGER, M.; RICHARDS, K. Temporal Analysis I: Quantifying and Comparing Epidemics. In: **The Study of Plant Disease Epidemics**. The American Phytopathological Society, 2nd Printing, 2008.

KEENEY, D. R. & NELSON, D. W. Nitrogen: inorganic forms. In: PAGE AL; MILLER RH; KEENEY DR. 2nd ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, p. 625-642, 1982.

LA SCALA JUNIOR, N.; LOPES, A.; SPOKAS, K.; ARCHER, D. W.; REICOSKY, D. First-order decay models to describe soil C-CO<sub>2</sub> loss after rotary tillage. **Scientia Agricola**, v.66, n.5, p.650-657. 2009.

MARQUES, L. M. **Antecipação de nitrogênio para a cultura do milho em sucessão a gramíneas forrageiras no sistema plantio direto**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015, 47p.

MATTOS JUNIOR, D.; CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van. Manuseio e conservação de amostras de solo para preservação do nitrogênio inorgânico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.423-431, 1995.

MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the 15N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, n.5, p.657–663, 1990.

MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H. Teor de nitrogênio inorgânico no solo em função de plantas de cobertura, fontes de nitrogênio e inibidor de nitrificação. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v.43, n.4, p.424–435, 2013.

OLIVEIRA, P. P. A.; TRIVELIN, P. C. O.; ALVES, A. C.; LUZ, P. H. C.; HERLING, V. R. **Métodos para avaliar as perdas de nitrogênio por volatilização da superfície do solo e por emissão de amônia pela folhagem de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. 41p. (Boletim, 16).

LÓPEZ PASQUALI, C. E.; FERNÁNDEZ HERNANDO, P.; DURAND ALEGRÍA, J. S. Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, n.1–2 SPEC. ISS., p. 177–182, 2007.

PIVETTA, L. A. **Ciclagem do nitrogênio relacionada ao sistema de produção**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015, 84p.

QIU, X.; LIU, G; ZHU, Y. Determination of Water-soluble Ammonium Ion in Soil by Spectrophotometry. **Analyst**, v.112, p. 909-911, 1987.

RAIJ, B., QUAGGIO, J.A., DA SILVA, N.M. Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by an ionexchange resin procedure. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.17, p.547-566. 1986.

RAIJ B. VAN; ANDRADE JC; CANTARELLA H; QUAGGIO JA. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas : Instituto Agrônômico, 1996. 285p. (IAC. Boletim técnico, 100).

REICHARDT, K.; LIBARDI, P. L.; MEIRELLES, N. M. F.; FERREYRA, F. F. H.; ZAGATTO, E. A. G.; MATSUI, E. Extração e análise de nitratos em solução de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.1, p.130-132, 1977.

RITCHIE, S.W., HANWAY, J.J. **How a corn plant develops**. Special report 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames. 1986.

ROCHA, K. F.; CASSOL, L. C.; PIVA, J. T.; ARRUDA, J. H.; MINATO, E. A.; FAVERSANI, J. C. Épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho num latossolo vermelho muito argiloso sob plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.13, n.3, p.273-284, 2014.

ROS, C. O. da; SALET, R. L.; PORN, R. L.; MACHADO, J. N. C. Disponibilidade de nitrogênio e produtividade de milho e trigo com diferentes métodos de adubação nitrogenada no sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.799-804. 2003.

ROSOLEM, C. A.; FOLONI, J. S. S.; OLIVEIRA, R. H. de. Dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem e adubação nitrogenada, com palha na superfície. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.2, p.301-309, 2003.

ROSOLEM, C. A.; STEINER, F.; ZOCCA, S. M.; DUCATTI, C. Nitrogen Immobilization by Congo Grass Roots Impairs Cotton Initial Growth. **Journal of Agricultural Science**, v.4, n.9, p.126-136, 2012.

SUBBARAO, G. V; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; SAHRAWAT, K. L.; ANDO, Y.; KAWASHIMA, T. Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N<sub>2</sub>O emissions in pasture crop-livestock systems. *Animal*: **An International Journal of Animal Bioscience**, v.7, n.2, p.322–332, 2013.

SWIFT, R. S. Organic Matter Characterization. In: **Methods of Soil Analysis** Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series n<sup>o</sup> 5. Madison: Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, p.1011-1069, 1996.

TASCA, F. A.; ERNANI P. R.; ROGERI D. A.; GATIBONI L. C.; CASSOL P. C. Volatilização de amônia do solo após a aplicação de ureia convencional ou com inibidor de urease. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.35, n.2, p.493-502, 2011.

TEIXEIRA, L. G.; LOPES, A.; LA SCALA JUNIOR, N. Temporal variability of soil CO<sub>2</sub> emission after conventional and reduced tillage described by an exponential decay in time model. **Engenharia Agrícola**, v.30, n.2, p.224-231, 2010.

ÚLEHLOVÁ, B.; KUNC, F.; VANCURA, V. Nutrition and energy sources of microbial populations in ecosystems. In: VANCURA, V.; KUNC, F. **Soil Microbial Associations**, New York: Elsevier. Cap.2, p.15-156, 1988.

USDA, United States Department of Agriculture. **Keys to Soil Taxonomy**, Eleventh Edition, 2010. 338p.

VERAS, M. DE S.; RAMOS, M. L. G.; OLIVEIRA, D. N. S.; FIGUEIREDO, C. C. de; CARVALHO, A. M. de; PULROLNIK, K.; SOUZA, K. W. de. Cover crops and nitrogen fertilization effects on nitrogen soil fractions under corn cultivation in a no-tillage system. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v.40, p.1–12, 2016.

VOLK, G. Volatile loss of ammonia following surfasse application of urea to turf or bare soil. **Agronomy Journal** v.51, p.746-749, 1959.

WALKLEY, A. & BLACK, I.A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v.37, p.29-38. 1934.

WARDLE, D. A. A comparative assessment of factors which influence microbial biomass carbon and nitrogen levels in soil. **Biology Reviews**, v.67, p.321-358, 1992.

**CAPÍTULO 2**  
**POTENCIAL DE NITRIFICAÇÃO, MICRORGANISMOS FIXADORES E**  
**OXIDANTES DE NITROGÊNIO EM SOLO CULTIVADO COM GRAMÍNEAS**  
**FORRAGEIRAS**

**Resumo**

Sistemas de produção com *U. humidicola* diminuem a atividade de microrganismos nitrificantes no solo, o que diminui o teor de  $N-NO_3^-$  causando carência de N às plantas. Já em sistemas de produção brasileiros a deficiência de N foi observada em milho cultivadas após *U. ruzizensis* em solo que apresentava menor teor de  $N-NH_4^+$ . Entretanto, efeito da *U. ruzizensis* sobre populações de microrganismos amonificantes não foram reportados. O objetivo deste trabalho foi quantificar o potencial de nitrificação, a abundância de microrganismos amonificantes (Número Mais Provável, NMP), archaea (16S *Achaea*) e bactéria (16S *Bacteria*) total além de microrganismos específicos na FBN (*nifH*) e nitrificantes da primeira etapa da oxidação do amônio (*amoA* (AOA) e *amoB* (AOB)) em solo cultivado com *U. ruzizensis*, *U. brizantha* e *P. Maximum* durante 11 meses de cultivo. Foi conduzido um experimento em um Nitossolo Vermelho distroférico de textura argilosa em delineamento experimental de blocos ao acaso com três espécies de gramíneas forrageiras em quatro repetições. Concluiu-se que a *U. ruzizensis* não apresentou indícios de inibição da atividade de microrganismos amonificantes, além de aumentar o potencial de nitrificação do N do solo em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*. A precocidade da *U. ruzizensis* em relação às demais espécies e suas respostas a expressão gênica dos microrganismos atuantes nos processos de FBN, amonificação e nitrificação mostram que a fase fenológica das gramíneas forrageiras é o que define a intensidade da atividade. A *U. ruzizensis* possui alta capacidade de aumentar a abundância de microrganismos fixadores de N no início de seu desenvolvimento vegetativo. A abundância de populações de microrganismos nitrificantes e fixadores de N solo cultivado com *U. ruzizensis* está correlacionada positivamente com o teor de  $N-NH_4^+$  do solo.

**NITRIFICATION POTENTIAL, NITROGEN FIXERS AND OXIDANTS**  
**MICROORGANISMS IN SOIL CULTIVATED WITH FORAGE GRASSES**

**Abstract**

Production systems with *U. humidicola* decreases the activity of nitrifying microorganisms in the soil, which decreases the  $N-NO_3^-$  content causing N deficiency to the plants. In Brazilian production systems N deficiency was observed in corn cultivated after *U. ruzizensis* in soil that showed lower  $N-NH_4^+$  content. However, the effect of *U. ruzizensis* on populations of ammonifying microorganisms hasn't been reported. The objective of this work was to quantify the nitrification potential, abundance of ammonifying microorganisms (Most Probable Number, NMP), archaea (16S *Achaea*) and total bacterium (16S *Bacteria*) in addition to specific microorganisms in BNF (*nifH*) and nitrifiers of the first stage of the ammonium oxidation (*amoA* (AOA) and *amoB* (AOB)) in soil cultivated with *U. ruzizensis*, *U.*

*brizantha* and *P. maximum* for 11 months. An experiment was carried in a clayey Typic Rhodustult in a randomized block design with three species of forage grasses in four replicates. It was concluded that *U. ruziziensis* showed no evidence of inhibition of the activity of ammonifying microorganisms, besides increasing the N nitrification potential of the soil in relation to *U. brizantha* and *P. maximum*. The precocity of *U. ruziziensis* in relation to the other species and their response to the N fixers microorganisms gene expression, ammonification and nitrification processes show that the phenological phase of forage grasses is what defines the intensity of the activity. *U. ruziziensis* has a high capacity to increase the abundance of N fixers microorganisms at the beginning of their vegetative development. The abundance of nitrifying microorganisms and soil N fixers cultivated with *U. ruziziensis* is positively correlated with soil N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content.

## 2.1 Introdução

Gramíneas do gênero *Urochloa* são utilizadas em sistemas de integração lavoura-pecuária ou como plantas de cobertura em sistemas em semeadura direta, sendo amplamente utilizadas, principalmente em locais de inverno seco (KLUTHCOUSKI & AIDAR, 2003). Tem-se notado que o milho cultivado após *U. ruziziensis* tem crescimento menor que quando cultivado após *U. brizantha*, apresenta sintomas típicos de deficiência de nitrogênio (N) e tem a produtividade menor (Marques, 2015). Uma análise preliminar mostrou que no solo cultivado com *U. Brizantha* havia maior teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, onde havia mais organismos amonificadores, em relação ao solo cultivado com *U. ruziziensis*. Além do mais, a adubação nitrogenada corrigiu os sintomas. Echer et al. (2012) verificaram menor acúmulo de N em plantas de algodoeiro em solo previamente cultivado com *U. ruziziensis*, efeito atribuído à competição entre microrganismos pelo N do solo em função da alta relação C/N e imobilização do N. Entretanto, considerando-se apenas a competição pelo N do solo, efeito semelhante deveria ser observado com outras espécies de urochloa, que não foi o caso. Assim, há evidências de que a *U. ruziziensis* poderia diminuir a disponibilidade de N às culturas, embora não se conheça o mecanismo responsável.

Plantas do gênero *Urochloa* possuem sistema radicular abundante, explorando com eficiência o solo e tendo assim a capacidade de satisfazer sua necessidade mesmo em sistemas de produção pobres em N. Além do mais, possuem capacidade de ciclar N, absorvendo-o através de mecanismos de alta afinidade de absorção, alcançando sítios de N no solo de difícil acesso, como N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> adsorvido aos colóides do solo (SOUZA & FERNANDES, 2006). Algumas espécies deste gênero

possuem, ainda, mecanismos de manutenção do N no solo, como a capacidade de reduzir a nitrificação, e, portanto, menos sujeito a perdas por lixiviação e desnitrificação (BYRNES et al., 2017). Subbarao et al. (2009; 2013) verificaram inibição da nitrificação em solo cultivado com *U. humidicola* e sorgo (*S. bicolor*), e identificaram que a etapa em que ocorre o bloqueio da nitrificação está ligada à atividade de nitrossomonas, primeira fase de oxidação do  $N-NH_4^+$ . Entretanto, existem espécies gramíneas em que a inibição da nitrificação não ocorre ou ocorre em baixa intensidade. Um exemplo disso é o *P. maximum*, que é uma gramínea que se desenvolve bem em condições de elevada disponibilidade de N (BORGHI & CRUSCIOL, 2007), tendo baixa contribuição à inibição da nitrificação em relação à *U. humidicola* (SUBBARAO et al., 2007).

A inibição da nitrificação é afetada por compostos exsudados das raízes das plantas. Tais compostos podem interagir com a microbiota do solo alterando a dinâmica de nitrificação (ÚLEHLOVÁ et al., 1988). O mecanismo de inibição da nitrificação promovido pela *U. humidicola* se dá por meio da exsudação no solo de uma substância chamada Brachialactone que diminui a atividade de bactérias do grupo Nitrossomonas, inibindo a nitrificação (SUBBARAO et al., 2009). Estes compostos podem ainda atuar em outros processos microbiológicos, como a fixação biológica de N (FBN). Boddey & Victoria (1986) mostraram que cerca de 30 a 40% do N em plantas de *U. humidicola* e *U. decumbens* é proveniente da FBN, ou seja, nas condições do estudo isso representa 30 a 45 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Já quando se testou 25 genótipos de *P. maximum*, Miranda et al. (1990) demonstraram que estes possuem capacidade de utilizar 16 a 49% do N via FBN.

A evolução das braquiárias ocorreu em regiões de fertilidade baixa, sendo assim, um dos motivos do gênero ser o mais cultivado no Brasil (KARIA et al., 2006), principalmente na região Centro-Oeste, em solos naturalmente pobres em nutrientes. Por esta adaptação em solos de baixa fertilidade, espécies desse gênero quando cultivadas em solos mais férteis e em sistemas de produção com culturas mais exigentes em fertilidade, como o milho, podem esgotar ou restringir o N do solo somente para seu uso como estratégia de sobrevivência, sendo a espécie cultivada em sucessão desfavorecida nutricionalmente. Assim, a liberação de exsudados no solo por espécies de gramíneas forrageiras pode alterar a microbiota do solo potencializando-a ou inibindo-a (ÚLEHLOVÁ et al., 1988). Dessa forma a ação desses compostos sobre a FBN e os processos que envolvem a dinâmica do N no

solo devem ser melhor entendidas para o melhor fornecimento de N dentro do sistema de produção.

O objetivo deste trabalho foi quantificar o potencial de nitrificação, a abundância de microrganismos amonificantes (Número Mais Provável, NMP), archaea (16S *Achaea*) e bactéria (16S *Bacteria*) total além de microrganismos específicos na FBN (*nifH*) e nitrificantes da primeira etapa da oxidação do amônio (*amoA* (AOA) e *amoB* (AOB)) em solo cultivado com *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* durante 11 meses de cultivo.

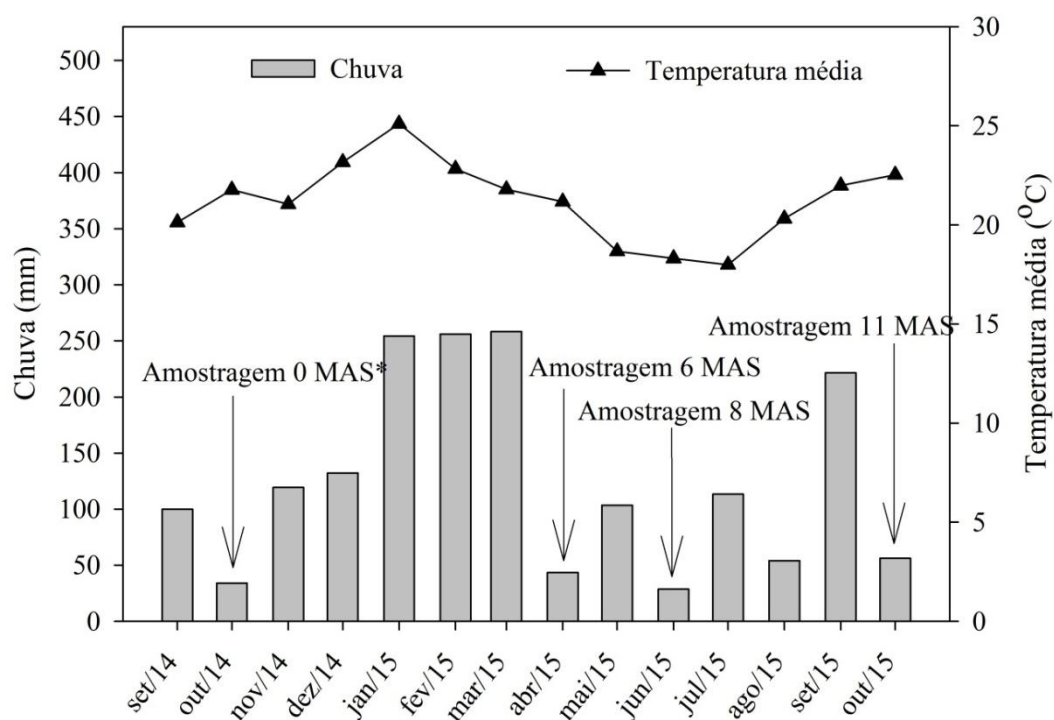
## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Caracterização da área do experimento

Foi conduzido um experimento de campo em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, 22° 49' Latitude Sul e 48° 25' Longitude Oeste de Greenwich, com altitude média de 770 metros. O solo da área é classificado como Nitossolo Vermelho distroférico estruturado (EMBRAPA, 1999), ou *Typic Rhodustult* (USDA, 2010), de textura muito argilosa, com 626 g kg<sup>-1</sup> de argila, com menos de 3% de declividade. A área estava há quatro anos sem cultivo, recoberta por plantas espontâneas, predominando plantas daninhas gramíneas. O clima é Cwa, pela classificação de Köppen, subtropical úmido, com precipitação média anual de 1400 mm, temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C e do mês mais frio entre 3 e 18 °C. Os dados climáticos obtidos durante o experimento foram adquiridos por meio de uma estação meteorológica localizada a cerca de 500 m da área experimental e estão apresentados na Figura 5.



**Figura 5 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*). \*MAS = Meses após a semeadura das gramíneas forrageiras.**



Antes da instalação do experimento foi realizada amostragem de solo na camada de 0,00-0,20 m de profundidade para caracterização química de rotina da área. O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado de acordo com método descrito por Walkley & Black (1934) e o pH em solução de cloreto de cálcio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) foi determinado com auxílio de potenciômetro digital (RAIJ et al., 2001). O teor de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  foi determinado por destilação conforme descrito por Keeney & Nelson (1982). A acidez potencial a pH 7,0 (H+Al) foi determinada de acordo com Raij et al. (2001). O teor de fósforo (P), cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) trocáveis foram extraídas com resina trocadora de íons (Raij et al., 1986). A concentração de P foi determinada em espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão) e os teores de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  foram determinados utilizando espectrômetro de absorção atômica modelo AAS7000 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão). Os resultados estão expressos na Tabela 6.

**Tabela 6 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,00 – 0,20 m de profundidade.**

MO	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P (resina)	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H+Al	V
g dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	-----	mg kg <sup>-3</sup>	-----	-----	mmol <sub>c</sub>	dm <sup>-3</sup>	-----	%
20	5,9	5,4	6,3	15	1,2	34	23	37	60

MO= Matéria orgânica; V= Saturação por Bases.

### 2.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três espécies de gramíneas forrageiras em quatro repetições. Foram utilizadas as espécies: braquiária ruzizensis cv. Comum (*Urochloa ruzizensis*), braquiária brizanta cv. Marandú (*Urochloa brizantha*) e capim colômbio cv. Tanzânia (*Panicum maximum*).

### 2.2.3 Instalação e condução do experimento

A área do experimento foi previamente dessecada com pulverização de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato com 720 g kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i. a.). A semeadura das gramíneas forrageiras ocorreu no dia 22 outubro de 2014 com uma semeadora de fluxo contínuo da marca Semeato modelo Personale Drill 21. As gramíneas forrageiras foram semeadas sem adubação em semeadura direta com densidade de 10 kg ha<sup>-1</sup> de sementes viáveis, considerando 500 pontos de valor cultural ha<sup>-1</sup> e valor cultural de 50%. O espaçamento utilizado foi de 0,2 m entre fileiras. As parcelas continham dimensões de 9,0 x 20,0 m totalizado 180 m<sup>2</sup> e área útil de 152 m<sup>2</sup>. As gramíneas permaneceram na área por 11 meses e então foram dessecadas para a implantação da cultura do milho.

### 2.2.4 Amostragem de solo

Foram realizadas quatro amostragens de solo durante o ciclo das gramíneas forrageiras. Foi realizada amostragem imediatamente antes da semeadura e aos 6, 8 e 11 meses após a semeadura (MAS), nas datas de 14 de outubro de 2014, 20 de abril, 17 de junho e 07 de outubro de 2015, respectivamente. Foi amostrado solo nas

camadas de 0,00-0,10 e 0,10-0,20 m de profundidade. As amostras foram coletadas com amostrador tipo caneca, de 5,08 cm de diâmetro. As amostras úmidas, foram imediatamente peneiradas em malha 2 mm e acondicionadas a -15 °C até o momento das análises (MATTOS JR. et al., 1995).

### **2.2.5 Potencial de nitrificação**

O potencial de nitrificação foi avaliados somente aos 11 MAS das gramíneas forrageiras com amostras de solo das camadas de 0,00-0,10 e 0,10-0,20 m de profundidade. A quantificação foi realizada de acordo com método proposto por López et al. (1998). Foram utilizados, para cada amostra, dois erlenmeyers de 250 ml com 50 g de solo em capacidade de campo, onde em um deles adicionou-se N de fonte amoniacal. Os erlenmeyers foram vedados e incubados no escuro a 30 °C, durante duas semanas. Em seguida, foi realizada extração do N-mineral com solução de cloreto de potássio (KCl) 2 mols L<sup>-1</sup> e destilação para determinação do teor de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KEENEY & NELSON, 1982). No momento da análise foram tomado 10 g de solo de cada amostra, que foram secos em estufa a 105 °C até massa constante para determinação da umidade do solo, uma vez que as análises ocorreram com solo em umidade natural.

### **2.2.6 Quantificação de microrganismos amonificantes**

Os organismos amonificantes foram quantificados por crescimento em meio de cultura (SARATHCHANDRA et al., 1978; WOOMER, 1994). Foi utilizado solo da camada 0,00-0,10 m de profundidade das amostragens aos 0, 6 e 11 MAS. A metodologia consistiu em extração dos microrganismos com solução salina de cloreto de sódio 0,85% (NaCl) esterilizado. Após extração, foram realizadas sucessivas diluições, de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup>, para posterior inoculação no meio de cultura. O meio de cultura é composto de solução nutritiva com caseína hidrolisada 1,0%, extrato de levedura 0,01%, fosfato de potássio monoácido 0,1% (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), sulfato de magnésio 0,01% (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), sulfato ferroso 0,001% (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), sulfato de manganês 0,001% (MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O) e indicador vermelho de fenol 0,002%. Das séries diluídas, adicionou-se 1 ml da amostra de cada diluição no meio de cultura em quintuplicata. As amostras foram incubadas por 5 dias a 28 °C. Após incubação os

tubos com atividade amonificante produziram cor rosa. Para quantificar os organismos amonificadores foram utilizadas as tabelas de estimativas do número mais provável (NMP) (KOCH, 1981; ALEXANDER, 1982; BROCKWELL, 1982; SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

### 2.2.7 Quantificação de microrganismos nitrificantes e fixadores de nitrogênio

A quantificação de organismos nitrificantes e fixadores de N foi realizada através de qPCR em tempo real. Foram utilizadas as amostras da camada de 0,00-0,10 m de profundidade de todas as amostragens. A extração do DNA do solo foi realizada utilizando 350 mg de solo, usando o *Kit Power Soillyzer DNA Extraction<sup>TM</sup>* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), segundo instruções do fabricante, e armazenado a -20 °C até a análise. Para confirmar a qualidade da extração de DNA, uma alíquota de 5 µl foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado em GelRed<sup>TM</sup> (Uniscience) em tampão SB (BRODY & KERN, 2004). Como padrão molecular foi utilizado 2 µl de *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). O gel foi submetido a um campo elétrico de 85 V por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro de Nanodrop 2000c (Thermocientific), adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm ( $DO_{260}$ ) como sendo igual a 50 ng de DNA  $\mu^{-1}$  (SAMBROOK; FRITISCH; MANIATS; 1989).

Foram desenvolvidas curvas padronizadas para quantificar os genes 16S rRNA de *Bacteria* e *Archaea*, *nifH*, *amoA* e *amoB* na comunidade microbiana do solo. A primeira etapa da oxidação do  $N-NH_4^+$  foi quantificada com primer específico para *Archaea* (AOA) e *Bacteria* (AOB). A quantificação dos microrganismos fixadores de N foi realizada com auxílio de *primer* específico com o gene *nifH*. Posteriormente, o termociclador StepOne Plus<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) foi utilizado para a detecção quantitativa por PCR fluorescente em tempo real (qPCR) com SYBR Green I como corante fluorescente. A reação em um volume final de 10 µL, contendo *SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific), *primers forward e reverse*, DNA da amostra teste e água ultrapura esterilizada. Os primers utilizados e as condições de amplificação são apresentadas na Tabela 7.

**Tabela 7 – Genes alvo, primers, sequências e condições de amplificação utilizados para determinação de microrganismos fixadores de nitrogênio, oxidantes de amônio e *Bacteria e Archaea* total no solo.**

Genes alvo	Primers	Sequência (5'- 3')	Tamanho fragmento (pb)	Referência	Condições de amplificação
<b>16S rRNA Bacteria</b>	Eub 338f Eub 518r	ACTCCTACGGGA GGCAGCAG ATTACCGCGGCT GCTGG	180	Bakke et al., (2011)	95°C - 10 min; 40 ciclos, 94°C – 15 s, 56°C - 30 s e 72 °C - 45 s
<b>16S rRNA Archaea</b>	ARC1059 r RC787f	ATTAGATACCCSB GTAGTCC GCCATGCACCWC CTC T)	273	Yu et al., (2005)	95°C - 10 min; 40 ciclos, 95°C - 15 s, 57°C - 20 s e 72°C - 30 s.
<b>nifH</b>	nifHF- Rösch <sup>h</sup>	AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC TTG TTS GCS GCR TAC ATS GCC ATC AT	457	Wallenstein & Vilgal (2005) Rösch & Bothe (2005) Gaby & Buckley (2012)	95°C - 5 min; 40 ciclos, 95 °C – 30 s, 59°C - 30 s e 72°C – 1 min e 72° C – 1 min
<b>AOA amoA</b>	amoA1F amoA 2F	STA ATG GTC TGG CTT AGA CG GCG GCC ATC CAT CTG TAT GT	635	Francis et al. (2005)	95°C - 5 min; 40 ciclos, 95°C - 40 s, 56°C - 30 s e 72°C - 60 s.
<b>AOB amoB</b>	amoB 1F amoB 2F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	491	Rotthauwe et al. (1997)	95°C - 10 min; 40 ciclos, 95°C - 45 s, 60°C - 45 s e 72°C - 45 s.

### 2.2.8 Análise estatística

Os dados do qPCR foram obtidos pelo StepOne Software 2.2.2 (Applied Biosystems), de onde foram exportados para o programa Excel (Microsoft) onde foram calculadas as quantidades de cópias do gene para cada grama de solo. Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância (teste de Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilk). Atendidos estes pressupostos, foi feita análise de variância pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Ocorrendo significância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Realizou-se ainda estimativas de correlação de Pearson entre os teores de  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_3^-$  no solo com as variáveis de abundância de microrganismos para as épocas de amostragens agrupadas. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS 9.2.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Potencial de nitrificação

O teor de  $\text{N-NO}_3^-$  nas amostras foi significativamente maior no solo em que a *U. ruziziensis* foi cultivada em relação às demais espécies, em ambas as camadas amostradas (Tabela 8). A adição do sulfato de amônio não estimulou o processo de nitrificação em nenhuma das espécies testadas.

**Tabela 8 – Potencial de nitrificação de amostras de solo cultivado por 11 meses com *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* nas camadas de 0-0,10 e 0,10-0,20 m de profundidade.**

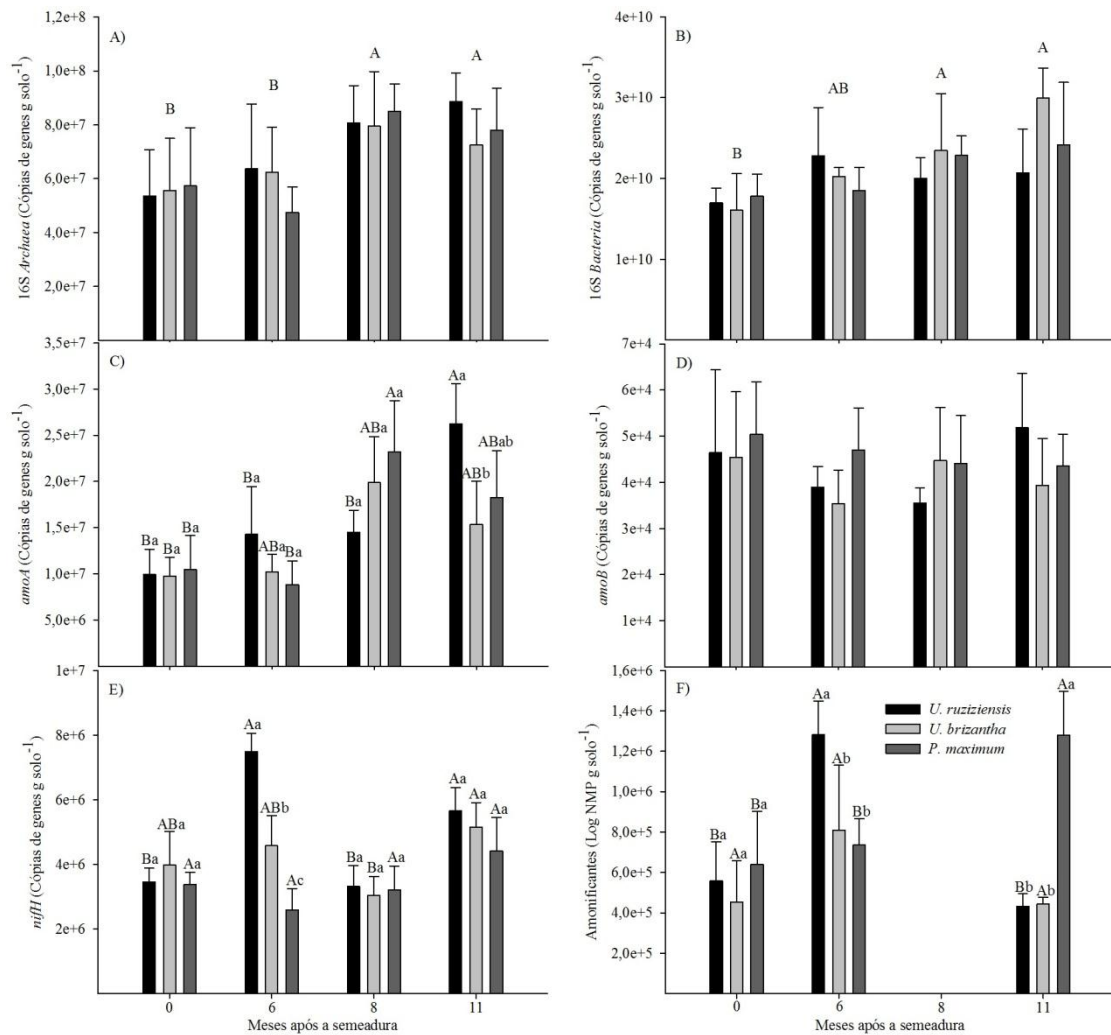
<i>U. ruziziensis</i>	<i>U. brizantha</i>	<i>P. maximum</i>	Média
----- N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg dm <sup>-3</sup> -----			
0,00 - 0,10 m			
21,2 A	15,9 B	17,2 B	18,1
0,10 - 0,20 m			
14,6 A	12,1 B	12,8 B	13,2

Médias seguidas por letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 2.3.2 Abundância de microrganismos amonificantes, nitrificantes e fixadores de nitrogênio

A abundância total de *Archaea* e *Bacteria* aumentou com o cultivo das gramíneas forrageiras, independente da espécie utilizada (Figura 6A e 6B), sendo que aos 8 e 11 MAS foram encontrados os maiores valores. A abundância de bactérias oxidantes do amônio (AOB) não foi modificada, independente da época de amostragem e da espécie testada (Figura 6D). Já as *Archaea* responsáveis pelo processo de oxidação do amônio (AOA) apresentaram interação significativa com as épocas de amostragem (Figura 6C). No início do desenvolvimento, 6 MAS das gramíneas forrageiras, a *U. ruziziensis* apresentou maior abundância de AOA em relação às demais espécies, o que se repetiu aos 11 MAS das gramíneas. Aos 8 MAS das forrageiras o *P. maximum* apresentou maior abundância de AOA, seguido de *U. brizantha* e *U. ruziziensis*.

**Figura 6 – Abundância de genes 16S *Achaea* (A), 16S *Bacteria* (B), *amoA* (C), *amoB* (D), *nifH* (E) e microrganismos amonificantes (F) em solo durante o cultivo com *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*. Médias seguidas por letras diferentes, maiúscula dentro de cada espécie de gramínea forrageira e minúscula dentro de cada época de amostragem, diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Barras indicam o desvio padrão.**



Interação das épocas de amostragens e as espécies de gramíneas forrageiras também foi observada para a abundância de microrganismos envolvidos na FBN (*nifH*) (Figura 6E). Novamente a *U. ruziziensis* apresentou maior abundância de fixadores de N aos 6 e aos 11 MAS em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*. Aos 8 MAS todas as espécies mostraram abundância semelhante de fixadores de N. De forma geral, neste estudo, o cultivo de gramíneas forrageiras aumentou a abundância de *Archaea* oxidantes de  $N-NH_4^+$  após 11 MAS das forrageiras.

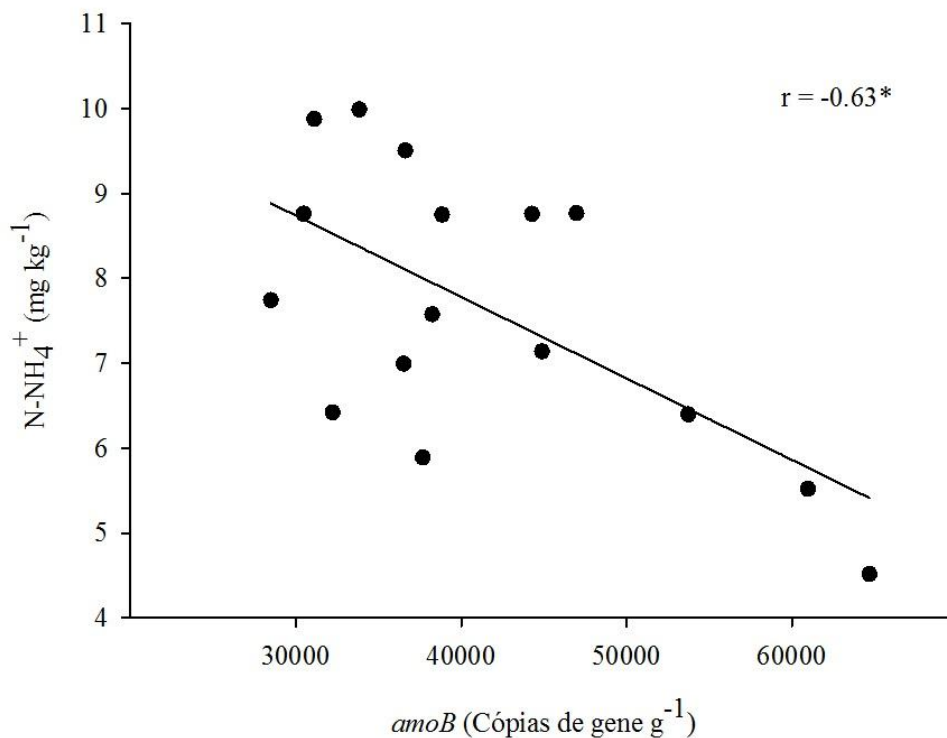
Os microrganismos amonificantes foram encontrados em maior abundância com *U. ruzizensis*, aos 6 MAS e no *P. maximum* aos 11 MAS em relação as demais espécies (Figura 6F). A *U. brizantha* apresentou abundância de amonificantes relativamente constante no decorrer do seu desenvolvimento.

### 2.3.3 Correlações de abundância de microrganismos de solo e nitrogênio mineral no solo

Ao correlacionar o teor de  $\text{N-NH}_4^+$  com arqueia total e oxidantes de  $\text{N-NH}_4^+$ , bactérias totais e fixadores de N no solo cultivado com *U. ruzizensis*, foi observada correlação positiva e significativa (Figura 7). As demais estimativas de correlação não apresentaram significância. Ao correlacionar o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  com a abundância de microrganismos no solo, nenhuma resposta significativa foi observada.

**Figura 7 – Estimativas de correlação de Pearson do teor de amônio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) do solo e a abundância de bactéria oxidantes de amônio (*amoB*) em solo cultivado por 11 meses com *U. brizantha* amostrado aos 0, 6, 8 e 11 meses após a semeadura.**

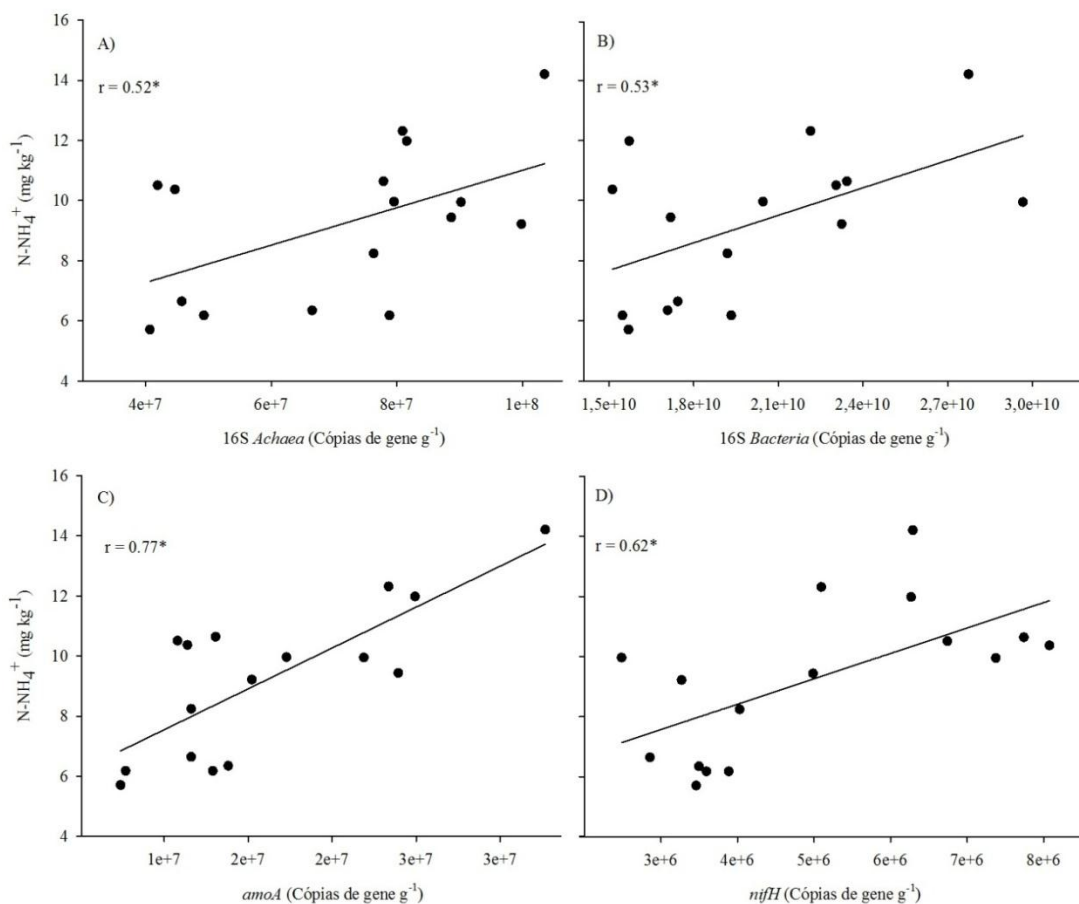
**\*Significativo pelo teste t ( $p < 0,05$ ).**





A correlação do teor de  $\text{N-NH}_4^+$  com a abundância de bactérias oxidantes de  $\text{N-NH}_4^+$  foi negativa em solo cultivado com *U. brizantha* (Figura 8). As demais correlações não apresentaram significância.

**Figura 8 – Estimativas de correlação de Pearson do teor de amônio ( $\text{N-NH}_4^+$ ) do solo e a abundância total de arqueia (A) e bactéria (B), bactérias oxidantes de amônio (C) e microrganismos fixadores de nitrogênio (D) em solo cultivado por 11 meses com *U. ruziziensis* amostrado aos 0, 6, 8 e 11 meses após a semeadura. \*Significativo pelo teste t ( $p < 0,05$ ).**



## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Potencial de nitrificação

Na presença de  $\text{N-NH}_4^+$  no solo, o cultivo de *U. ruziziensis* resulta em maior capacidade do sistema de convertê-lo a  $\text{N-NO}_3^-$  em relação às demais espécies,

independente da camada de solo analisadas. Para algumas espécies de *Urochloa* a nitrificação tende a ser diminuída como reportado por Subbarao et al. (2009), que observaram a diminuição de nitrificação no solo cultivado com *U. humidicola*. Assim, seria esperado que a inibição da nitrificação pudesse ocorrer em solo cultivado com gramíneas do gênero *Urochloa*, que foi observado no presente trabalho, porém não na mesma intensidade, e somente aos 11 MAS das forrageiras.

#### **2.4.2 Abundância de microrganismos amonificantes, nitrificantes e fixadores de nitrogênio**

As amostragens realizadas aos 8 e 11 MAS demonstram que ao longo do tempo as espécies criam um ambiente que pode disponibilizar o N para o seu uso. Aos 8 e 11 MAS, as espécies já encontravam-se com aproximadamente 7,0 a 8,0 Mg ha<sup>-1</sup> de matéria seca acumulada, não havendo mais competição com espécies invasoras (Capítulo 4). Dessa forma, aumentar a atividade de ciclagem de N no solo pode ser uma alternativa de promover maior crescimento e competitividade dentro de seu ambiente de desenvolvimento.

Aos 8 MAS o solo cultivado com *U. brizantha* e o *P. maximum* apresentaram maior abundância de *Archaea* oxidantes de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em relação à *U. ruziziensis*. Já aos 6 e aos 11 MAS o solo cultivado com *U. ruziziensis* apresentou maior abundância de *Archaea* oxidantes de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em relação à *U. brizantha* e o *P. maximum*. Este efeito pode estar relacionado ao ciclo das forrageiras, pois, apesar de serem perenes, *U. ruziziensis* é mais precoce, seguida de *U. brizantha* e *P. maximum*. Entretanto, aos 11 meses a *U. ruziziensis*, com o início das chuvas e elevação da temperatura (Figura 5), já estava iniciando um novo ciclo de crescimento, quando a demanda por N se elevou e foi criado um ambiente favorável para o seu desenvolvimento, podendo disponibilizar mais N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pela ação das *Archaea* oxidantes de amônio. Dessa forma, apesar da literatura não comparar ciclo das forrageiras utilizadas nesse estudo, a *U. ruziziensis*, por ser mais precoce que as demais espécies, promoveu o aumento da abundância de microrganismos amonificantes, uma vez que as espécies não receberam N via fertilizante. Assim, a *U. ruziziensis* tem maior oferta de N e crescimento inicial mais acelerado, o que foi evidenciado no campo. Entretanto, aos 11 meses de cultivo a abundância de microrganismos amonificantes é muito baixa em relação ao *P. maximum*. Isso indica

provável interrupção no processo de amonificação do N-orgânico no solo cultivado com *U. ruziziensis* e *U. brizantha*. Mais uma vez, a resposta fisiológica parece estar ligada ao ciclo de crescimento das gramíneas, uma vez que o *P. maximum* tem ciclo mais tardio em relação às demais espécies. Entretanto, a *U. brizantha* também possui ciclo mais tardio que *U. ruziziensis* e teve resposta semelhante, indicando que esta resposta poderia ser um efeito específico do gênero *Urochloa*.

Apesar de estar comprovado somente o efeito da *U. humidicola* inibindo a nitrificação, há evidência de que outras espécies do gênero *Urochloa* poderiam ter este efeito. Byrnes et al. (2017) utilizaram *U. humidicola* e um híbrido chamado Mulato (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandú) com sucesso para diminuir a nitrificação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> proveniente da urina de bovinos em áreas de pastagem. O resultado foi menor perda por desnitrificação.

De forma geral, as plantas absorvem predominantemente o nitrato em relação ao amônio (CANTARELLA, 2007). Porém a absorção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> resulta em menor gasto energético para a planta, e a FBN é uma forma de fornecer N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à planta. Assim, a abundância de microrganismos fixadores de N na rizosfera das gramíneas forrageiras pode ser uma estratégia de entrada de N em sistemas de alta resposta ao nutriente. Esse é um dos mecanismos exercidos pela *U. ruziziensis*, evidenciados neste trabalho, pois apresentava, aos 6 MAS abundância de fixadores de N superior em relação a *U. brizantha* e *P. maximum* (Figura 6). A *U. brizantha* também apresenta esse mecanismo, menos intenso que *U. ruziziensis*, mas superior ao *P. maximum*. Aos 8 e 11 MAS as espécies não diferiram mais em abundância de fixadores de N, porém, a *U. ruziziensis*, iniciando um novo ciclo de crescimento, como discutido, favorece o aumento da abundância destes microrganismos, seguida da *U. brizantha* aos 11 meses. Reis et al. (2001) mostraram que 20% do N no tecido de *U. ruziziensis* e *U. brizantha* é proveniente da FBN. Entretanto nesse estudo o efeito para *U. brizantha* não foi observado em relação a FBN. A população de microrganismos fixadores de N no solo cultivado com *P. maximum* se mostrou muito constante, e esta espécie não se mostrou favorável a estes microrganismos. Isso pode ser explicado pela alta exigência nutricional da espécie, que, por consequência, apresenta versatilidade menor que o gênero *Urochloa* em ambientes de alta resposta a N.

### 2.4.3 Correlações de abundância de microrganismos de solo e nitrogênio mineral no solo

Quanto à correlação do teor de  $\text{N-NH}_4^+$  com a abundância de arqueia total e bactéria total, pode-se inferir que a *U. ruzizensis* tem maior efeito sobre a microbiota do solo, de modo a disponibilizar  $\text{N-NH}_4^+$ . O mesmo ocorre com a abundância de fixadores de N. O teor de  $\text{N-NH}_4^+$  e a abundância de arqueias oxidantes do  $\text{N-NH}_4^+$  aumentaram simultaneamente, resultados estes que corroboram os resultados de potencial de nitrificação deste trabalho, onde a nitrificação de  $\text{N-NH}_4^+$  foi maior com *U. ruzizensis* em relação as demais espécies. Segundo Yao et al. (2011), em solos onde o pH se elevou de 3,8 a 6,2, bactérias oxidantes de amônio (AOB) teriam vantagem sobre o grupo arqueia, entretanto, a espécie mesmo assim conseguiu manter elevada a atividade de *Archaea* nitrificante (AOA). Neste estudo o pH do solo foi de 5,4 (ANEXO B), e a maior nitrificação dada pelo cultivo de *U. ruzizensis* pode ser atribuída ao seu estímulo *Archaea* nitrificantes.

A *U. brizantha* consegue regular o processo de nitrificação, sendo que, na presença de  $\text{N-NH}_4^+$ , a atividade oxidante é reduzida. Esse resultado está diretamente ligado à abundância de *Achaeae* oxidantes de amônio do presente trabalho, que aos 11 MAS é menor em relação as demais espécies.

Os resultados demonstram que a *U. ruzizensis* possui maior capacidade de influenciar as populações de microrganismos do solo que as outras espécies. Essa capacidade pode lhe conferir maior potencial de sobrevivência em ambientes de alta resposta a N. Entretanto, essa característica pode resultar em seleção de microbiota altamente específica, que pode diminuir a oferta de N para outras espécies cultivadas em sucessão, já que a diversidade de microrganismos fixadores de N na rizosfera de gramíneas pode ser elevada (ROESCH et al., 2007). Como estas gramíneas são utilizadas em sistemas de produção agrícola em rotação com culturas de alta exigência nutricional, elas podem ocasionar o menor desenvolvimento e produtividade em decorrência da menor disponibilidade de N (Marques, 2015). Foi o que aconteceu também no presente trabalho, onde a produtividade de grãos de milho foi inferior quando cultivado após *U. ruzizensis* em relação às demais espécies (Capítulo 4). Assim, em sistemas de produção que possuem alta resposta a N, o uso de *U. ruzizensis* não é a melhor opção para obtenção de alta produtividade das culturas em sucessão.

## 2.5 Conclusão

A *U. ruzizensis* não inibe a atividade de microrganismos amonificantes e aumenta o potencial de nitrificação do N do solo em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*.

A atividade microbiana relacionada à FBN, amonificação e nitrificação guarda relação com a fase de desenvolvimento das gramíneas forrageiras.

A *U. ruzizensis* possui alta capacidade de aumentar a abundância de microrganismos fixadores de N no início de seu desenvolvimento vegetativo.

A FBN pode ser uma importante entrada de N em sistemas de produção de rotações de gramíneas forrageiras com milho.

A abundância de populações de microrganismos nitrificantes e fixadores de N solo cultivado com *U. ruzizensis* está correlacionada positivamente com o teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do solo.

## 2.6 Referências

ALEXANDER, M. Most probable number method for microbial population. In: PAGE, A. L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Eds). **Methods of soil analysis**. 1982. p. 815-820 (Agronomy monograph 9).

BAKKE, I.; SCHRYVER, P. DE; BOON, N.; VADSTEIN, O. PCR-based community structure studies of Bacteria associated with eukaryotic organisms: A simple PCR strategy to avoid co-amplification of eukaryotic DNA. **Journal of Microbiological Methods**, v.84, n.2, p.349–351, 2011.

BODDEY, R. M. & VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using <sup>15</sup>N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v.90, n.1–3, p.265–292, 1986.

BORGHI, E. & CRUSCIOL, C. A. C. Produtividade de milho, espaçamento e modalidade de consorciação com *Brachiaria brizantha* em sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.42, n.2, p.163–171, 2007.

BROCKWELL, J. Plant infection counts of rhizobia in soils. In **Nitrogen Fixation in Legumes**. Vincent JM (ed) Academic Press, New York, p.41–58. 1982.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: a Tris-free cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v.36, p.214-216, 2004.

BYRNES, R. C.; NÚÑEZ, J.; ARENAS, L.; RAO, I.; TRUJILLO, C.; ALVAREZ, C.; ARANGO, J.; RASCHE, F.; CHIRINDA, N. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria* grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. **Soil Biology & Biochemistry**, v.107 p.156-163, 2017.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.7, p.375-470.

ECHER, F. R.; CASTRO, G. S. A.; BOGIANI, J. C.; ROSOLEM, C. A. Crescimento inicial e absorção de nutrientes pelo algodoeiro cultivado sobre a palhada de *Brachiaria ruziziensis*. **Planta Daninha**, v.30, n.4, p.783–790, 2012.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1999. 412p.

FRANCIS, C. A.; ROBERTS, K. J.; BEMAN, J. M.; SANTORO, A. E.; OAKLEY, B. B. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.41, p.14683–14688, 2005.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase. **PLoS ONE**, v.7, n.7, 2012.

KARIA, C.T.; DUARTE, J.B.; ARAÚJO, A.C.G. de. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 57p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 163).

KEENEY, D. R. & NELSON, D. W. Nitrogen: inorganic forms. In: PAGE AL; MILLER RH; KEENEY DR. 2nd ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, p. 625-642, 1982.

KLUTHCOUSKI, J. & AIDAR, H. Implantação, condução e resultados obtidos com o sistema Santa Fé. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Ed.). **Integração lavoura - pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. 2003. p.407-441.

KOCH, A.L. Growth measurement. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; COSTILOW, R.N.; NESTOR, E.G.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R.; PHILLIPS, G.B. (Eds.). **Manual of methods for general bacteriology**, Washington: ASM, p.179-207, 1981.

LÓPEZ, A.; JESUS, H.S.; ROCHA, M.M.; FRIES, M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R. **Diagnóstico do potencial de nitrificação e desnitrificação em solo sob pastagens de *Brachiaria* sp.e solo sob plantio direto e convencional**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 24 p. (Série Documentos, n° 78)

MARQUES, L. M. **Antecipação de nitrogênio para a cultura do milho em sucessão a gramíneas forrageiras no sistema plantio direto**. Dissertação de

mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015, 47p.

MATTOS JUNIOR, D.; CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van. Manuseio e conservação de amostras de solo para preservação do nitrogênio inorgânico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.423-431, 1995.

MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the <sup>15</sup>N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, n.5, p.657–663, 1990.

RAIJ, B., ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agrônomo, Campinas. 2001, 285p.

RAIJ, B., QUAGGIO, J.A., DA SILVA, N.M. Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by an ionexchange resin procedure. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.17, p.547-566. 1986.

RITCHIE, S.W., HANWAY, J.J. **How a corn plant develops**. Special report 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames. 1986.

REIS, V. M.; REIS JR, F. B. dos; QUESADA, D. M; OLIVEIRA, O. C. A. de; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.837–844, 2001.

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31 p.1367-1380, 2007.

RÖSCH C.; BOTHE, H. Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. **Applied Environment Microbiology**, v.71, p.2026–2035, 2005.

ROTHAUWE, J. H.; WITZEL, K. P.; LIESACK, W. The ammoniamonooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker:molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizingpopulations. **Applied Environment Microbiology**, v.63, p.4704–4712, 1997.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T., **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SARATHCHANDRA, S.V. Nitrification activities and the changes in the population of nitrifying bacteria in soil perfused with two different H-ion concentrations. **Plant and Soil**, v.50, p.99-111, 1978.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H. J. **Methods in legume-rhizobium technology**. Maui: University of Hawaii NifTAL, 1985. 367p.

SOUZA, S. R. & FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Eds). **Nutrição Mineral de Plantas**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. Cap. 4, p.215-252.

SUBBARAO, G. V. RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W. L. BIOLOGICAL NITRIFICATION INHIBITION (BNI) – is it a widespread phenomenon? **Plant Soil**, v.294, p.5-18, 2007.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; ONO, H.; OHNISHI- KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; KAWANO, N.; BERRY, W. L. Free fatty acids from the pasture grass *Brachiaria humidicola* and one of their methyl esters as indicators of nitrification. **Plant Soil**, v.313, p.89–99, 2008.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, n.41, p.17302-17307, 2009.

SUBBARAO, G. V; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; SAHRAWAT, K. L.; ANDO, Y.; KAWASHIMA, T. Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N<sub>2</sub>O emissions in pasture crop-livestock systems. *Animal*: **An International Journal of Animal Bioscience**, v.7, n.2, p.322–332, 2013.

ÚLEHLOVÁ, B.; KUNC, F.; VANCURA, V. Nutrition and energy sources of microbial populations in ecosystems. In: VANCURA, V.; KUNC, F. **Soil Microbial Associations**, New York: Elsevier. Cap.2, p.15-156.

USDA, United States Department of Agriculture. **Keys to Soil Taxonomy**, Eleventh Edition, 2010. 338p.

WALKLEY, A., BLACK, I.A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v.37, p.29-38. 1934.

WALLENSTEIN, M. D.; VILGALYS, R. J. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. **Pedobiologia**, v.49, n.6, p.665–672, 2005.

WOOMER, P.L. Most Probable Number Counts. In: R.W. Weaver et al. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. **Soil Science Society of America**, Madison, p.59-79, 1994.

YAO, H.; GAO, Y.; NICOL, G. W.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I.; ZHANG, L.; HAN, W.; SINGH, B. K. Links between ammonia oxidizer community structure, abundance, and nitrification potential in acidic soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4618–4625, 2011.



YU, Y.; LEE, C.; KIM, J.; HWANG, S. Group specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnol Bioengineer**, v.89, p.670–679, 2005.

### CAPÍTULO 3

## RECUPERAÇÃO DO NITROGÊNIO DO FERTILIZANTE PELO MILHO CULTIVADO APÓS GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

### Resumo

A disponibilidade de N para a cultura do milho pode ser reduzida em sistemas de rotação com gramíneas do gênero *Urochloa*. Assim, a dose de fertilizante nitrogenado para o milho cultivado após essas gramíneas pode ser elevada. Entretanto, estas gramíneas forrageiras podem, também, interferir na oferta do N aplicado via fertilizante diminuindo seu aproveitamento. Diante disso, pode-se levantar a hipótese de que a *U. ruziziensis* promove menor oferta de N para a cultura em sucessão em relação à outras gramíneas forrageiras, diminuindo a eficiência da adubação nitrogenada, o que resultaria na necessidade de uso de maiores doses do fertilizante. Assim, objetivou-se verificar a recuperação do N do fertilizante pelo milho cultivado após 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, bem como a abundância de N proveniente do fertilizante nos diversos componentes do sistema utilizando a técnica de traçador com o isótopo estável  $^{15}\text{N}$ . Foi conduzido um experimento em um Nitossolo Vermelho distroférico de textura argilosa em delineamento experimental de blocos ao acaso com três espécies de gramíneas forrageiras em quatro repetições. Após o cultivo das gramíneas forrageiras foi realizado um cultivo de milho com  $140 \text{ kg ha}^{-1}$  de N na forma de sulfato de amônio enriquecido com  $^{15}\text{N}$ . Não foram observadas diferenças significativas da recuperação do N aplicado pelo milho. Assim, o fertilizante aplicado no milho cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* é utilizado com a mesma eficiência pela cultura do milho. Pôde-se concluir que a carência mais intensa de N para o milho cultivado após *U. ruziziensis* em relação à *U. brizantha* e *P. maximum* não é atribuída ao efeito das gramíneas forrageiras sobre a disponibilidade ou aproveitamento do N do fertilizante aplicado no milho.

### CORN NITROGEN FERTILIZER RECOVERY CULTIVATED AFTER FORAGE GRASSES

### Abstract

The N availability to the corn crop can be reduced in rotation systems with grasses of the *Urochloa* genus. Thus, the dose of nitrogen fertilizer to corn grown after these grasses can be high. However, these forage grasses can also affect in the applied N, by fertilizer, reducing their use. Therefore, it is possible to raise the hypothesis that *U. ruziziensis* promotes a lower supply of N for the crop in succession than the other forage grasses, reducing the efficiency of nitrogen fertilization, which would result in the need to use higher doses of N fertilizer. Than, the objective of this study was to verify the N fertilizer recovery by corn grown after 11 months of *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum* cultivation, as well as, the abundance of N from the fertilizer in the various components of the system using the technique tracer with the stable  $^{15}\text{N}$  isotope. An experiment was carried out in a clayey Typic Rhodustult in a randomized block design with three species of forage grasses in four replicates. After

the cultivation of forage grasses, a corn crop with  $140 \text{ kg ha}^{-1}$  of N in the form of  $^{15}\text{N}$ -enriched ammonium sulfate was carried out. No significant differences were observed in N recovery applied by corn. Thus, the fertilizer applied to corn cultivated after *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum* is used with the same efficiency by the corn. It was concluded that the most intense N deficiency for maize grown after *U. ruziziensis* in relation to *U. brizantha* and *P. maximum* can not be attributed to the effect of forage grasses on the availability or utilization of N fertilizer applied to corn.

### 3.1 Introdução

A disponibilidade de N para a cultura do milho pode ser reduzida em sistemas de rotação com *Urochloa ruziziensis* (Marques, 2015), pois foi observada menor taxa de crescimento em plantas de milho cultivadas após *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha*, presença de sintomas típicos de deficiência de N e alta resposta à aplicação de fertilizante nitrogenado. Um dos fatores associados à diminuição da oferta de N em culturas cultivadas após gramíneas do gênero *Urochloa* é a inibição da nitrificação. A inibição da nitrificação foi evidenciada em solo cultivado com *U. humidicola* por Subbarao et al. (2007), e conseqüentemente, foi observado aumento no teor de  $\text{N-NH}_4^+$  em relação ao  $\text{N-NO}_3^-$  em trabalhos posteriores (SUBBARAO et al. 2009; 2013). Conhecendo esse mecanismo de inibição da nitrificação, Byrnes et al. (2017) testaram com sucesso a *U. humidicola* e um híbrido chamado Mulato (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandú) para inibir a nitrificação do  $\text{N-NH}_4^+$  proveniente da urina de bovinos, o que resultou em menor perda de N por desnitrificação. Entretanto, Castoldi et al. (2013) não constataram aumento do teor  $\text{N-NH}_4^+$  em relação ao  $\text{N-NO}_3^-$  com o cultivo de *U. humidicola*. Por outro lado, mecanismos que promovem a inibição da nitrificação ainda não foram reportados.

Para a maioria das plantas, o  $\text{N-NO}_3^-$  é absorvido predominantemente em relação ao  $\text{N-NH}_4^+$ , sendo assim também para a cultura do milho (NORTON, 2000). Essa resposta poderia estar associada somente ao fato do  $\text{N-NH}_4^+$  estar adsorvido as cargas da CTC ou pelo rápido processo de nitrificação, tornando o  $\text{N-NO}_3^-$  mais acessível (TROEH E THOMPSON, 2007). Entretanto, Heinrich et al., (2006) avaliaram a predominância de absorção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  nas culturas do milho, soja e arroz, não observando diferenças de absorção quando há equilíbrio entre as formas de N-mineral. Já Meurer (2007) afirma que alguns híbridos de milho absorvem predominantemente formas amoniacais, incrementando a produtividade de grãos quando essa forma de N está em maior disponibilidade.

Por outro lado, a imobilização de N pode ocorrer no solo, no período inicial de desenvolvimento do milho cultivado após gramíneas forrageiras, devido à alta relação C/N de gramíneas do gênero *Urochloa*. O sistema radicular das gramíneas forrageiras é resistente à degradação, e pode fazer com que os microrganismos consumam o N do solo ou do fertilizante, competindo com a planta em desenvolvimento pelo N-mineral disponível (ROSOLEM et al., 2012). Couto-Vázquez & González-Prieto (2016) afirmam que a imobilização do N aplicado pode ocorrer no início do desenvolvimento do milho após uma gramínea forrageira, em seu estudo o azevém (*Lolium multiflorum*), o que diminui a eficiência de uso do N. Assim, pode-se também esperar que essa resposta possa ser diferente entre as espécies de gramíneas forrageiras que antecedem o milho, tendo efeito não somente pela competição por N, mas por exsudados das raízes. Há ainda a possibilidade de efeitos alelopáticos das gramíneas, como foi demonstrado para algumas culturas (SOUZA et al. 2006; SOUZA et al., 2014), sendo que, neste caso, a aplicação de fertilizante nitrogenado não consegue recuperar a diminuição da produtividade causada pela rotação com a gramíneas forrageiras (ROSOLEM et al., 2012). Dessa forma, podem ocorrer diferenças na recuperação do N do fertilizante pelas culturas cultivadas após gramíneas forrageiras.

O N proveniente da fração orgânica do solo tem papel fundamental no fornecimento de N no sistema de produção. Entretanto, se a espécie utilizada promover a diminuição da nitrificação, a disponibilidade de N proveniente da fração orgânica será reduzida, e a resposta à adubação pode ser aumentada. De fato, Zhao et al. (2016) observaram que a adubação com N proveniente de uma fonte orgânica aumentou a resposta e eficiência de uso do N em relação aplicação somente de N de fonte mineral. Assim, a escolha da gramínea forrageira adequada, que produza matéria seca em quantidade e qualidade suficiente para a sustentabilidade do sistema é fundamental, mas o conhecimento de sua influência na dinâmica do N é importante, pois pode determinar a economicidade do sistema e os riscos ambientais de perda de N.

Diante disso, pode-se levantar a hipótese de que a *U. ruziziensis* promove menor oferta de N para a cultura em sucessão em relação à outras gramíneas forrageiras, diminuindo a eficiência da adubação nitrogenada, o que resultaria na necessidade de uso de maiores doses do fertilizante. Assim, objetivou-se verificar a recuperação do N do fertilizante pelo milho cultivado após 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*,

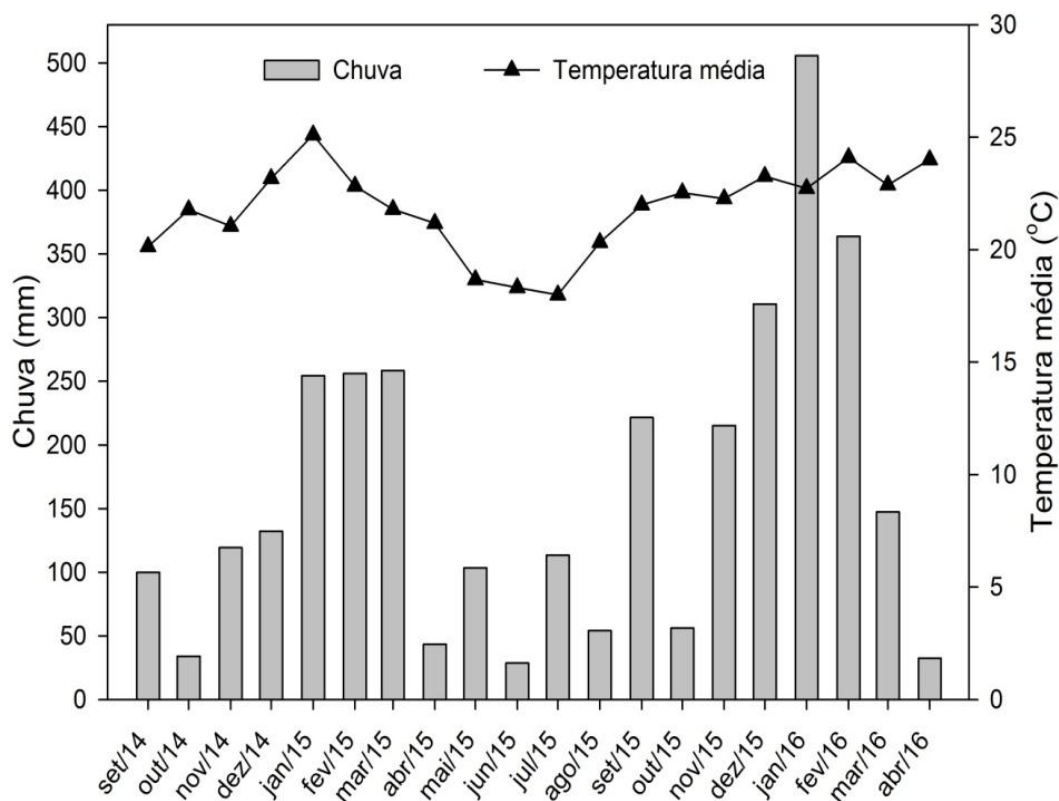
*U. brizantha* e *P. maximum*, bem como a abundância de N proveniente do fertilizante nos diversos componentes do sistema utilizando a técnica de traçador com o isótopo estável  $^{15}\text{N}$ .

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Caracterização da área**

Foi conduzido um experimento de campo em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, 22°49' Latitude Sul e 48° 25' Longitude Oeste de Greenwich, com altitude média de 770 metros. O solo da área é classificado como Nitossolo Vermelho distroférico estruturado (EMBRAPA, 1999), ou Typic Rhodustult (USDA, 2010), de textura muito argilosa, com 626 g kg<sup>-1</sup> de argila, com menos de 3% de declividade. A área estava há quatro anos sem cultivo, recoberta por plantas espontâneas, predominando plantas daninhas gramíneas. O clima é Cwa, pela classificação de Köppen, subtropical úmido, com precipitação média anual de 1400 mm, temperatura média do mês mais quente superior a 22°C e do mês mais frio entre 3 e 18°C. Os dados climáticos obtidos durante o experimento foram adquiridos por meio de uma estação meteorológica localizada a cerca de 500 m da área experimental (Figura 9).

**Figura 9 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*) e do milho em sucessão.**



Antes da instalação do experimento foi realizada amostragem de solo na camada de 0,00-0,20 m de profundidade para caracterização química de rotina da área (Tabela 9). O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado de acordo com método descrito por Walkley and Black (1934) e o pH em solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (CaCl<sub>2</sub>) foi determinado com auxílio de potenciômetro digital (RAIJ et al., 2001). O teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado por destilação conforme descrito por Keeney & Nelson (1982). A acidez potencial a pH 7,0 (H+Al) foi determinada de acordo com Raij et al. (2001). O teor de fósforo (P), cálcio (Ca<sup>+2</sup>), magnésio (Mg<sup>+2</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) trocáveis foram extraídas com resina trocadora de íons (Raij et al., 1986). A concentração de P foi determinada em espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão) e os teores de Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e K<sup>+</sup> foram determinados utilizando espectrômetro de absorção atômica modelo AAS7000 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão).

**Tabela 9 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,0 – 0,20 m de profundidade.**

MO	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P (resina)	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H+Al	V
g dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	-----	mg kg <sup>-1</sup>	-----	-----	mmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	-----		%
20	5,9	5,4	6,3	1	1,2	34	23	37	60

MO= Matéria orgânica; V = Saturação por Bases.

### 3.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com três espécies de gramíneas forrageiras, com quatro repetições. Foram utilizadas as espécies: braquiária ruzizensis cv. Comum (*Urochloa ruzizensis*), braquiária brizanta cv. Marandú (*Urochloa brizantha*) e capim colômbio cv. Tanzânia (*Panicum maximum*). Após o cultivo das gramíneas forrageiras foi conduzido um cultivo de milho.

### 3.2.3 Instalação e condução do experimento

A área do experimento foi previamente dessecada com pulverização de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato com 720 g kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i. a.). A semeadura das gramíneas forrageiras ocorreu no dia 22 outubro de 2014 com uma semeadora de fluxo contínuo da marca Semeato modelo Personale Drill 21. As gramíneas forrageiras foram semeadas sem adubação, em semeadura direta, com densidade de 10 kg ha<sup>-1</sup> de sementes viáveis, considerando 500 pontos de valor cultural ha<sup>-1</sup> e valor cultural de 50%. O espaçamento utilizado foi de 0,2 m entre fileiras. As parcelas tinham dimensões de 9,0 x 20,0 m totalizando 180 m<sup>2</sup>.

As gramíneas forrageiras permaneceram na área por 11 meses, e após esse período foram dessecadas para a implantação da cultura do milho. Para dessecação foi utilizado 4,0 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.), no dia 08/10/2015, e após uma semana desta aplicação, realizou-se a aplicação de 3,0 L ha<sup>-1</sup> de paraquat (200 g L<sup>-1</sup> i. a.) + diuron (100 g L<sup>-1</sup> i. a.). Na dessecação foi utilizado também 0,15 L ha<sup>-1</sup> de lambda-cialotrina (50 g L<sup>-1</sup> i. a.) + clorantraniliprole (100 g L<sup>-1</sup> i. a.) com objetivo de evitar alta população de lagartas.

A semeadura do milho foi realizada em semeadura direta no dia 26/10/2015, utilizando o híbrido simples 2B810 da empresa Dow Agrosiences. O espaçamento utilizado foi 0,75 m entre linhas e a população de plantas foi de 65.000 plantas ha<sup>-1</sup>, conforme recomendada pelo obtentor. Foi semeado em parcelas contendo dimensões de 4,5 x 10 m totalizando 45 m<sup>2</sup>. A adubação utilizada foi de 120 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> e 120 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup>, com cloreto de potássio e superfosfato triplo, respectivamente, aplicados no sulco de semeadura. A dose de fertilizante foi calculada em função da análise inicial do solo e com o objetivo de alcançar a produtividade de grãos de 13.000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, de acordo com a recomendação do estado de São Paulo (RAIJ et al., 1996).

Dentro da parcela de milho de 45 m<sup>2</sup> foi delimitada a microparcela para aplicação do fertilizante marcado com <sup>15</sup>N. Foram demarcadas três linhas de milho de 1,5 m de comprimento, totalizando uma área de 3,375 m<sup>2</sup>. Assim, cada microparcela possuía dimensões de 1,5 x 2,25 m, dado o espaçamento entre fileiras de 0,75 m.

Os tratos culturais referentes ao controle de plantas daninhas, pragas e doenças foram realizados mediante monitoramento. Aos 10 e 16 dias após a semeadura (DAS) foi aplicado 0,3 L ha<sup>-1</sup> de tiametoxam (141 g L<sup>-1</sup> i. a.) + lambda-cialotrina (106 g L<sup>-1</sup> i. a.) para o controle de percevejos, sendo que na segunda aplicação, 2,0 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.) foi aplicado para controle de plantas daninhas. Aos 35 DAS foram aplicados 1,2 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.), 0,3 L ha<sup>-1</sup> de tiametoxam (141 g L<sup>-1</sup> i. a.) + lambda-cialotrina (106 g L<sup>-1</sup> i. a.), 0,3 L ha<sup>-1</sup> de azoxistrobina (200 g L<sup>-1</sup> i. a.) + ciproconazol (80 g L<sup>-1</sup> i. a.) e 0,4 L ha<sup>-1</sup> de lufenuron (50 g L<sup>-1</sup> i. a.), visando o controle de plantas daninhas, percevejos, doenças e lagarta, respectivamente. Todas as aplicações ocorreram juntamente com 0,6 L ha<sup>-1</sup> de adjuvante composto por óleo mineral (756 g L<sup>-1</sup>) para melhor distribuição dos produtos. O volume de calda aplicada em todas as pulverizações foi de 200 L ha<sup>-1</sup>, aplicado com auxílio de trator e pulverizador montado.

O pleno florescimento do milho, estágio VT (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 08/01/2016, 74 dias após a semeadura. A maturação fisiológica, estágio R6 (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 25/02/2016 e a colheita no dia 07/03/2016, 122 e 133 dias após a semeadura, respectivamente.



### 3.2.4 Produção e aplicação do sulfato de amônio enriquecido com $^{15}\text{N}$

Sulfato de amônio enriquecido com isótopo estável de nitrogênio  $^{15}\text{N}$  foi utilizado como fonte nitrogenada. O fertilizante foi produzido a partir da diluição de sulfato de amônio com 67% de seus átomos de N compostos por  $^{15}\text{N}$  em sulfato de amônio com alto grau de pureza. O produto ao final da diluição continha enriquecimento de 4,85% de isótopos de  $^{15}\text{N}$  do total dos átomos de N.

A dose de N aplicada foi de  $140 \text{ kg ha}^{-1}$ , sendo aplicados  $30 \text{ kg ha}^{-1}$  de N na semeadura e  $110 \text{ kg ha}^{-1}$  de N em cobertura. O sulfato de amônio enriquecido com  $^{15}\text{N}$  foi aplicado superficialmente de forma localizada em toda extensão da linha de semeadura imediatamente após a semeadura. Aos 25 DAS, no estágio vegetativo com quatro a cinco folhas completamente expandidas (V4-V5) (RITCHIE & HANWAY, 1986), aplicação foi realizada a lanço concentrada sobre o solo, 0,02 m ao lado da linha de semeadura.

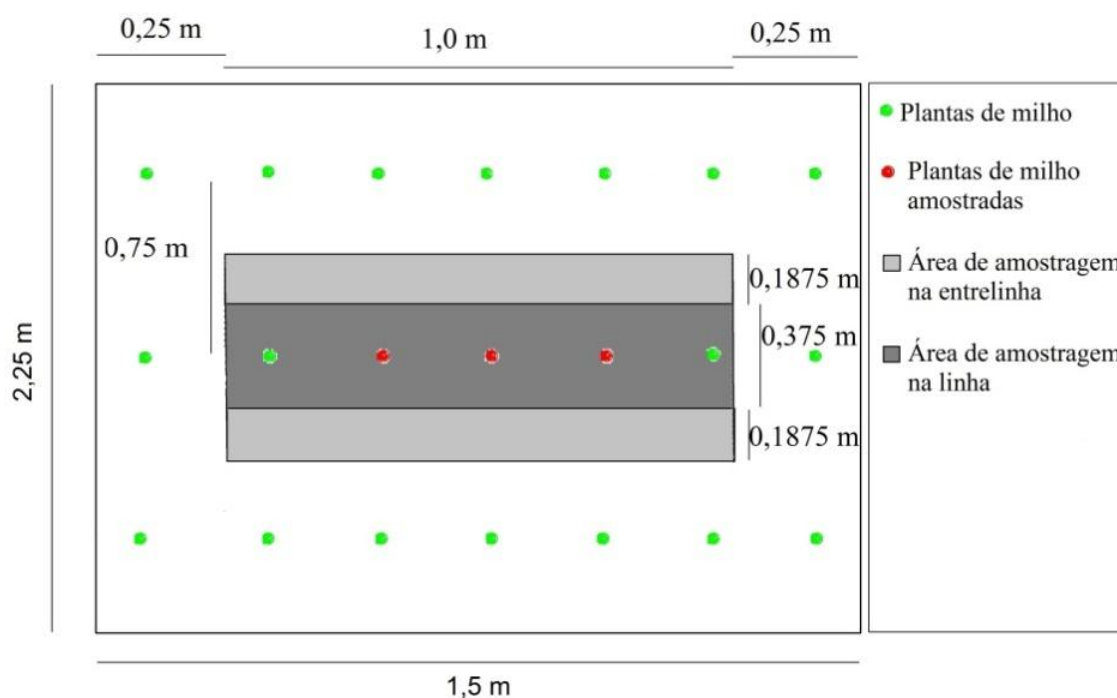
### 3.2.5 Amostragem de solo, palha das gramíneas forrageiras e de plantas de milho

No estágio de maturação fisiológica do milho (R6) (RITCHIE & HANWAY, 1986) foram realizadas amostragens de solo, de plantas de milho e da palha das forrageiras sobre o solo para análise de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  no sistema de produção. A amostragem de plantas de milho foi realizada cortando-se três plantas de milho no centro da linha central da microparcela com adição de sulfato de amônio enriquecido com  $^{15}\text{N}$  desprezando-se bordadura de 0,25 m em cada extremidade da linha (Figura 10). As plantas foram cortadas imediatamente acima da inserção das raízes adventícias. A planta foi fracionada em folhas, colmo + pendão, palha da espiga + sabugo e grãos, totalizando quatro partes. Das folhas foram destacadas somente a lâmina foliar, sendo que a bainha ficou junto à fração colmo. As frações das plantas foram pré-picadas e secas em estufa de circulação de ar forçado a  $60^\circ\text{C}$ . Após secas mediu-se a massa de matéria seca, foram trituradas até obter diâmetro  $\leq 1,0 \text{ cm}$ . Uma subamostra homogênea seguiu para ser moída em moinho Willey para se obter diâmetro  $\leq 1,0 \text{ mm}$ .

A amostragem de palha das forrageiras e de solo foi realizada na linha e na entrelinha, tendo a linha central da microparcela com  $^{15}\text{N}$  como centro das

amostragens (Figura 41). Na linha, a palha das gramíneas forrageiras foi amostrada numa faixa de 0,375 m de largura, tendo a linha de milho central como centro desta faixa, por 1,0 m de comprimento no sentido da linha. A amostragem na entrelinha foi composta por duas faixas, que também possuíram 1,0 m de comprimento no sentido da linha e largura de 0,1875 m contando a partir do fim da faixa da linha até o centro da entrelinha em ambos os lados da linha central. Juntas as faixas da entrelinha continham a mesma área da faixa da linha. Toda palha que cobre a área da linha e da entrelinha foi coletada, pesada e uma subamostra seguiu para secagem a 60 °C em estufa com circulação de ar forçada. O restante da palha foi devolvido sobre o solo no local de origem. Após secas as amostras foram pesadas para correção de umidade e moídas em moinho Willey para se obter diâmetro  $\leq 1,0$  mm.

**Figura 10 – Representação da microparcela utilizada para aplicação de sulfato de amônio enriquecido com  $^{15}\text{N}$ , áreas de amostragem de solo, palha e plantas de milho.**



A amostragem de solo foi realizada nas camadas de 0,0–0,10, 0,10–0,20 e 0,20–0,40 m de profundidade. Foram coletadas amostras deformadas para análise química de N e amostras indeformadas (anéis volumétricos) para estimar a densidade do solo. Foram amostrados dois pontos sobre o centro da linha central da microparcela, que compuseram a amostra da linha. A amostra da entrelinha foi composta por dois pontos de amostragem, sendo um ponto à direita e outra à

esquerda da linha central, no centro das faixas que compõe a entrelinha. As amostras foram coletadas com auxílio de amostrador tipo caneco de uma pOLEDada de diâmetro. As amostras foram secas a 40 °C em estufa de circulação forçada de ar, destorroadas, peneiradas em malha 2 mm e moídas em moinho de bolas. Os anéis foram secos a 100 °C e a densidade do solo medida para determinação da diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  no solo.

As amostras de planta, palha e solo, após preparadas, foram acondicionadas em frascos plásticos e seguiram para o Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo (CENA-USP). Uma alíquota de 250 µg de cada amostra foi utilizada para medir a abundância de isótopos de  $^{15}\text{N}$  nas amostras, determinada com auxílio de um espectrômetro de massa modelo ANCA-SL 20-20, da Europa Scientific Ltda, UK (BARRIE & PROSSER, 1996).

### 3.2.6 Nitrogênio no solo e planta

Foram gerados dados referentes à porcentagem de isótopos  $^{15}\text{N}$  e porcentagem de N total nas amostras de solo e material vegetal. A partir desse resultado pode-se calcular a porcentagem de nitrogênio no solo (NSPF (%)) e na planta (NPPF (%)), milho e forrageiras, proveniente do fertilizante, conforme equação 1 e 2, respectivamente:

$$(1) \quad NSPF (\%) = \frac{\%^{15}\text{N amostra} - \%^{15}\text{N Abundância Natural}}{\%^{15}\text{N fertilizante} - \%^{15}\text{N Abundância Natural}} \times 100$$

$$(2) \quad NPPF (\%) = \frac{\%^{15}\text{N amostra} - \%^{15}\text{N Abundância Natural}}{\%^{15}\text{N fertilizante} - \%^{15}\text{N Abundância Natural}} \times 100$$

O nitrogênio total no solo (NTS) foi calculado a partir da quantidade de solo (QS) em cada camada amostrada. A quantidade de solo foi calculada de acordo com a densidade do solo multiplicado pela espessura da camada amostrada. O NTS foi calculado de acordo com a equação 3:

$$(3) \quad NTS (kg ha^{-1}) = \frac{\% N total}{100} \times QS$$

Os dados de matéria seca total (MST) de palha das gramíneas forrageiras e das frações do milho foram utilizados para determinar o nitrogênio total na planta, ou na fração da planta (NTP) em  $\text{kg ha}^{-1}$ . O NTP é calculado dada a equação 4:

$$(4) \quad NTP (\text{kg ha}^{-1}) = \frac{\% N \text{ total}}{100} \times MS$$

Com os dados de NPPF (%) e NSPF (%) foi calculado a quantidade de N proveniente do fertilizante, no solo (NSPF) e na planta (NPPF) em  $\text{kg ha}^{-1}$ , conforme as equações 5 e 6, respectivamente:

$$(5) \quad NSPF (\text{kg ha}^{-1}) = \frac{NSPF (\%)}{100} \times NTP$$

$$(6) \quad NPPF (\text{kg ha}^{-1}) = \frac{NPPF (\%)}{100} \times NTP$$

A eficiência de uso do nitrogênio pela planta (EUN) e o N residual no solo (NRS), proveniente do fertilizante, é calculado a partir do NPPF e NSPF em função da dose de N aplicado, conforme as equações 7 e 8, respectivamente:

$$(7) \quad NRS (\%) = \frac{NPPF (\text{kg ha}^{-1})}{Dose} \times 100$$

$$(8) \quad EUN (\%) = \frac{NPPF (\text{kg ha}^{-1})}{Dose} \times 100$$

### 3.2.7 Análise estatística

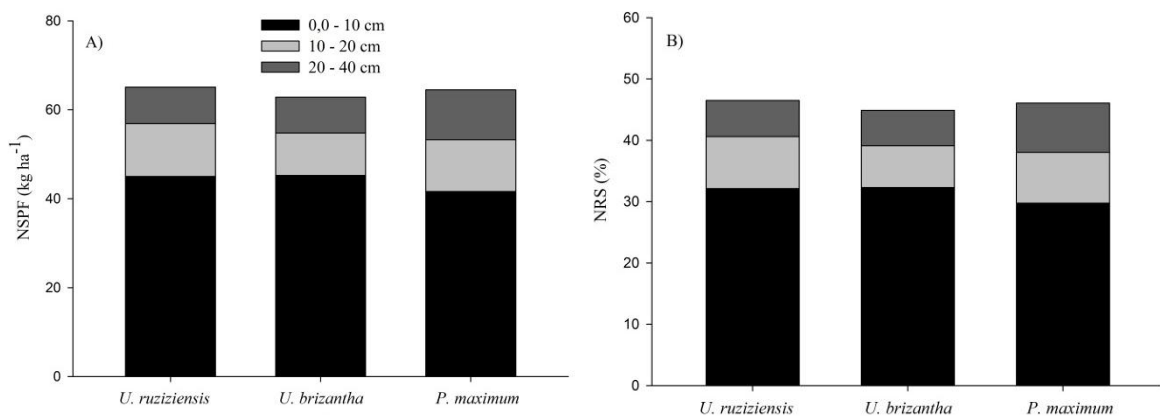
Os resultados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância (teste de Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilk). Atendidos estes pressupostos, os dados seguiram para análise de variância pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Ocorrendo significância as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS 9.2.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Nitrogênio residual no solo proveniente do fertilizante

O N do sulfato de amônio aplicado ao milho foi encontrado em maior quantidade nos primeiros 0,10 m de profundidade do solo (Figura 11A). Não foram observadas diferenças no acúmulo de N no solo proveniente do fertilizante após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*. Na superfície, até 0,10 m de profundidade, o acúmulo de N proveniente do fertilizante foi de 43 kg ha<sup>-1</sup>. Nas camadas de 0,10–0,20 e 0,20–0,40 m de profundidade acumularam-se 10 e 9 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente. Até 0,40 m de profundidade, dos 140 kg ha<sup>-1</sup> do N aplicado, cerca de 60 a 70 kg ha<sup>-1</sup> permaneceram no solo, o que representa em torno de 40 a 50% do N aplicado (Figura 11B). Destes, em torno de 30% ficaram localizados na camada de 0,10 m. Nas camadas de 0,10–0,20 e 0,20–0,40 m de profundidades foram acumulados em média 7 e 6% do N aplicado, respectivamente.

**Figura 11 – Nitrogênio no solo proveniente do fertilizante (NSPF) (A) e nitrogênio residual no solo (NRS) (B) no estágio de maturação fisiológica do milho cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*.**



#### 3.3.2 Nitrogênio na palha das forrageiras proveniente do fertilizante

A quantidade e a porcentagem de N na palha das forrageiras proveniente do fertilizante foi pequena (Tabela 10). Apenas 5 kg ha<sup>-1</sup> de N proveniente do fertilizante foi encontrado no material vegetal da *U. ruziziensis*. Isso representa pouco mais de

3% do N aplicado. Resultado semelhante foi observado na matéria seca de *P. maximum*. A *U. brizantha* acumulou quase 7 kg ha<sup>-1</sup> de N em sua palhada. Esse montante representa quase 5% do N aplicado. Entretanto não foi observada diferença significativa.

**Tabela 10 – Nitrogênio na palha das forrageiras proveniente do fertilizante (NPFPPF) e porcentagem do nitrogênio na palha das forrageiras proveniente do fertilizante (PNPFPPF) após o cultivo de milho.**

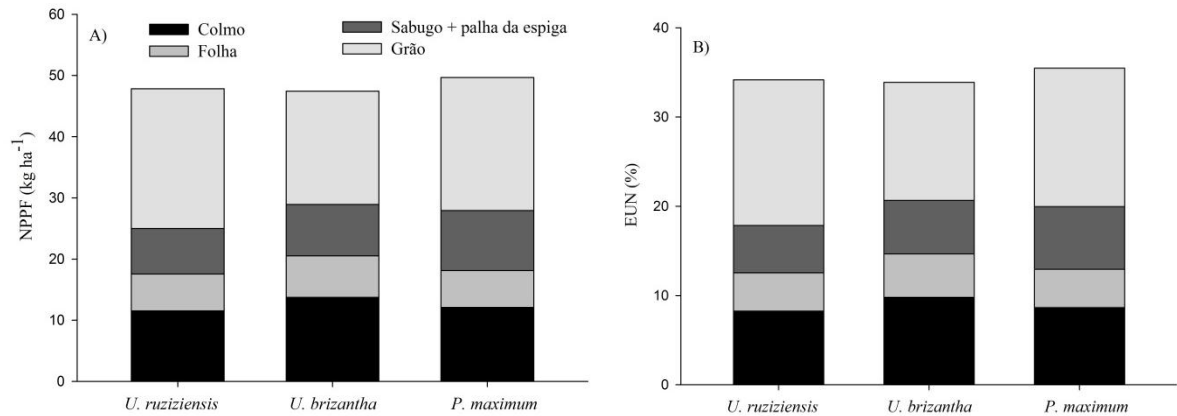
	<i>U.</i> <i>ruziziensis</i>	<i>U.</i> <i>brizantha</i>	<i>P.</i> <i>maximum</i>	DMS*
NPFPPF (kg ha <sup>-1</sup> ) 1)	5,08	6,70	4,98	1,79
PNPFPPF (%)	3,63	4,78	3,55	1,28

\*Diferença mínima significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.3 Recuperação do nitrogênio proveniente do fertilizante pelo milho

O milho absorveu em média 48,3 kg ha<sup>-1</sup> de N (Figura 12A), que representa 34,5% do N aplicado (Figura 12B), sendo que a maior quantidade do N proveniente do fertilizante foi encontrada nos grãos. Entretanto, nenhuma das frações da planta e nem a soma destas apresentaram diferença significativa em função das espécies forrageiras. O colmo do milho acumulou grande parte do N proveniente do fertilizante em relação às folhas e ao sabugo + palha da espiga. O colmo acumulou em média 12 kg ha<sup>-1</sup> de N, 8,9% do N aplicado. As folhas e o sabugo + palha da espiga acumularam em média 6 e 8 kg ha<sup>-1</sup> de N, representando 4 e 6%, respectivamente. Os grãos acumularam 15% do N aplicado, sendo quase a metade de todo N na planta proveniente do fertilizante.

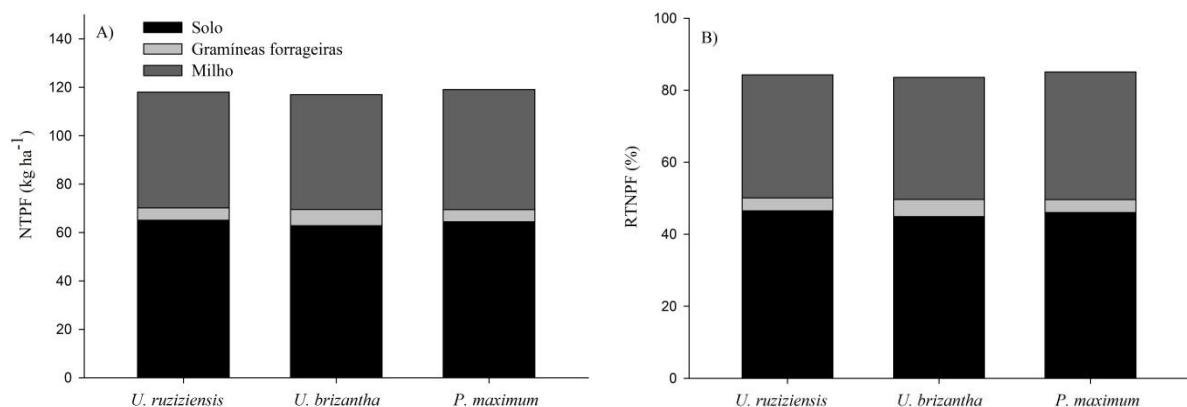
**Figura 12 – Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) (A) e eficiência de uso do nitrogênio (EUN) (B) pelo colmo, folha, sabugo + palha da espiga e grãos de milho cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*.**



### 3.3.4 Nitrogênio no solo, palha e no milho proveniente do fertilizante

A soma do <sup>15</sup>N recuperado no solo, na palha das gramíneas forrageiras e recuperado pelo milho, proveniente do fertilizante, foi em média de 84% (Figura 13B). Entretanto, não houve diferença significativa entre as espécies de forrageiras. O solo acumulou em média 64 kg ha<sup>-1</sup> de N, as gramíneas 5 kg ha<sup>-1</sup> de N e o milho 48 kg ha<sup>-1</sup> de N (Figura 13A), que representam 45, 4 e 35% do N aplicado, respectivamente.

**Figura 13 – Nitrogênio total proveniente do fertilizante (NTPF) (A) e recuperação total do nitrogênio proveniente do fertilizante (RTNPF) (B) pelo solo, gramíneas forrageiras e milho.**



### 3.4 Discussão

#### 3.4.1 Nitrogênio residual no solo e na palha das gramíneas forrageiras proveniente do fertilizante

Maior acúmulo de N proveniente do fertilizante nos primeiros 0,10 m de profundidade do solo era esperado, uma vez que o fertilizante foi aplicado na superfície do solo. Mas cerca de 20 kg ha<sup>-1</sup> de N proveniente do fertilizante foi encontrado na camada de 0,10 – 0,40 m de profundidade, apesar do solo ter textura argilosa que diminui a velocidade de descida do nutriente no perfil do solo. Dessa forma, as raízes do milho tiveram que explorar o solo além dos primeiros 0,1 m de profundidade para buscar N. Este fator poderia estar associado com a ocorrência de alta precipitação, principalmente no mês de janeiro de 2016, quando a chuva acumulada foi de aproximadamente 500 mm (Figura 9). Dynia et al. (2006) observaram que grande parte do N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> proveniente de lodo de esgoto aplicado em solo de textura argilosa foi encontrado abaixo de 0,60 m de profundidade, carregado pela água da chuva. Entretanto no presente trabalho esse efeito não foi observado, já que foi observada a perda de no máximo 0,54 kg ha<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> lixiviado abaixo de 0,8 m de profundidade em todo ciclo das forrageiras e do milho (Capítulo 1). Coelho et al. (1991) também observaram perda muito pequena de N, cerca de 4% do N aplicado, por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> proveniente da aplicação de fertilizante nitrogenado à cultura do milho.

A disponibilidade de N proveniente do fertilizante no milho não foi afetada pelas gramíneas forrageiras cultivadas antes do milho. Isso indica que as gramíneas forrageiras testadas não diminuem, ou diminuem na mesma proporção a disponibilidade de N proveniente do fertilizante. Entretanto, Byrnes et al. (2017) constataram que ao utilizar *U. humidicola* e um híbrido chamado Mulato (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandú) perdas de N por desnitrificação foram menores devido à inibição da nitrificação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> proveniente da urina de bovinos. Apesar da urina de bovinos não ser uma fonte fertilizante utilizada, a forma de entrada de N no sistema foi amoniacal, o que poderia ter se repetido no presente trabalho.

A aplicação do fertilizante foi realizada superficialmente tendo contato com a palha das gramíneas forrageiras na superfície do solo. Assim foi possível encontrar



N proveniente do fertilizante na palha das gramíneas forrageiras ao final do ciclo de milho. Entretanto, esse N poderá ser recuperado em próximos cultivos, assim como a recuperação de N em sistema de rotação de azevém (*Lolium multiflorum*) com milho foi observada por Couto-Vázquez & González-Prieto (2016). Esses autores reportaram ainda que parte do N aplicado foi imobilizado em função da alta relação C/N do azevém. Já Silva et al. (2008) observaram aproveitamento satisfatório do N proveniente de culturas de cobertura pelo milho em sucessão, como a crotalária e o milheto, sendo consideradas importantes fontes de N para o milho em sucessão neste caso.

Apesar das gramíneas forrageiras estarem mortas quando o fertilizante foi aplicado, tanto na semeadura como em cobertura, os microrganismos que consomem o N do fertilizante também consomem o carbono do material vegetal. Assim, parte do N proveniente do fertilizante foi encontrado nos resíduos das gramíneas forrageiras. Entretanto a quantidade foi pequena, menos de 5%, indicando que esse enriquecimento foi pequeno e que os microrganismos responsáveis pela degradação do material vegetal na superfície do solo buscaram uma fonte mais abundante em N. Rosolem et al. (2012) constataram que apenas 14% das raízes de *U. ruziziensis* haviam sido degradadas 45 dias após a dessecação, indicando que a alta relação C/N desse material diminui a atividade microbiana sobre a matéria seca de raízes da espécie. Entretanto, a parte aérea das plantas normalmente tem menor relação C/N em relação às raízes, mas no caso deste estudo, onde a oferta de N era muito restrita, com apenas 5,4 e 6,3 mg kg<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente, no início do experimento (Tabela 9) e sem adição de N às forrageiras, o uso de N proveniente do solo pelos microrganismos e a fixação de N são mais intensos.

### **3.4.2 Recuperação do nitrogênio proveniente do fertilizante pelo milho**

As quantidades de N proveniente do fertilizante acumulado nos grãos de milho e nas frações da planta não foram diferentes entre as espécies de forrageiras. De forma geral o milho recuperou 35% do N aplicado, sendo que desse montante, metade foi alocado nos grãos. Silva et al. (2006) observaram também, que em média 57% do N absorvido pelo milho, proveniente do fertilizante, foi alocado nos grãos. Dessa forma, pode-se concluir que esse é um comportamento padrão para a

cultura do milho em realocação de N nos grãos, e que essa distribuição do N na planta não é afetada pelas forrageiras cultivadas antes do milho.

As demais frações da planta de milho, independente de variações na quantidade de N no tecido, terão parte do N do tecido retornado ao sistema, ao ser decomposto ao longo do tempo, perdido ou ainda na estrutura do material vegetal dos restos culturais, sendo estes processos dependentes das condições climáticas de temperatura e umidade e teor de N do resíduo. O sabugo, por exemplo, acumulou quase 10 kg ha<sup>-1</sup> de N (6%), sendo que seu acúmulo de matéria seca é pequeno em relação às demais frações da planta. Assim, esta fração provavelmente terá maior contribuição no retorno do N ao solo (COELHO et al., 1991). Entretanto, o sabugo necessita de prévia diminuição em sua granulometria para ação mais efetiva dos microrganismos que decompõem este material.

A ausência de diferença significativa do efeito das gramíneas forrageiras na recuperação do N proveniente do fertilizante demonstra que estas não atuam na disponibilidade de N de fonte mineral. Apesar disso, a literatura vem mostrando menor produtividade de grãos de milho cultivado após *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha* (MARQUES, 2015), que também ocorreu no presente trabalho (Capítulo 4). Essa menor produtividade deve estar associada à disponibilidade de N proveniente da fonte orgânica do solo, que necessita mineralização. Silva et al. (2006) também observaram alta dependência do milho pelo N proveniente de fontes orgânicas, além da mineral. Estes autores concluem ainda afirmando que o N é fornecido pelo solo ou pela FBN. Outro fator que ainda pode ter contribuído para a recuperação de apenas 35% do N aplicado, foi a ausência de quantificação do N nas raízes de milho. Entretanto a literatura aborda acúmulo de apenas 2% de N proveniente do fertilizante nas raízes, o que mudaria pouco a resposta de recuperação de N deste trabalho.

A diferença de produtividade do milho após *U. ruziziensis* em relação à *U. brizantha*, dada a ausência de efeito sobre a fonte mineral de N adicionada ao solo, comprova também, ausência de efeito alelopático das gramíneas forrageiras sobre o milho. Pois se houvesse efeito alelopático atuando sobre o desenvolvimento do milho, o aproveitamento do fertilizante seria diferente para as espécies de gramíneas. Entretanto, Souza et al. (2014) afirmam que a *U. ruziziensis* pode promover efeito alelopático sobre a cultura do feijoeiro, entretanto sem comparar

com o efeito de outras forrageiras. Já Souza et al. (2006) observaram a diminuição na oferta de  $\text{N-NO}_3^-$  no solo quando houve cultivo e incorporação de *U. decumbens*.

A utilização pelo milho de apenas 35% do N aplicado mostra que a dependência do N proveniente do solo foi alta, que corroboram com resultados reportado por Silva et al. (2006), que observaram dependência de 77% do N proviente do solo ou de outra fonte alternativa, como a FBN. Entretanto, o presente trabalho foi conduzido em ambiente de alta resposta a N (Tabela 9), o que deveria aumentar a eficiência de uso do N aplicado, já que foi alcançada a produtividade média de  $10.300 \text{ kg ha}^{-1}$  (Capítulo 4). Por outro lado, a dose de  $140 \text{ kg ha}^{-1}$  de N pode não ter sido suficiente para expressar o máximo potencial produtivo do milho, embora Fernandes e Libardi (2012) tenham observado que o melhor aproveitamento de N pelo milho adubado com sulfato de amônio foi com a dose de  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de N.

### **3.4.3 Recuperação do nitrogênio proveniente do fertilizante no solo, palha das gramíneas forrageiras e milho**

Trivelin et al. (2002) e Vitti et al. (2007) relataram que cerca de 70 a 90% do N aplicado é recuperado quando se soma as quantidades no solo, palha sobre o solo e na planta cultivada. Desta forma, esperava-se que algum efeito pudesse ser constatado de interferências das gramíneas forrageiras sobre a disponibilidade de N proveniente do fertilizante para a cultura do milho. Entretanto esse efeito sobre a disponibilidade de N não foi observado, sendo o N aplicado recuperado nas mesmas proporções, seja no solo, na palha das gramíneas forrageiras e no milho. Coelho et al (1991) recuperaram 79% do N aplicado no solo e nas plantas de milho, considerando que 15% foi perdido por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ . Entretanto, no presente trabalho, que recuperou no solo, palha e no milho 83% do N do fertilizante, essa perda foi menos intensa, uma vez que apenas  $0,54 \text{ kg ha}^{-1}$  de N foi perdida por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ . Assim, espera-se ainda que abaixo de 0,4 m de profundidade exista algum resíduo de N proveniente do fertilizante, uma vez que este foi estimado somente nesta camada.

O N contido nos resíduos de milho que permaneceram no campo, mesmo com pouco N proveniente do fertilizante, pode ser reabsorvido em cultivos posteriores. Silva et al. (2008) observaram que o milho cultivado sobre palha também de milho pode recuperar cerca de 4,1% do N aplicado inicialmente. Entretanto, ainda segundo

estes autores, quando o resíduo que antecedeu o milho foi crotalária ou milheto o aproveitamento do N proveniente do fertilizante é maior. Assim, o N residual pode ser importante chave para compreender os processos da dinâmica do N no solo e suas relações com as espécies que compõem o esquema de rotações.

Foi observado que a maior parte do N aplicado ficou concentrada no solo e que o N proveniente do fertilizante na cultura do milho foi apenas 35%. Vázquez & González-Prieto (2016) também observaram maior parte do N aplicado via fertilizante concentrando-se no solo em sistema de rotação de azevém (*Lolium multiflorum*) com milho. Dessa forma, a interferência que as gramíneas forrageiras possam realizar sobre a disponibilidade de N proveniente do solo tende a ser muito mais expressiva.

De forma geral, a diminuição da disponibilidade de N para as culturas em sucessão a *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha* pode estar associada a diminuição na mineralização do N do solo, embora não se tenha certeza de qual mecanismo está atuando. Neste trabalho foi constatado que a menor disponibilidade de N a cultivos que sucedem a *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* pode ser corrigida com aplicação de fertilizante nitrogenado (Capítulo 4). A correção com adição de fertilizante faz com que a cultura possa expressar seu potencial produtivo, sem diminuição da disponibilidade de N causado pelo cultivo antecessor de algumas destas espécies de gramíneas forrageiras.

### 3.5 Conclusão

O fertilizante aplicado ao milho cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* é utilizado com a mesma eficiência pela cultura do milho.

A carência mais intensa de N para o milho cultivado após *U. ruziziensis* em relação à *U. brizantha* e *P. maximum* não pode ser atribuída ao efeito das gramíneas forrageiras sobre a disponibilidade ou aproveitamento do N do fertilizante aplicado no milho.

### 3.6 Referências

BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-46.

BYRNES, R. C.; NÚÑEZ, J.; ARENAS, L.; RAO, I.; TRUJILLO, C.; ALVAREZ, C.; ARANGO, J.; RASCHE, F.; CHIRINDA, N. Biological nitrification inhibition by Brachiaria grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. **Soil Biology & Biochemistry**, v.107 p.156-163, 2017.

CASTOLDI, G.; REIS, J. G. dos; PIVETTA, L. A.; ROSOLEM, C. A. Soil nitrogen dynamics after brachiaria dissection. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, n.1, p.1620–1627, 2013.

COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; BAHIA, A. F. C.; GUEDES, G. A. A. Balanço de nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) em um latossolo vermelho-escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15, p.187-193, 1991.

COUTO-VÁZQUEZ, A. & GONZÁLEZ-PRIETO, S. J. Fate of  $^{15}\text{N}$ -fertilizers in the soil-plant system of a forage rotation under conservation and plough tillage. **Soil & Tillage Research**, v.161, p.10–18, 2016.

DYNIA, J. F.; SOUZA, M. D. de; BOEIRA R. C. Lixiviação de nitrato em Latossolo cultivado com milho após aplicações sucessivas de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.855-862, 2006.

FERNANDES, F. C. Da S. & LIBARDI, P. L. distribuição do nitrogênio do sulfato de amônio ( $^{15}\text{N}$ ) no sistema solo-planta, em uma sucessão de culturas, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, n.1, p.885–893, 2012.

HEINRICH, R.; GAVA, G. J.; CORAZZA, E. J.; DUETE, R. R. C.; VILLANUEVA, F. C. A.; MURAOKA, T. Forma preferencial de absorção de nitrogênio ( $^{15}\text{NH}_4^+$  ou  $^{15}\text{NO}_3^-$ ) pelas culturas de soja, feijão, arroz e milho. **Científica**, v.34, n.1, p.25-30, 2006.

KEENEY, D. R. & NELSON, D. W. Nitrogen: inorganic forms. In: PAGE AL; MILLER RH; KEENEY DR. 2nd ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, p. 625-642, 1982.

MARQUES, L. M. **Antecipação de nitrogênio para a cultura do milho em sucessão a gramíneas forrageiras no sistema plantio direto**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu, 2015, 47p.

MEURER, E. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.2, p.65-90.

NORTON, J.M. Nitrification. In: SUMMER, M.E., ed. **Handbook of soil science**. Boca Raton, CRC Press, 2000. p.160-181.

RAIJ, B., ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agronômico, Campinas. 2001, 285p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas : Instituto Agronômico, 1996. 285p. (IAC. Boletim técnico, 100).

RAIJ, B., QUAGGIO, J.A., DA SILVA, N.M.Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by anion exchange resin procedure. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.17, p.547-566. 1986.

RITCHIE, S.W. & HANWAY, J. J. **How a corn plant develops**. In: Special report 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames, 1986.

ROSOLEM, C. A.; STEINER, F.; ZOCCA, S. M.; DUCATTI, C. Nitrogen Immobilization by Congo Grass Roots Impairs Cotton Initial Growth. **Journal of Agricultural Science**, v.4, n.9, p.126–136, 2012.

SILVA, E. C. da; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; ESPINAL, F. S. C.; TRIVELIN, P. C. O. Utilização do nitrogênio da palha de milho e de adubos verdes pela cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2853-2861, 2008.

SILVA E. C. da; MURAOKA, T.; BUZETTI, S.; TRIVELIN, P. C. Manejo de nitrogênio no milho sob plantio direto com diferentes plantas de cobertura, em Latossolo Vermelho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.3, p.477-486, 2006.

SOUZA, E. F. C.; FERNANDES, A. M.; SOUZA-SCHLICK, G. D.; ROSOLEM, C. A. Early growth of common bean cropped over ruzigrass residues. **Planta Daninha**, v.32, n.4, p.775-781, 2014.

SOUZA, L. S.; VELLINI, E. D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C. A. Efeito Alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.657–668, 2006.

SUBBARAO, G. V. RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W. L. BIOLOGICAL NITRIFICATION INHIBITION (BNI) – is it a widespread phenomenon? **Plant Soil**, v.294, p.5-18, 2007.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, n.41, p.17302-17307, 2009.

SUBBARAO, G. V; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; SAHRAWAT, K. L.; ANDO, Y.; KAWASHIMA, T. Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification

and N<sub>2</sub>O emissions in pasturecrop-livestock systems. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, v.7, n.2, p.322–332, 2013.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W. DE; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. D.; BENDASSOLLI, J. A. Nitrogen losses of applied urea in the soil-plant system during two sugar cane cycles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.2, p.193–201, 2002.

TROEH, F. R. & THOMPSON, L. M. Nitrogênio. In: ANDREI, E. (Eds). **Solos e Fertilidade dos Solos**. São Paulo, 2007. Cap.11, p.311-342.

USDA, United States Department of Agriculture. **Keys to Soil Taxonomy**, Eleventh Edition, 2010. 338p.

WALKLEY, A., BLACK, I.A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v.37, p.29-38. 1934.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. D. C.; Franco, H. C. J.; Bologna, I. R.; Faroni, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.3, p.491–498, 2007.

ZHOA, W.; LIANG, B.; YANG, X.; GALE, W.; ZHOU, J. Effect of long-term fertilization on <sup>15</sup>N uptake and retention in soil. **Journal of Plant Nutrition**, v.39, n.10, p.1431–1440, 2016.

## CAPÍTULO 4

### PRODUÇÃO E NITROGÊNIO NAS PLANTAS EM SISTEMA DE ROTAÇÃO MILHO COM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS

#### Resumo

O gênero *Urochloa* é o mais cultivado como pastagens no Brasil, principalmente no Cerrado. Este gênero de gramíneas forrageiras tem alta adaptabilidade e potencial de acumular matéria seca em quantidade, mas pode diminuir a produtividade do milho em sucessão pela diminuição da oferta de N, sendo necessário aplicar mais N. O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de matéria seca, teor de N e N acumulado de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* cultivados por 11 meses sem adubação, bem como o desempenho do milho cultivado em sucessão às gramíneas forrageiras com 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N, avaliando produção de matéria seca, teor de N, N-total e a produtividade de grãos. Foi conduzido um experimento em um Nitossolo Vermelho distroférico de textura argilosa em delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, em quatro repetições. Ao final de 11 meses, a *U. brizantha* e o *P. maximum* produzem mais matéria seca em relação a *U. ruziziensis*. A disponibilidade de N no solo é afetada pelo cultivo de gramíneas forrageiras, sendo que a *U. ruziziensis* resulta em menor disponibilidade de N em relação à *U. brizantha* e o *P. maximum*. Em função da menor disponibilidade de N, a produtividade de milho é menor quando cultivado após *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*. A aplicação de N aumenta a oferta de N no sistema, e pode evitar as perdas de produtividade do milho em rotação com gramíneas forrageiras.

### PLANTS NITROGEN AND YIELD IN FORAGE-CORN ROTATIONS

#### Abstract

The *Urochloa* genus is the most cultivated as pasture in Brazil, mainly in the Cerrado. This genus of forage grasses has a high adaptability and potential to accumulate dry matter in quantity, but it can decrease corn productivity in succession because decrease the N supply, and it is necessary to apply more N. The objective of this work was to evaluate the dry matter production, N content and accumulated by *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum* cultivated for 11 months without fertilization, as well as, the performance of maize grown in succession to forage grasses with 0, 70, 140 and 210 kg ha<sup>-1</sup> of N, evaluating dry matter yield, total N content, and grain yield. An experiment was carried on a clayey Typic Rhodustult in a factorial design 3x4 in randomized blocks with three forages species and four N doses in four replications. At the end of 11 months, the *U. brizantha* and *P. maximum* dry matter production was higher than *U. ruziziensis*. The availability of N in the soil is affected by the cultivation of forage grasses, and *U. ruziziensis* results in a lower availability of N in relation to *U. brizantha* and *P. maximum*. Due to the lower availability of N, corn yield is lower when grown after *U. ruziziensis* in relation to *U. brizantha* and *P. maximum*. The application of N increases the supply of N in the system, and can avoid the yield losses of corn in rotation with forage grasses.



## 4.1 Introdução

Gramíneas do gênero *Urochloa* são amplamente utilizadas em sistemas de produção para integração lavoura-pecuária, sendo este gênero o mais cultivado no Brasil (KARIA et al., 2006). Essas gramíneas possuem algumas vantagens, como se adaptar em ampla faixa de temperatura, períodos de menor umidade do solo e da atmosfera, por isso seu uso é amplo no Brasil, especialmente no bioma Cerrado. Bottega et al. (2016) constataram produção de mais de 6.000 kg ha<sup>-1</sup> de *U. ruziziensis* cultivada consorciada com milho após a colheita do milho em região de clima temperado no sul do Brasil. A alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas do Brasil das espécies do gênero *Urochloa* faz com que este gênero seja altamente competitivo com outras culturas e/ou plantas daninhas.

Gramíneas do gênero *Urochloa* podem ser adotadas em sistemas integrados de produção de grãos, por meio de consórcios ou por meio de rotação de culturas. Estas gramíneas apresentam grande potencial de acúmulo de biomassa ao sistema, promovendo a cobertura do solo e fornecendo palha para a cultura em sucessão. Entretanto, podem favorecer a imobilização de N (ROSOLEM et al., 2012) e diminuir a disponibilidade do N no solo. Marques (2015) observou diminuição da produtividade de grãos de milho cultivado após *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha*, onde a adubação nitrogenada complementar tendeu a diminuir esse efeito. Um mecanismo que pode estar envolvido da diminuição da disponibilidade de N para a cultura em sucessão é exsudação radicular de compostos que inibem de nitrificação (SUBBARAO et al., 2007:2009). Ainda pode estar havendo efeito alelopático das gramíneas forrageiras sobre o milho em sucessão (SOUZA et al., 2014).

Espécies com alta relação C/N, como é o caso de gramíneas do gênero *Urochloa*, possuem grande contribuição no acúmulo de matéria seca de alta durabilidade nos sistemas de produção. Entretanto, a liberação do N em seu tecido tende a ser lenta, o que promove a competição dos microrganismos com a cultura pelo N do solo, ocorrendo imobilização (CANTARELLA, 2007). Rosolem et al. (2012) verificaram a diminuição de apenas 14% da quantidade de matéria seca de raízes de *U. ruziziensis* aos 45 dias após a dessecação. Quando se compara *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* cv. Tanzânia e cv. Aries observa-se que a liberação de N

do tecido é lenta e uniforme para estas espécies (PEREIRA et al., 2016). Assim, gramíneas do gênero *Urochloa* podem diminuir a oferta de N às culturas que as sucedem, porém tendo resposta variada entre as espécies deste gênero.

O milho é uma cultura amplamente cultivada no Brasil e em sistemas de produção muitas vezes sucede gramíneas do gênero *Urochloa*. Dessa forma o milho pode encontrar condições de baixa disponibilidade de N para seu desenvolvimento e com consequente perda de produtividade (MARQUES, 2015). A alta produtividade de matéria seca das *Urochloas* pode também afetar a disponibilidade de N para o milho, uma vez que Souza et al. (2006) observaram a diminuição na oferta de  $N-NO_3^-$  no solo quando houve cultivo e incorporação de *U. decumbens*. O N absorvido pelas *Urochloas*, pode ainda, ser diluído em sua matéria seca, que por ser abundante, mesmo com a absorção total de grande quantidade de N vai ter alta relação C/N de liberação muito lenta para a utilização pelo milho em sucessão.

O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de matéria seca, teor de N e N acumulado de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* cultivados por 11 meses sem adubação, bem como avaliar o efeito das gramíneas sobre o desempenho do milho cultivado em sucessão com 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N, avaliando, no milho, a produção de matéria seca, teor de N e N total e a produtividade de grãos.

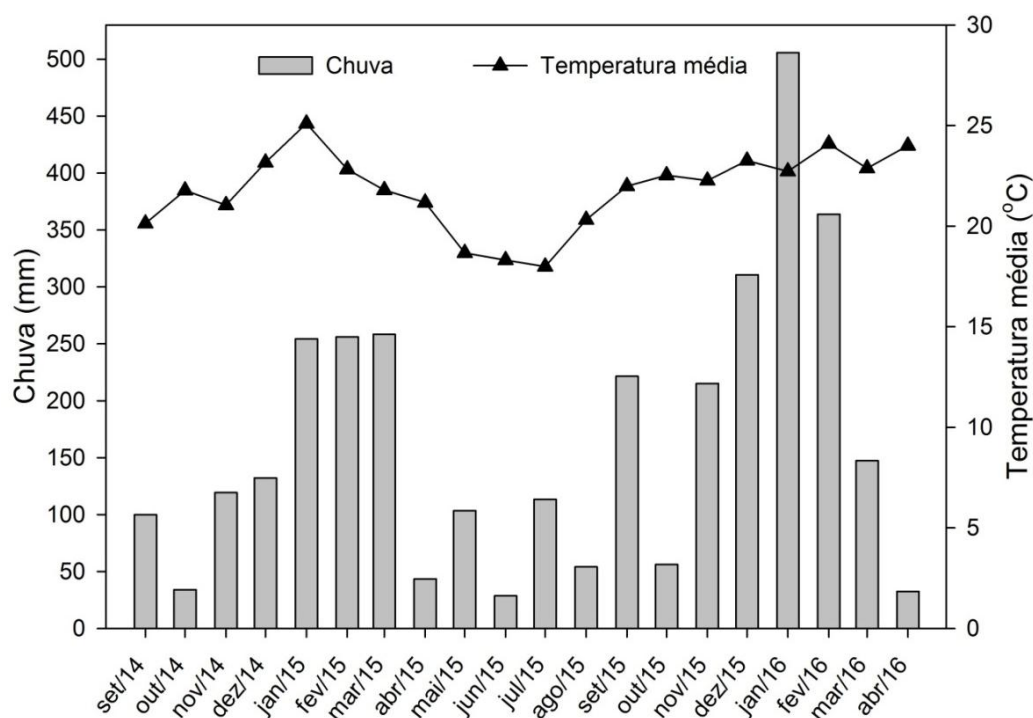
## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Caracterização da área

Foi conduzido um experimento de campo em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, 22° 49' Latitude Sul e 48° 25' Longitude Oeste de Greenwich, com altitude média de 770 metros. O solo da área é classificado como Nitossolo Vermelho distroférico estruturado (EMBRAPA, 1999), ou *Typic Rhodustult* (USDA, 2010), de textura muito argilosa, com 626 g kg<sup>-1</sup> de argila, com menos de 3% de declividade. A área estava há quatro anos sem cultivo, recoberta por plantas espontâneas, predominando plantas daninhas gramíneas. O clima é Cwa, pela classificação de Köppen, subtropical úmido, com precipitação média anual de 1400 mm, temperatura média do mês mais quente superior a 22 °C e do mês mais frio entre 3 e 18 °C. Os dados climáticos obtidos durante o experimento foram adquiridos por meio de uma

estação meteorológica localizada a cerca de 500 m da área experimental e estão apresentados na Figura 14.

**Figura 14 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*) e do milho em sucessão.**



Antes da instalação do experimento foi realizada amostragem de solo na camada de 0–0,2 m de profundidade para caracterização química de rotina da área. O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado de acordo com método descrito por Walkley & Black (1934) e o pH em solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (CaCl<sub>2</sub>) foi determinado com auxílio de potenciômetro digital (RAIJ et al., 2001). O teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi determinado por destilação conforme descrito por Keeney & Nelson (1982). A acidez potencial a pH 7,0 (H+Al) foi determinada de acordo com Raij et al. (2001). O teor de fósforo (P), cálcio (Ca<sup>+2</sup>), magnésio (Mg<sup>+2</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) trocáveis foram extraídas com resina trocadora de íons (Raij et al., 1986). A concentração de P foi determinada em espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão) e os teores de Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e K<sup>+</sup> foram determinados utilizando espectrômetro de absorção atômica modelo AAS7000 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão). Os resultados estão expressos na Tabela 11.

**Tabela 11 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0–0,2 m de profundidade.**

MO	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P (resina)	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H+Al	V
g dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	-----	mg kg <sup>-1</sup>	-----	-----	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----	-----	%
20	5,9	5,4	6,3	15	1,2	34	23	37	60

MO= Matéria orgânica; V = Saturação por Bases.

#### 4.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, em quatro repetições. Foram utilizadas três espécies de gramíneas forrageiras e quatro doses de N aplicadas na cultura em sucessão. As espécies utilizadas foram: braquiária ruziziensis cv. Comum (*Urochloa ruziziensis*), braquiária brizanta cv. Marandú (*Urochloa brizantha*) e capim colômbio cv. Tanzânia (*Panicum maximum*). Após o cultivo das gramíneas forrageiras foi realizado um cultivo de milho. No cultivo de milho foi aplicado 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.

#### 4.2.3 Instalação e condução do experimento

A área do experimento foi previamente dessecada com pulverização de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato com 720 g kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i.a.). A semeadura das gramíneas forrageiras ocorreu no dia 22 outubro de 2014 com uma semeadora de fluxo contínuo da marca Semeato modelo Personale Drill 21. As gramíneas forrageiras foram semeadas sem adubação em semeadura direta com densidade de 10 kg ha<sup>-1</sup> de sementes viáveis, considerando 500 pontos de valor cultural ha<sup>-1</sup> e valor cultural de 50%. O espaçamento utilizado foi de 0,2 m entre fileiras. As parcelas continham dimensões de 9,0 x 20,0 m totalizando 180 m<sup>2</sup>.

As gramíneas forrageiras permaneceram na área por 11 meses e após esse período foram dessecadas para a implantação da cultura do milho. Para dessecação

foi utilizado  $4,0 \text{ kg ha}^{-1}$  de glifosato ( $720 \text{ g kg}^{-1}$  i.a.), no dia 08/10/2015, e após uma semana desta aplicação, realizou-se a aplicação de  $3,0 \text{ L ha}^{-1}$  de paraquat ( $200 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) + diuron ( $100 \text{ g L}^{-1}$  i.a.). Na dessecação foi utilizado também  $0,15 \text{ L ha}^{-1}$  de lambda-cialotrina ( $50 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) + clorantraniliprole ( $100 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) com objetivo de baixar população de lagartas.

A semeadura do milho foi realizada sob semeadura direta no dia 26/10/2015, utilizando o híbrido simples 2B810 da empresa Dow Agrosience. O espaçamento utilizado foi  $0,75 \text{ m}$  entre linhas e a população de plantas foi de  $65.000$  plantas  $\text{ha}^{-1}$ , conforme recomendada pelo obtentor. Foi semeado em parcelas contendo dimensões de  $4,5 \times 10 \text{ m}$  totalizado  $45 \text{ m}^2$ . A adubação utilizada foi de  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$  e  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  utilizando as fontes cloreto de potássio e superfosfato triplo, respectivamente, aplicados no sulco de semeadura, almejando produtividade de  $13.000 \text{ kg ha}^{-1}$  de grãos, de acordo com a recomendação do estado de São Paulo (RAIJ et al., 1996). As doses de N de  $0$ ,  $70$ ,  $140$  e  $210 \text{ kg ha}^{-1}$  foram aplicadas de forma que  $30 \text{ kg ha}^{-1}$  de N foi aplicado superficialmente, concentrado sobre a linha de semeadura, imediatamente após a semeadura. O N restante foi aplicado em uma única vez no estágio de V4-V5 (RITCHIE & HANWAY, 1986) a lanço, no dia 20/11/2015 aos 25 dias após a semeadura do milho, concentrado sobre o solo,  $0,02 \text{ m}$  ao lado da linha de semeadura. A fonte nitrogenada utilizada foi o sulfato de amônio.

Os tratos culturais referentes ao controle de plantas daninhas, pragas e doenças foi realizado mediante monitoramento. Aos 10 e 16 dias após a semeadura (DAS) foi aplicado  $0,3 \text{ L ha}^{-1}$  de tiametoxam ( $141 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) + lambda-cialotrina ( $106 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) para o controle de percevejos, sendo que na segunda aplicação  $2,0 \text{ kg ha}^{-1}$  de glifosato ( $720 \text{ g kg}^{-1}$  i.a.) foi aplicado para controle de plantas daninhas. Aos 35 DAS foram aplicados  $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$  de glifosato ( $720 \text{ g kg}^{-1}$  i.a.),  $0,3 \text{ L ha}^{-1}$  de tiametoxam ( $141 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) + lambda-cialotrina ( $106 \text{ g L}^{-1}$  i.a.),  $0,3 \text{ L ha}^{-1}$  de azoxistrobina ( $200 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) + ciproconazol ( $80 \text{ g L}^{-1}$  i.a.) e  $0,4 \text{ L ha}^{-1}$  de lufenuron ( $50 \text{ g L}^{-1}$  i.a.), visando o controle de plantas daninhas, percevejos, doenças e lagarta, respectivamente. Todas as aplicações ocorreram juntamente com  $0,6 \text{ L ha}^{-1}$  do produto Assist que é adjuvante para melhor distribuição dos produtos. O volume de calda aplicada em todas as pulverizações foi de  $200 \text{ L ha}^{-1}$  aplicado com auxílio de trator e pulverizador montado.

O pleno florescimento do milho, estágio VT (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 08/01/2016, 74 dias após a semeadura. A maturação fisiologia, estágio R6 (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 25/02/2016 e a colheita no dia 07/03/2016, 122 e 133 dias após a semeadura, respectivamente (ANEXO E).

#### **4.2.4 Produção de matéria seca e matéria seca exportada das gramíneas forrageiras**

A produção de matéria seca das gramíneas forrageiras foi determinada aos 3, 6, 8 e 11 MAS (ANEXO C e D), nos dias 13 de março de 2015, 20 de abril de 2015, 17 de junho de 2015 e 07 de outubro de 2015, respectivamente. As amostragens foram realizadas coletando-se aleatoriamente três sub-amostras de 0,25 m<sup>2</sup> por parcela, cortando-se as plantas no nível do solo ou o total de palha sobre o solo, após a semeadura do milho. O material amostrado foi seco a 60°C e pesado. Uma sub-amostra foi utilizada para posterior análise e o restante do material devolvido à parcela de origem.

Aos 6 e 8 MAS das gramíneas foi realizada amostragem do dossel das plantas acima de 0,3 m de altura, simulando um pastejo. O material cortado foi retirado da parcela, sendo considerado material exportado. O corte foi realizado com tritorizado regulado para a altura estipulada. A quantificação de matéria seca exportada foi realizada cortando-se manualmente três sub-amostras por parcela com área de 0,25 m<sup>2</sup> cada sub-amostra. O material amostrado foi seco a 60°C e pesado. Uma sub-amostra foi utilizada para posterior determinação do teor de N. Com a produção de matéria seca e o teor de N no tecido foi estimada a quantidade de N exportada via forragem.

#### **4.2.5 Produção de matéria seca de milho e produtividade de grãos**

Na colheita foram amostradas 3 plantas inteiras de milho por parcela para se estimar a produção de matéria seca e a quantidade de N. As plantas foram particionadas em três frações: folha + palha da espiga; colmo + sabugo; grão. As frações das plantas foram secas a 60°C e pesadas para determinar a produção de matéria seca de cada uma.

A produtividade de grãos de milho foi determinada colhendo-se três fileiras centrais com 6 m de comprimento cada, totalizando 13,5 m<sup>2</sup>. Foram coletadas as espigas manualmente, e trilhadas com auxílio de um trilhador tratorizado. As amostras foram pesadas e uma subamostra, de massa conhecida, seguiu para secagem a 105°C. Após secas, as subamostras foram pesadas novamente e através do teor de umidade encontrado forneceram um fator de correção das amostras, corrigindo-as para 13%. Os resultados de produtividade de grãos foram extrapolados para kg ha<sup>-1</sup>.

#### **4.2.6 Teor e acúmulo de nitrogênio nas gramíneas forrageiras e no milho**

No estágio de florescimento (VT) do milho (Ritchie and Hanway, 1986), foram amostradas folhas para diagnose do teor de N. Foram coletadas 10 folhas em cada unidade experimental. Foi coletada a folha na posição oposta e abaixo da espiga (MALAVOLTA et al., 1997). Realizou-se um corte na lígula da folha, amostrando-se toda lâmina foliar.

Todas as amostras das gramíneas forrageiras, folha diagnose e frações das plantas de milho foram secas em estufa com circulação de ar forçada a 60°C. Após, as amostras foram moídas em moinho de facas para obter granulometria < 1,0 mm. A quantificação do teor de N no tecido vegetal foi realizada por digestão ácida, destilação com soda cáustica e posterior titulação com ácido sulfúrico 0,1 N, conforme método descrito por Malavolta et al. (1997) e Tedesco et al. (1995).

#### **4.2.7 Análise estatística**

Os dados dos caracteres avaliados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância (teste de Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilk). Atendidos estes pressupostos, os dados seguiram para análise de variância pelo teste F 5% ( $p < 0,05$ ). Ocorrendo significância, as médias dos tratamentos, do fator espécie, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os resultados referentes a doses de N foram submetidos à análise de regressão, e, em caso de interação, regressão das doses de N para cada espécie testada. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS 9.2.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Produção e acúmulo de matéria seca e nitrogênio das gramíneas forrageiras

A produção de matéria seca da *U. brizantha* foi superior ao *P. maximum*, não diferindo da *U. ruziziensis* aos 3 MAS (Tabela 12). Aos 6 MAS a *U. ruziziensis* produziu maior quantidade de matéria seca que as demais espécies. Aos 8 MAS não foi observada diferença e aos 11 MAS *U. brizantha* e *P. maximum* produziram mais matéria seca que a *U. ruziziensis*.

**Tabela 12 – Produção de matéria seca, teor de nitrogênio no tecido vegetal e nitrogênio acumulado em *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* aos 3, 6, 8 e 11 meses após a semeadura.**

Espécie	Épocas de amostragem (meses após a semeadura)			
	3	6	8	11
	----- Matéria seca (kg ha <sup>-1</sup> ) ----- ---			
<i>U. ruziziensis</i>	6391 ab	7908 a	7385	5323 b
<i>U. brizantha</i>	6504 a	6600 b	8216	8648 a
<i>P. maximum</i>	5288 b	5277 c	7762	7963 a
DMS*	1209	739	940 <sup>ns</sup>	1131
	----- Teor de N (g kg <sup>-1</sup> ) -----			
<i>U. ruziziensis</i>	8,34	6,77	4,27 b	5,57 b
<i>U. brizantha</i>	8,92	8,34	8,24 a	6,98 ab
<i>P. maximum</i>	8,58	7,86	8,63 a	8,53 a
DMS*	2,61 <sup>ns</sup>	3,1 <sup>ns</sup>	1,61	1,93
	----- N acumulado (kg ha <sup>-1</sup> ) ----- --			
<i>U. ruziziensis</i>	53,2	53,7	31,5 b	29,7 b
<i>U. brizantha</i>	56,9	55,2	67,6 a	61,1 a
<i>P. maximum</i>	47,4	42,1	67,3 a	68,0 a
DMS*	18,3 <sup>ns</sup>	22,1 <sup>ns</sup>	16,8	20,8

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

<sup>ns</sup>Não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*Diferença mínima significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



O teor de N no tecido das gramíneas forrageiras foi maior nos primeiros 6 MAS em relação aos estágios mais avançados de desenvolvimento, independentemente da espécie testada (Tabela 12). Entretanto, aos 8 e 11 MAS, o teor de N na *U. ruziziensis* foi menor que nas demais espécies. Aos 8 MAS o teor de N no tecido da *U. ruziziensis* foi 50% menor em relação às demais espécies.

O N acumulado pela *U. ruziziensis* nos primeiros 6 meses de cultivo foi igual às demais espécies (Tabela 12). Entretanto, aos 8 e 11 MAS diminuiu drasticamente em relação à *U. brizantha* e *P. maximum*. Ao final de 11 meses de cultivo o N acumulado pela *U. ruziziensis* foi, em média, acima de 50% menor que o acumulado por *U. brizantha* e *P. maximum*.

#### 4.3.2 Exportação de matéria seca e nitrogênio pelas gramíneas forrageiras

A *U. ruziziensis* exportou mais matéria seca, seguida de *U. brizantha* e *P. maximum* aos 6 MAS (Tabela 13). Aos 8 MAS as três espécies testadas exportaram a mesma quantidade de matéria seca, pouco mais de 2.000 kg ha<sup>-1</sup>. Entretanto o total de matéria seca exportado em dois cortes foi superior para a *U. ruziziensis* em relação ao *P. maximum*. A *U. brizantha* não se diferenciou das demais espécies em quantidade de matéria seca exportada.

O teor de N encontrado no tecido das gramíneas forrageiras exportado foi em média 12,5 g kg<sup>-1</sup>, não diferindo para as espécies testadas aos 6 MAS (Tabela 13). Aos 8 MAS o teor de N na matéria seca exportada de *U. ruziziensis* foi inferior as demais espécies. O *P. maximum* ainda apresentou maior teor de N na matéria seca exportada em relação a *U. brizantha*.

A quantidade de N exportado pela matéria seca de *U. ruziziensis* foi significativamente maior em relação às demais espécies aos 6 MAS. Aos 8 MAS ocorreu o inverso, onde a *U. ruziziensis* exportou menos N em seu tecido em relação às demais espécies testadas (Tabela 13). O total de N exportado via matéria seca das gramíneas forrageiras foi em torno de 50 kg ha<sup>-1</sup>, não diferindo entre as espécies.

**Tabela 13 – Matéria seca exportada, teor de nitrogênio no tecido e nitrogênio exportado no tecido vegetal de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, devido à simulação de pastejo aos 6 e 8 meses após a semeadura.**

Espécie	Épocas de amostragem (meses após a semeadura)		
	6	8	Total
	----- Matéria seca exportada (kg ha <sup>-1</sup> ) -----		
<i>U. ruziziensis</i>	2883 a	2424	5307 a
<i>U. brizantha</i>	1929 b	2550	4479 ab
<i>P. maximum</i>	1502 c	2183	3685 b
DMS*	371	667 <sup>ns</sup>	831
	----- Teor de N (g kg <sup>-1</sup> ) -----		
<i>U. ruziziensis</i>	12,0	6,7 c	9,5 b
<i>U. brizantha</i>	12,1	10,4 b	11,1 b
<i>P. maximum</i>	13,5	13,7 a	13,7 a
DMS*	3,0 <sup>ns</sup>	2,7	1,9
	----- N exportado (kg ha <sup>-1</sup> ) -----		
<i>U. ruziziensis</i>	34,6 a	16,1 b	50,8
<i>U. brizantha</i>	23,1 b	26,7 a	49,8
<i>P. maximum</i>	20,2 b	30,1 a	50,4
DMS*	7,1	9,7	12,4 <sup>ns</sup>

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem ao nível de 5% de probabilidade (Tukey,  $p < 0,05$ ).

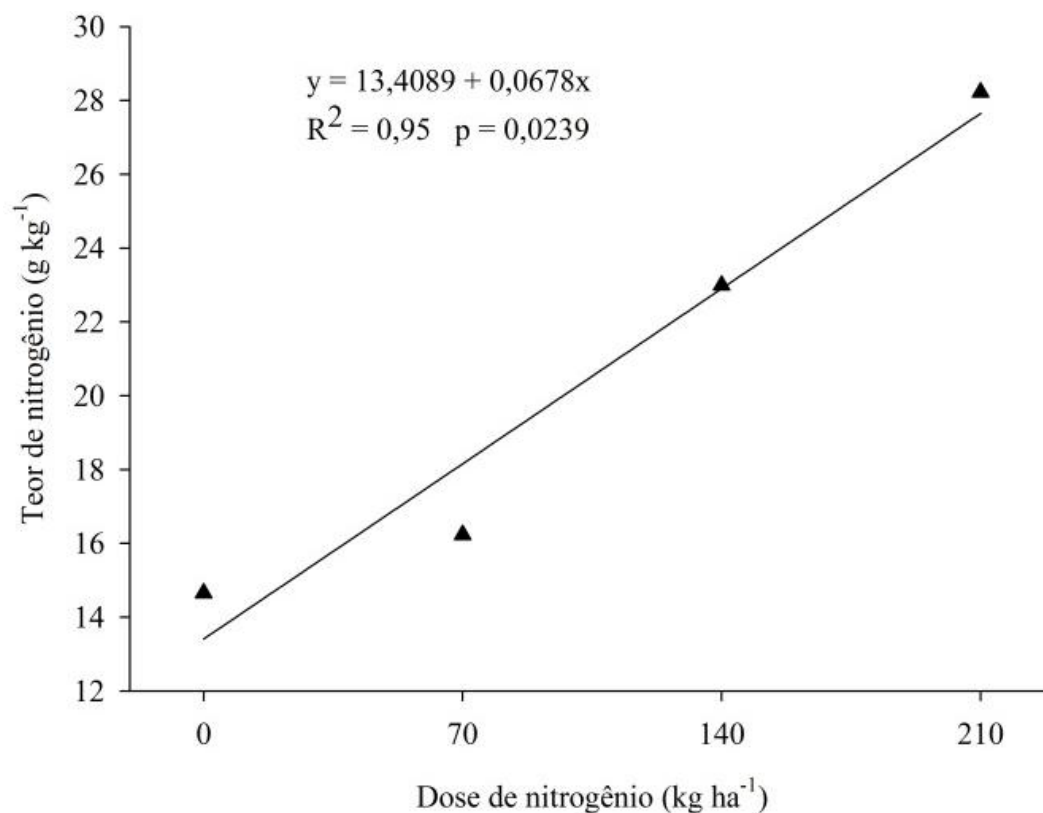
<sup>ns</sup> Não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

\* Diferença mínima significativa de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3 Folha diagnose de milho

As doses de N afetaram os teores de N na folha diagnose de milho, que não diferiu em função das gramíneas forrageiras (Figura 15). Quando não foi aplicado N, o teor na folha diagnose de milho não ultrapassou 15 g kg<sup>-1</sup>, mas foi aumentado em até 28 g kg<sup>-1</sup> com a dose de 210 kg ha<sup>-1</sup>, aproximadamente o dobro do teor encontrado na ausência de N.

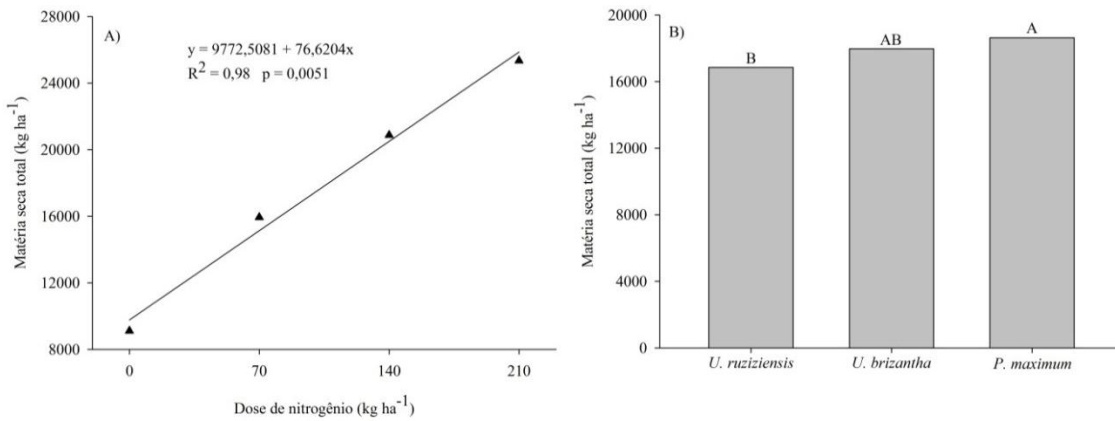
**Figura 15 – Teor de nitrogênio na folha diagnose de milho cultivado após 11 meses de cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>. *p* = Probabilidade a 5%.**



#### 4.3.4 Matéria seca, teor de N no tecido e N acumulado no milho

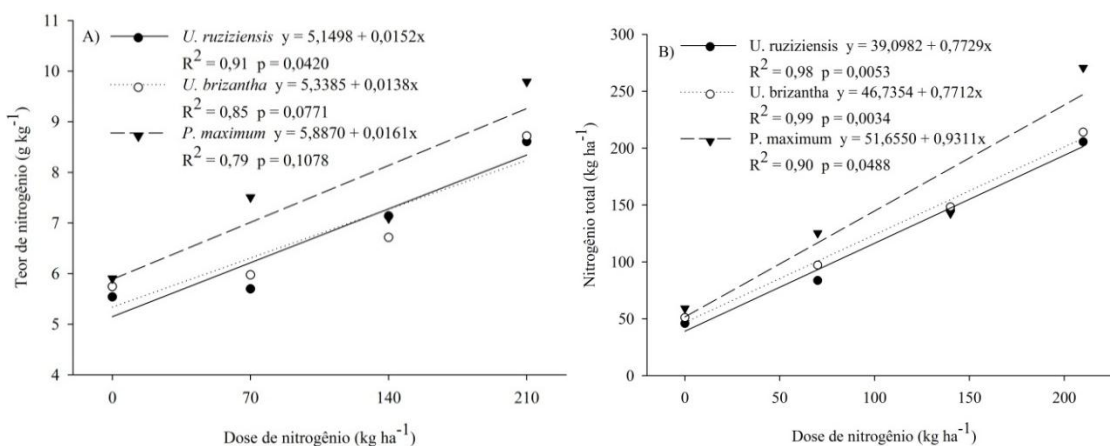
Na ausência de aplicação de N foi observado acúmulo de matéria seca de milho de 9.000 kg ha<sup>-1</sup> (Figura 16A). Com a aplicação de doses crescentes de N ao milho, o acúmulo de matéria seca total de milho aumentou linearmente até 25.000 kg ha<sup>-1</sup>. Não foi observada interação das gramíneas com doses de fertilizante, mas o milho acumulou mais matéria seca quando foi cultivado após *P. maximum* (Figura 16B). Quando a *U. ruziziensis* antecedeu o milho, resultou em menor produção de matéria seca, ea *U. brizantha* não diferiu das demais espécies.

**Figura 16 – Matéria seca total de plantas inteiras de milho (colmo + folhas + espiga + sabugo + grão) cultivado com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup> (A) após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* (B).  $p$  = Probabilidade a 5%. Médias seguidas por letras diferentes nas barras diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).**



Foi observada interação das gramíneas com as doses de N para os resultados de teor de N no tecido e N acumulado em plantas inteiras de milho (Figura 17). O teor de N aumentou linearmente para as três espécies (Figura 17A), mas quando o milho foi cultivado após *U. ruziziensis* e *U. brizantha* o coeficiente da equação foi menor em relação ao milho cultivado após *P. maximum*. O teor de N no milho cultivado após *P. maximum* foi, em média, 12% maior em relação às demais espécies. O N acumulado em plantas inteiras de milho foi maior quando cultivado após *P. maximum*, sendo que o acúmulo de N no milho cultivado após *U. ruziziensis* e *U. brizantha* foi semelhante (Figura 17B).

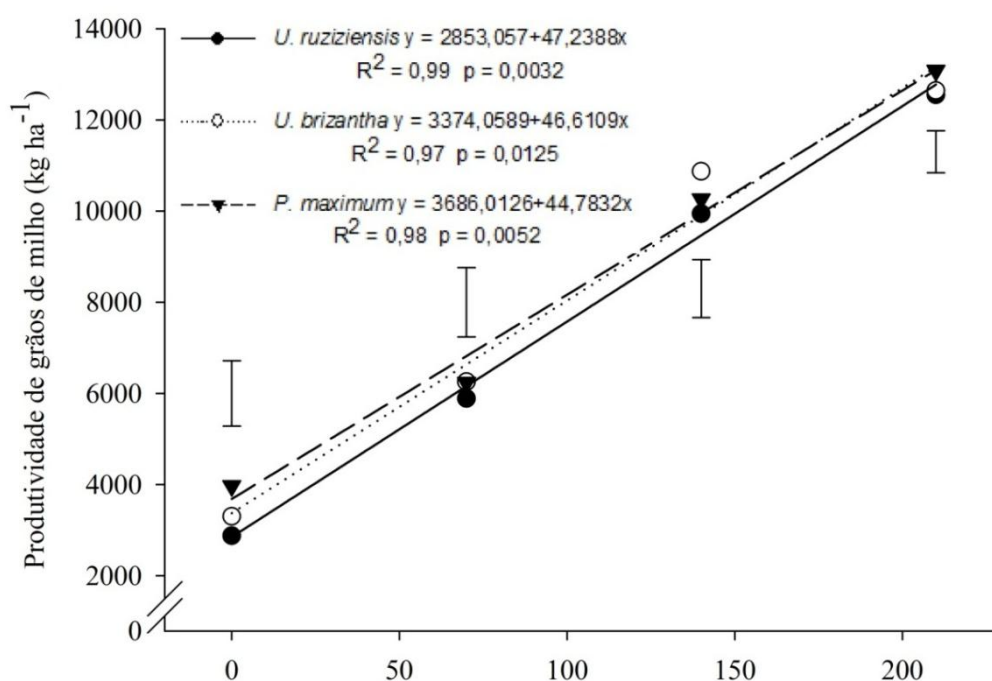
**Figura 17 – Teor de nitrogênio no tecido (A) e nitrogênio acumulado (B) em plantas inteiras de milho (colmo + folhas + espiga + sabugo + grão) cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha*, e *P. maximum*, com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.  $p$  = Probabilidade a 5%.**



### 4.3.5 Produtividade de grãos de milho

A produtividade de grãos de milho apresentou efeito significativo de interação das espécies de gramíneas com as doses de N aplicadas (Figura 18). Para as três espécies de gramíneas forrageiras ajustou-se o modelo linear de regressão, sendo positiva, ou seja, aumentando a produtividade de grãos de milho em função do aumento das doses de N ao milho. Entretanto, o fator de linearidade da curva ajustada para a produtividade de milho após *U. ruziziensis* foi superior às demais espécies, seguida da *U. brizantha* e após pelo *P. maximum*, tendendo assim, a diminuir a diferença de produtividade entre as espécies de forrageiras com a maior dose de N aplicada. Apesar disso, a produtividade de grãos após *U. ruziziensis*, que foi inferior em relação às demais espécies, foi, em média, 500 kg ha<sup>-1</sup> menor em relação à *U. brizantha*, na ausência de N. Já quando milho foi cultivado sem N após *P. maximum*, este produziu um excesso de 500 kg ha<sup>-1</sup> de grãos em relação a *U. brizantha*. Na dose de 210 kg ha<sup>-1</sup> de N a produtividade de grãos de milho ultrapassou os 12.000 kg ha<sup>-1</sup>. Já na ausência de N, a produtividade de grãos de milho foi abaixo de 4.000 kg ha<sup>-1</sup>. Esta variação de produtividade demonstra alta resposta às doses de N.

**Figura 18 – Produtividade de grãos de milho cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.  $p =$  Probabilidade a 5%. Barras indicam DMS Tukey ( $p < 0,05$ ).**



## 4.4 Discussão

### 4.4.1 Produção e acúmulo de matéria seca e nitrogênio das gramíneas forrageiras

A produção de matéria seca das gramíneas forrageiras demonstrou que a *U. ruziziensis* foi mais precoce em relação às demais espécies, fator esse observado a campo. O *P. maximum* foi a espécie mais tardia, uma vez que tem crescimento inicial mais lento em solos com baixos níveis de N em função de seu melhor desempenho em solos com maior oferta de N (BORGHI & CRUSCIOL, 2007; FREITAS et al., 2008). Portanto, a baixa disponibilidade de N, com apenas 5,4 e 6,3 mg kg<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente, possivelmente não foi suficiente para que o *P. maximum* tivesse crescimento inicial mais acelerado. Moro et al. (2013) em solo cultivado com *U. ruziziensis*, *U. brizantha*, *U. decumbens*, *U. humidicola*, milho e crotalária observaram melhor desempenho destas espécies em solo com teor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> variando de 15 a 25 mg kg<sup>-1</sup>. Entretanto, a *U. ruziziensis* e a *U. brizantha* possuem maior adaptabilidade à baixa disponibilidade de N no solo.

Apesar da variação de crescimento e acúmulo de matéria seca no período inicial de desenvolvimento das forrageiras, o teor de N no tecido das forrageiras, acima de 8 g kg<sup>-1</sup>, nos 6 primeiros meses de cultivo foi elevado em relação a outros períodos. Isso pôde ser observado devido ao material vegetal produzido ser jovem e ter ainda baixa lignificação. Outro ponto importante a ser abordado é de que, mesmo com alto potencial de resposta a N no solo, as plantas apresentaram teor de N elevado em seu tecido, não acumulando mais matéria seca que diluiria o N em seu tecido e poderia causar danos aos processos metabólicos vitais em decorrência da falta de N (FREITAS et al., 2005). Dessa forma, foi observado, no presente trabalho, que os ciclos das gramíneas foram diferentes entre si, o que fez com que o teor de N no tecido, com o passar do tempo, fosse diferente, entre as forrageiras e entre os períodos de amostragem. A precocidade da *U. ruziziensis* resulta em elevado teor de N em seu tecido no início de seu desenvolvimento, mas que decresce com o tempo em decorrência do fim do período reprodutivo e da senescência da planta. Mas aos 11 MAS, a *U. ruziziensis* tende a aumentar o seu teor de N no tecido em relação ao seu teor aos 8 meses, devido ao início de emissão de novas rebrotas que caracteriza um novo ciclo. O *P. maximum* mantém em todo o seu ciclo o teor de N

próximo a  $8 \text{ g kg}^{-1}$ . Sendo assim, em sistemas de integração com pecuária a oferta de proteína para os animais pode ser mais constante com *P. maximum* em relação a *U. ruziziensis* e *U. brizantha*. Isso evidencia a maior exigência em N pelo *P. maximum* em relação às demais espécies (BORGHI & CRUSCIOL, 2007; FREITAS et al., 2008).

Aos 11 MAS o teor de N no tecido da *U. brizantha* diminui. Esse efeito provavelmente foi observado em função da lignificação do material vegetal, sendo que aos 11 MAS a *U. brizantha* estava no final de sua fase reprodutiva. Poletto et al. (2008) observaram que o teor de N na matéria seca de *U. brizantha* somente aumenta quando a adubação nitrogenada é realizada. A *U. ruziziensis* acumulou menor quantidade de N ao final de 11 meses de cultivo em relação às demais espécies. Essa resposta pode estar associada mais uma vez ao seu ciclo que é mais precoce e que neste momento estava emitindo novas brotações sem grande acúmulo de matéria seca. *P. maximum* e *U. brizantha* com ciclo mais tardio puderam manter maior o teor de N em seu tecido ao final de 11 meses de cultivo. Isso resultou em maior quantidade de N para ser mineralizado e devolvido ao solo. Entretanto Poletto et al. (2008) demonstraram que o teor de N no tecido dessas gramíneas não é o que determina a velocidade de decomposição da matéria seca e liberação de N. Assim, pode haver a possibilidade de que o N venha a ser liberado em momentos não coincidam com a demanda de N pelo milho em sucessão.

Com mais N em seu tecido, *P. maximum* e *U. brizantha*, podem ofertar mais N para os microrganismos do solo, sendo que estes utilizem menos N proveniente do solo, diminuindo efeitos de deficiência de N pelo processo de imobilização de N. Borghi et al. (2013) demonstraram que a maior parte do N é liberado nos primeiros 14 dias após o manejo (dessecação) de *U. brizantha*. Assim, a matéria seca de *P. maximum* e *U. brizantha*, com mais N em seu tecido, poderiam liberar N no início do desenvolvimento do milho e, assim, diminuir o efeito de deficiência de N pela imobilização.

#### **4.4.2 Matéria seca e nitrogênio exportado pelas gramíneas forrageiras**

A matéria seca exportada pelas gramíneas representou em torno de 25% da matéria seca total da parte aérea em cada época amostrada. Em sistemas de produção onde a pecuária está presente, o pastejo promove um estresse que induz

a planta a produzir mais matéria seca, de parte aérea e de raiz, produzindo os dois nas mesmas proporções (GUEDES et al., 2009). Assim, no presente trabalho, que não foi adicionado o fator animal, a indução de produção de raízes é interessante para se assemelhar a um sistema integrado com a pecuária. Também é importante salientar que o maior acúmulo de matéria seca de raiz aumenta a exploração do solo e os efeitos ligados à dinâmica do N no solo, como exsudação de compostos (SUBBARAO et al., 2009) .

A *U. ruziziensis*, aos 8 MAS, já estava no período reprodutivo, quando há a realocação de N para estruturas reprodutivas, o que explica o menor teor de N observado nesta época comparada às outras espécies. O *P. maximum* exportou menor quantidade de matéria seca, mas com teor de N mais elevado em relação às demais espécies de forrageiras. Assim, o *P. maximum* provavelmente necessita mais N em seu tecido para manter suas atividades metabólicas vitais, acumulando assim menos matéria seca. A *U. ruziziensis* e *U. brizantha* já apresentam maior adaptabilidade a ambientes de alta resposta a N, onde conseguem acumular mais matéria seca com menor teor de N em seu tecido, sendo mais eficientes ao utilizar o N absorvido.

A precocidade da *U. ruziziensis* pode ser observada pela exportação de N em sua matéria seca, onde acumula mais matéria seca rica em N no início de seu desenvolvimento em relação a *U. brizantha* e ao *P. maximum* até os 6 MAS. Dessa forma, aos 8 MAS o *P. maximum* e a *U. brizantha* exportaram mais N em relação a *U. ruziziensis*, 86 e 65% respectivamente, uma vez que esta última já havia passado pelo estágio reprodutivo. Assim, em sistemas de produção onde essas espécies estão presentes somente na entressafra, normalmente com período menor que 6 meses, o uso da *U. ruziziensis* poderia ser uma boa opção de oferta de forragem em quantidade e de alto teor de proteína. A *U. ruziziensis* ainda possui alta suscetibilidade ao glifosato, sendo seu manejo de dessecação é mais fácil em relação a *U. brizantha* e *P. maximum* (NASCENTE et al., 2012). Por outro lado, em sistemas que o pastejo é contínuo e anual a escolha de espécies com maior longevidade com maior oferta de forragem é a melhor opção, como é o caso da *U. brizantha*.



#### 4.4.3 Folha diagnose de milho

O teor médio de N na folha diagnose de milho em plantas sadias é de 28 a 34 g kg<sup>-1</sup> (MALAVOLTA et al., 1997). Entretanto, no presente trabalho, na ausência de N, o teor foi de apenas 14 g kg<sup>-1</sup>, demonstrando deficiência severa de N. Com a aplicação de fertilizante nitrogenado o teor aumentou, chegando a 28 g kg<sup>-1</sup> com a aplicação de 210 kg ha<sup>-1</sup> de N. Isso demonstra que o sistema de produção deste trabalho apresentava baixa oferta de N, sendo que 210 kg ha<sup>-1</sup> de N não foi o suficiente para ultrapassar o teor de 30 g kg<sup>-1</sup> de N na folha diagnose de milho. Em sistemas baixa resposta a N, mesmo com a aplicação de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, Rocha et al. (2014) e Pauletti & Costa (2000) não observaram variação do teor de N da folha diagnose de milho. Estes autores observaram ainda teor de N na folha diagnose entre 28 e 32 g kg<sup>-1</sup>, que é o teor adequado para a cultura. Nas condições do presente trabalho, o baixo teor de N da folha diagnose indica a necessidade de suplementação com N.

#### 4.4.4 Matéria seca, teor de N no tecido e N acumulado no milho

O incremento em matéria seca total de plantas de milho com a aplicação de N era esperado no presente trabalho. A baixa oferta de N inicial do solo, 5,4 e 6,3 mg kg<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente, associado com o cultivo de gramíneas sem adubação por 11 meses criou um ambiente de alta resposta à adubação nitrogenada. Dessa forma, a maior dose testada, com 210 kg ha<sup>-1</sup> de N, não foi o suficiente para expressar o máximo potencial produtivo do milho, pois apresentou resposta linear e positiva até esta dose. Isso pode ser evidenciado quando se observa o acúmulo de matéria seca de milho relatado pela literatura, que pode ultrapassar 35.000 kg ha<sup>-1</sup> (VON PINHO et al., 2009).

O cultivo de *P. maximum* antecedendo o milho criou um ambiente mais favorável para a cultura. A produção de matéria seca total de milho cultivado após *P. maximum* foi superior às demais espécies e pode ter sido em função do menor esgotamento de N do solo. Por ser mais exigente em fertilidade, o *P. maximum*, possivelmente, não possui sistemas de alta afinidade para a absorção de N, em relação a *U. ruziziensis* e *U. brizantha*, sendo menos eficiente em absorver N em baixas concentrações no solo (SOUZA & FERNANDES, 2006). Assim, torna o

ambiente do solo mais favorável para o milho em sucessão adquirir N em relação às demais espécies de gramíneas forrageiras, uma vez que nos foram observadas diferenças nos teores de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  no solo após o cultivo das forrageiras (Capítulo 1). O menor acúmulo de matéria seca e de N no milho após a *U. ruziziensis* pode ainda estar associado com o menor conteúdo de N a ser devolvido pela *U. ruziziensis* em relação às demais espécies (Tabela 52). Por ter mais N em seu tecido no momento da dessecação e posterior semeadura do milho, a *U. brizantha*, que segundo Borghi et al. (2013) libera a maior parte do N em seu tecido em 14 dias, pode ter favorecido o acúmulo de matéria seca e N no milho em sucessão, fator esse que provavelmente ocorreu também com o milho cultivado após *P. maximum*.

O N acumulado por plantas inteiras de milho foi maior quando foi cultivado após *P. maximum* (Figura 17B). Na ausência de N, o acúmulo de N nas plantas de milho não ultrapassou  $60 \text{ kg ha}^{-1}$ , independente da espécie de gramínea forrageira que antecedeu a cultura. Já com adubação nitrogenada, o acúmulo de N pelo milho aumentou linearmente. Na maior dose de N foi observado acúmulo de N no milho acima de  $200 \text{ kg ha}^{-1}$ , chegando a  $270 \text{ kg ha}^{-1}$  no milho cultivado após *P. maximum*. Se comparado com a literatura, o maior acúmulo de N observado no presente trabalho ainda é menor, uma vez que Von Pinho et al. (2009) obtiveram acúmulo de N acima de  $320 \text{ kg ha}^{-1}$  testando dois híbridos de milho com aplicação de  $250 \text{ kg ha}^{-1}$  de N.

O teor de N em plantas inteiras de milho cultivado após *P. maximum* foi superior às demais espécies, demonstrando menor efeito do *P. maximum* sobre a oferta de N. Essa resposta é evidenciada também devido ao maior acúmulo de matéria seca total de milho cultivado após *P. maximum* em relação à *U. ruziziensis* e *U. brizantha*. Assim, o montante de N acumulado pelo milho também foi maior quando cultivado após *P. maximum*. Ainda, na presença de N, o milho cultivado após *P. maximum* tendeu a acumular mais N. Isso indica que o milho cultivado após *U. ruziziensis* e *U. brizantha*, mesmo com a adição de fertilizante nitrogenado, promovem diminuição da oferta de N.

#### 4.4.5 Produtividade de grãos de milho

O potencial produtivo do milho é elevado, tendo assim alta resposta a adubação, principalmente a nitrogenada (Duete et al., 2008; Santos et al., 2010). O N, por ser o nutriente limitante no presente trabalho, e o sistema de produção ofertar pouco N, foi observada alta resposta à sua aplicação (ANEXO F). Entretanto, com o aumento da dose de N, a produtividade de milho tendeu a ser equivalente quando comparada às espécies que o antecederam.

Foi evidente que a *U. ruziziensis* resulta em menor produtividade de grãos de milho em relação a *U. brizantha* e *P. maximum* e que esse efeito é devido a deficiência de N. Esse resultado poderia ser devido à simples competição por N, dada a alta relação C/N da *U. ruziziensis*. Echer et al. (2012) observaram menor acúmulo de matéria seca em algodoeiro cultivado sobre palha de *U. ruziziensis*, atribuindo o efeito à competição por N. Entretanto a relação C/N de gramíneas é semelhante. Assim, outros mecanismos estão envolvidos na diminuição da oferta de N. Subbarao et al. (2009) observaram diminuição do processo de nitrificação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> do solo, diminuindo a oferta de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Porém Heinrichs et al., (2006) avaliaram a predominância de absorção de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas culturas do milho, soja e arroz, não observando predominância de absorção quando há equilíbrio entre as formas de N-mineral, mesmo comportamento observado por Castoldi et al. (2013) em solo com pH corrigido para faixa de 5,0 a 6,0. Já Meurer (2007) apontam que alguns cultivares de milho podem absorver N do solo sem predominância por N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### 4.5 Conclusão

Ao final de 11 meses, a *U. brizantha* e o *P. maximum* produzem mais matéria seca em relação a *U. ruziziensis*.

A disponibilidade de N no solo é afetada pelo cultivo de gramíneas forrageiras, sendo que a *U. ruziziensis* resulta em menor disponibilidade de N em relação à *U. brizantha* e o *P. maximum*.

A produtividade de milho é menor quando cultivado após *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*.

A aplicação de N aumenta a oferta de N no sistema, e evita perdas de produtividade do milho em rotação com gramíneas forrageiras.

#### 4.6 Referências

BORGHI, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; MATEUS, G. P.; NASCENTE, A. S.; MARTINS, P. O. Intercropping time of corn and palisadegrass or guineagrass affecting grain yield and forage production. **Crop Science**, v.53, n.2, p.629–636, 2013.

BORGHI, E. & CRUSCIOL, C. A. C. Produtividade de milho, espaçamento e modalidade de consorciação com *Brachiaria brizantha* em sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.2, p.163–171, 2007.

BOTTEGA, E. L.; BASSO, K. C.; PIVA, J. T.; MORAES, R. F. Cultivo de milho em consórcio com capins tropicais. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.16, n.1, p.18–25, 2016.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap. 7, p.375-470.

CASTOLDI, G.; REIS, J. G. dos; PIVETTA, L. A.; ROSOLEM, C. A. Soil nitrogen dynamics after brachiaria dissection. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, n.1, p.1620–1627, 2013.

DUETE, DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. da; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (15N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.1, p.161-171, 2008.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA-CNPS, 1999. 412p.

FREITAS, F. C. L.; SANTOS, M. V.; MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; FREITAS, M. A. M.; SILVA, M. G. O. Comportamento de Cultivares de Milho no Consórcio com *Brachiaria brizantha* na Presença e Ausência de Foramsulfuron + Iodosulfuron-Metil para o manejo da Forrageira. **Planta Daninha**, v.26, n.C, p.215–221, 2008.

KARINA ROCHA FREITAS, K. R.; ROSA, B.; RUGGIERO, J. A.; NASCIMENTO, J. L. do; HEINEMAM, A. ; FERREIRA, P. H.; MACEDO, R. Avaliação do capim mombaça (*Panicum maximum* Jacq.) submetido a diferentes doses de nitrogênio. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.27, n.1, p.83-89, 2005.

GUEDES, E. M. S.; FERNANDES, A. R.; LIMA, E. DO V.; GAMA, M. A. P.; SILVA, A. L. P. DA. Fosfato natural de arad e calagem e o crescimento de *Brachiaria brizantha* em latossolo amarelo sob pastagem degradada na Amazônia. **Revista de Ciências**

**Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v.52, n.1, p.117–129, 2009.

HEINRICHS, R.; GAVA, G. J.; CORAZZA, E. J.; DUETE, R. R. C.; VILLANUEVA, F. C. A.; MURAOKA, T. Forma preferencial de absorção de nitrogênio ( $^{15}\text{NH}_4^+$  ou  $^{15}\text{NO}_3^-$ ) pelas culturas de soja, feijão, arroz e milho. **Científica**, v.34, n.1, p.25-30, 2006.

KARIA, C.T.; DUARTE, J.B.; ARAÚJO, A.C.G. de. **Desenvolvimento de cultivares do gênero Brachiaria (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 57p.

KEENEY, D. R. & NELSON, D. W. Nitrogen: inorganic forms. In: PAGE AL; MILLER RH; KEENEY DR. 2nd ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, p. 625-642, 1982.

MALAVOLTA, E.A., VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafós, 1997. 201p.

MARQUES, L. M. **Antecipação de nitrogênio para a cultura do milho em sucessão a gramíneas forrageiras no sistema plantio direto**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015, 47p.

MEURER, E. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.2, p.65-90.

MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H. Teor de nitrogênio inorgânico no solo em função de plantas de cobertura, fontes de nitrogênio e inibidor de nitrificação. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v.43, n.4, p.424–435, 2013.

NASCENTE, A. S.; CRUSCIOL, C. A. C.; COBUCCI, T. Ammonium and nitrate in soil and upland rice yield as affected by cover crops and their desiccation time. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.47, n.12, p.1699–1706, 2012.

PEREIRA, F. C. B. L.; MELLO, L. M. M. DE; PARIZ, C. M.; MENDONÇA, V. Z. DE; YANO, É. H.; MIRANDA, E. E. V. DE; CRUSCIO, C. A. C. Autumn maize intercropped with tropical forages: Crop residues, nutrient cycling, subsequent soybean and soil quality. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v.40, n.1-20, 2016.

POLETTO, N.; GROHS, D. S.; MUNDSTOCK, C. M. Flutuação diária e estacional de nitrato e amônio em um argissolo vermelho distrófico típico. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v.32, n.4, p.1619–1626, 2008.

RAIJ, B., ANDRADE, J.C., CANTARELLA, H., QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Instituto Agronômico, Campinas. 2001, 285p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas : Instituto Agronômico, 1996. 285p. (IAC. Boletim técnico, 100).

RAIJ, B., QUAGGIO, J.A., DA SILVA, N.M. Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by anion exchange resin procedure. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**. v.17, p.547-566. 1986.

RITCHIE, S.W., HANWAY, J.J. **How a corn plant develops**. Special report 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames. 1986.

ROCHA, K. F.; CASSOL, L. C.; PIVA, J. T.; ARRUDA, J. H.; MINATO, E. A.; FAVERSANI, J. C. Épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho num latossolo vermelho muito argiloso sob plantio direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.13, n.3, p.273-284, 2014.

ROSOLEM, C. A.; STEINER, F.; ZOCCA, S. M.; DUCATTI, C. Nitrogen Immobilization by Congo Grass Roots Impairs Cotton Initial Growth. **Journal of Agricultural Science**, v.4, n.9, p.126-136, 2012.

SANTOS, M. M.; GALVÃO, J. C. C.; SILVA, I. R.; MIRANDA, G. V.; FINGER, F. L. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio direto, e alocação do nitrogênio (15N) na planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1185-1194, 2010.

SOUZA, E. F. C.; FERNANDES, A. M.; SOUZA-SCHLICK, G. D.; ROSOLEM, C. A. Early growth of common bean cropped over ruzigrass residues. **Planta Daninha**, v.32, n.4, p.775-781, 2014.

SOUZA, S. R. & FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Eds). **Nutrição Mineral de Plantas**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. Cap.4, p.215-252.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, n.41, p.17302-17307, 2009.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.

USDA, United States Department of Agriculture. **Keys to Soil Taxonomy**, Eleventh Edition, 2010. 338p.

VON PINHO, R. G.; BORGES, I. D.; PEREIRA, J. L. de A. R.; REIS, M. C. dos. Marcha de absorção de macronutrientes e acúmulo de matéria seca em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.8, n.2, p.157-173, 2009.

WALKLEY, A. &BLACK, I.A.An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method.**Soil Science**,v.37, p.29-38. 1934.

## CAPÍTULO 5

### BALANÇO DE NITROGÊNIO EM SISTEMA DE ROTAÇÕES DE FORRAGEIRAS COM MILHO

#### Resumo

Controlar as entradas e saídas de N em sistemas de rotações de forrageiras com milho é importante para se ter um sistema produtivo e com balanço de N favorável, visando a mantê-lo disponível para as culturas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* por 11 meses sem N sobre a produtividade de uma safra de milho em sucessão com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N no balanço de N ao quantificar as entradas de N via chuva e fertilizante e as saídas de N por exportação pelas gramíneas forrageiras e pelo milho por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, volatilização de N-NH<sub>3</sub> e emissão de N-N<sub>2</sub>O. Foi conduzido um experimento em um Nitossolo Vermelho distroférico de textura argilosa em delineamento experimental de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, em quatro repetições. As entradas de N via chuva foram inferiores a 5 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> e as saídas de N por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, volatilização de N-NH<sub>3</sub> e emissão de N-N<sub>2</sub>O foram inferiores a 14 kg ha<sup>-1</sup>. O balanço mais negativo foi observado no sistema de produção com *P. maximum* e na maior dose de N aplicado ao milho. *U. ruziziensis* apresentou balanço menos negativo em relação à *U. brizantha*, entretanto produziu menos milho. *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* apresentam o mesmo potencial de perdas de N por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, emissão de N-N<sub>2</sub>O e volatilização de N-NH<sub>3</sub>, que somam o mesmo montante de N perdido. Sistema de produção de milho com *P. maximum* tem balanço mais negativo em relação a *U. ruziziensis* e *U. brizantha*.

#### NITROGEN BALANCE IN FORAGE-CORN ROTATION

#### Abstract

Controlling N inputs and outputs in corn forage rotation systems is important in order to have a productive system with favorable N balance, in order to keep it available for crops. The objective of this work was to evaluate the effect of the cultivation of *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum* for 11 months without N on the corn yield in succession with the application of 0, 70, 140 and 210 kg ha<sup>-1</sup> of N in the N balance quantifying N inputs by rainfall and fertilizer and the N outputs by forage grasses and corn by N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching, N-NH<sub>3</sub> volatilization and N-N<sub>2</sub>O emission. An experiment was carried on a clayey Typic Rhodustult in a factorial design 3x4 in randomized blocks with three forages species and four N doses in four replications. N inputs by rainfall were less than 5 kg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> and the N outputs by N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching, N-NH<sub>3</sub> volatilization and N-N<sub>2</sub>O emission were below than 14 kg ha<sup>-1</sup>. The most negative balance was observed in the production system with *P. maximum* and the highest N dose applied to maize. *U. ruziziensis* showed a less negative balance in relation to *U. brizantha*, however it produced less corn. *U. ruziziensis*, *U. brizantha* and *P. maximum* showed the same N loss potential due to N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> leaching, N-N<sub>2</sub>O emission and N-NH<sub>3</sub> volatilization, which add up to the same amount of N losses. Corn



production system with *P. maximum* has a more negative balance in relation to *U. ruziziensis* and *U. brizantha*.

## 5.1 Introdução

A principal forma de N nos sistemas de produção é a matéria orgânica, que contém aproximadamente 95% do N-total do solo (KEENEY & NELSON, 1982; SILVA & MENDONÇA, 2007). Assim a produção de matéria seca é importante fator de manutenção do N no solo, visando mantê-lo no sistemas de produção. A fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico (FBN) é importante meio de entrada do nutriente no sistema, tendo contribuições através de simbioses e associações de bactérias com as plantas. Leguminosas podem acumular em torno 200 kg ha<sup>-1</sup> de N em um ciclo, como a soja. Entretanto Boddey & Victoria (1986) observaram que 30 a 40% do N em plantas de *U. humidicola* e *U. decumbens* foi proveniente da FBN, ou seja, nas condições de estudo, 30 a 45 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>.

O N pode entrar no sistema também na forma de óxidos, depositado ao solo pela ação de chuvas, como também pode haver contribuição através de descargas elétricas e deposição de poeira. Segundo Shaw et al. (1989) e Hayashi & Yan (2010) as deposições atmosféricas, advinda de poeira ou de chuva, podem fornecer por ano de 4,2 a 60 kg de N ha<sup>-1</sup>, respectivamente, bem acima da quantidade de N advindo da atmosfera relatado por Cantarella (2007) que não ultrapassa os 5 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Entretanto, em sistemas de alta resposta a N, a adição de fertilizante nitrogenado é indispensável para obtenção de altas produtividades e ainda é a principal forma de entrada de N. Além disso, a adição via fertilizante deve ser equivalente ao N requerido pela cultura e levar em consideração a soma da exportação e das perdas para não haver esgotamento do N do solo. Em um sistema de produção já consolidado com oferta de N elevada, o mínimo a se fazer seria repor o N exportado e perdido. O milho, que possui em torno de 10% de proteína bruta (OLIVEIRA et al., 2004), exporta em média, via grãos, 16 kg de N por tonelada de grãos produzido, já as gramíneas forrageiras não possuem valor definido de exportação de N em sistemas com pastejo, uma vez que estas se adaptam em ambientes de variada disponibilidade de N, variando o teor do nutriente em seu tecido e quantidade de matéria seca produzida.

O N-orgânico, para ser disponibilizado às plantas, deve ser mineralizado. Por outro lado o N-mineral pode ser utilizado por microrganismos do solo, deixando o N indisponível, imobilizando-o. O processo de mineralização/imobilização do N-orgânico é dependente de fatores como umidade, temperatura e pH. Da mineralização resulta a produção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  que são as formas absorvidas pelas plantas. Porém quando a produção de  $\text{N-NH}_4^+$  e  $\text{N-NO}_3^-$  é intensificada, estes podem estar sujeitos a perdas, através das transformações que o N pode sofrer no solo, que segundo Fernandes et al. (2011) ocorrem por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  pela desnitrificação e volatilização de  $\text{N-NH}_3$ . Já a imobilização de N no solo resulta em menor crescimento das culturas nos períodos iniciais de desenvolvimento devido ao uso do N disponível às plantas pelos microrganismos. A relação C/N do material a ser decomposto é um dos principais reguladores da imobilização o que requer maior adição de N via fertilizante. Assim, em condição de imobilização de N, provavelmente, o balanço pode ser mais positivo, entretanto abaixo da produtividade esperada devido à falta de N na fase inicial da cultura que sucedeu a forrageira.

Por se tratar de um cátion, o  $\text{N-NH}_4^+$  possui capacidade de se adsorver aos colóides do solo e aumentar a sua permanência no mesmo, quando comparado com o  $\text{N-NO}_3^-$ , que é um ânion livre e está sujeito a perdas por lixiviação (ROSOLEM et al., 2003), quando as condições forem favoráveis. Em condições de alta umidade em que não há a lixiviação do  $\text{N-NO}_3^-$ , podem ocorrer perdas por desnitrificação, devido à baixa oxigenação do solo, que é um processo onde o  $\text{N-NO}_3^-$  é reduzido a formas voláteis de  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ , principalmente, que se perdem para a atmosfera (SUBBARAO et al., 2013). Além de possuir alto potencial de causar o efeito estufa, é uma forma de perda de N, mas sem grande magnitude do ponto de vista nutricional (CASTOLDI, 2014). Carmo et al. (2005) observaram fluxo de emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  entre 0,85 e 2,18  $\mu\text{g m}^{-2} \text{h}^{-1}$  em pastagens de *U. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente. As perdas de  $\text{N-N}_2\text{O}$  em áreas com *U. ruziziensis* têm sido menores que 9  $\text{kg ha}^{-1}$  por ano, concentrando-se em momentos em que há mobilização da área, como ocorre na semeadura, sendo muito próximas de zero durante outros períodos (CASTOLDI, 2014).

A volatilização de  $\text{N-NH}_3$  pode ocorrer devido a áreas de alcalinidade do solo, o que em sistemas conservacionistas é possível através da aplicação superficial do calcário. A volatilização ainda pode ocorrer pela emissão de  $\text{N-NH}_3$  pelos estômatos

das folhas das plantas, dependendo do ponto de compensação nos tecidos subestomáticos (FARQUHAR et al., 1980). Franco et al. (2008) verificaram perdas de N por volatilização de N-NH<sub>3</sub> a partir de plantas de *U. decumbens* em solos com maior umidade, muito provável pelo aumento do fluxo de massa na planta. Se o balanço for negativo nos tecidos subestomáticos, pode haver também a absorção de N-NH<sub>3</sub> pelas plantas, onde a N-NH<sub>3</sub> que estava sendo perdida por emissão do solo pode ser reabsorvida pela parte aérea da cultura. Dessa forma, Castoldi (2014) afirma que as perdas de N via volatilização de N-NH<sub>3</sub> e emissão de N-N<sub>2</sub>O em cultivos do sorgo granífero e do consórcio *U. ruziziensis* + sorgo granífero, são dependentes do acúmulo de N no tecido vegetal.

Em muitos sistemas de produção agrícolas a cultura do milho sucede gramíneas do gênero *Urochloa*. Gênero este que pode diminuir a disponibilidade de N para os cultivos em sucessão. Assim, a escolha da gramínea forrageira adequada que produza matéria seca em quantidade e qualidade suficiente é fundamental ao sistema. Pois ter no sistema uma cultura que diminua as perdas de N e após a dessecação tenha capacidade de fornecer N ao milho, para elevar sua produtividade pela melhor nutrição e diminuir custo, devido a menor necessidade de adubação. Rosolem et al. (2004) ainda recomendam que a adição de N a gramíneas forrageiras que antecipam a cultura de grãos eleva a disponibilidade de N dentro do sistema de produção. Dessa forma pode-se obter balanço menos negativo associado à alta produtividade.

Marques (2015) observaram menor taxa de crescimento em plantas de milho cultivadas após *U. ruziziensis* em relação a *U. brizantha*, apresentando sintomas típicos de deficiência de N e respondendo positivamente a aplicação de fertilizante nitrogenado. Entretanto, ainda é desconhecido o efeito destas gramíneas sobre o total de perdas e no balanço final de N em sistemas de rotações com milho.

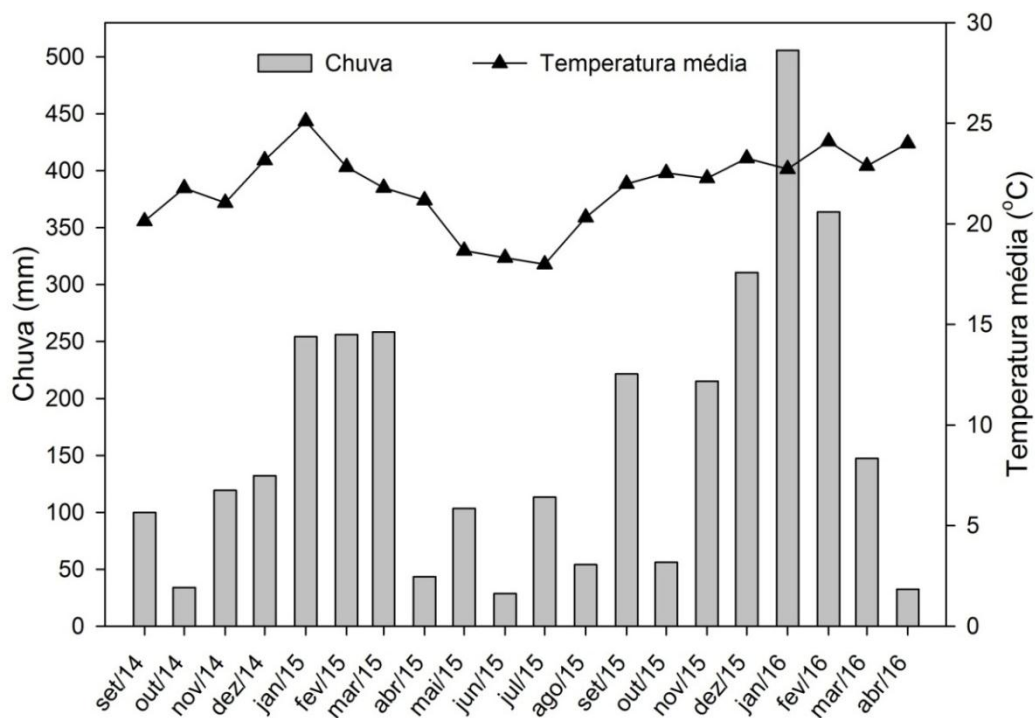
O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* por 11 meses sem N sobre a produtividade de uma safra de milho em sucessão com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N no balanço de N ao quantificar as entradas de N via chuva e fertilizante e as saídas de N por exportação pelas gramíneas forrageiras e pelo milho por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, volatilização de N-NH<sub>3</sub> e emissão de N-N<sub>2</sub>O.

## 5.2 Material e métodos

### 5.2.1 Caracterização da área

Foi conduzido um experimento de campo em Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, 22° 49' Latitude Sul e 48° 25' Longitude Oeste de Greenwich, com altitude média de 770 metros. O solo da área é classificado como Nitossolo Vermelho distroférico estruturado (EMBRAPA, 1999), ou Typic Rhodustult (USDA, 2010), de textura muito argilosa, com 626 g kg<sup>-1</sup> de argila, com menos de 3% de declividade. A área estava há quatro anos sem cultivo, recoberta por plantas espontâneas, predominando plantas daninhas gramíneas. O clima é Cwa, pela classificação de Köppen, subtropical úmido, com precipitação média anual de 1400 mm, temperatura média do mês mais quente superior a 22°C e do mês mais frio entre 3 e 18°C. Os dados climáticos obtidos durante o experimento foram adquiridos por meio de uma estação meteorológica localizada a cerca de 500 m da área experimental e estão apresentados Figura 19.

**Figura 19 – Precipitação total e temperatura média mensal no período de cultivo das gramíneas forrageiras (*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*) e do milho em sucessão.**



Antes da instalação do experimento foi realizada amostragem de solo na camada de 0,00-0,20 m de profundidade para caracterização química de rotina da área. O teor de matéria orgânica (MO) foi determinado de acordo com método descrito por Walkley & Black (1934) e o pH em solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L<sup>-1</sup> (CaCl<sub>2</sub>) foi determinado com auxílio de potenciômetro digital (RAIJ et al., 2001). Os teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram determinados por destilação conforme descrito por Keeney & Nelson (1982). A acidez potencial a pH 7,0 (H+Al) foi determinada de acordo com Raij et al. (2001). O teor de fósforo (P), cálcio (Ca<sup>+2</sup>), magnésio (Mg<sup>+2</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>) trocáveis foram extraídas com resina trocadora de íons (Raij et al., 1986). A concentração de P foi determinada em espectrofotômetro UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão) e os teores de Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e K<sup>+</sup> foram determinados utilizando espectrômetro de absorção atômica modelo AAS7000 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão). Os resultados estão expressos na Tabela 14.

**Tabela 14 – Caracterização química do solo das áreas antes da semeadura das gramíneas forrageiras na camada de 0,00 – 0,20 m de profundidade.**

MO	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P (resina)	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H+Al	V
g dm <sup>-3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	-----	mg kg <sup>-3</sup>	-----	-----	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----	-----	%
20	5,9	5,4	6,3	15	1,2	34	23	37	60

MO= Matéria orgânica; V = Saturação por Bases.

### 5.2.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em esquema fatorial 3x4, em quatro repetições. Foram utilizadas três espécies de gramíneas forrageiras e quatro doses de N aplicadas na cultura em sucessão. As espécies utilizadas foram: braquiária ruzizensis cv. Comum (*Urochloa ruzizensis*), braquiária brizanta cv. Marandú (*Urochloa brizantha*) e capim colômbio cv. Tanzânia (*Panicum maximum*). Após o cultivo das gramíneas forrageiras foi realizado um cultivo de milho. No cultivo de milho aplicou-se as doses de 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.

### 5.2.3 Instalação e condução do experimento

A área do experimento foi previamente dessecada com pulverização de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato com 720 g kg<sup>-1</sup> de ingrediente ativo (i. a.). A semeadura das gramíneas forrageiras ocorreu no dia 22 outubro de 2014 com uma semeadora de fluxo contínuo da marca Semeato modelo Personale Drill 21. As gramíneas forrageiras foram semeadas sem adubação em semeadura direta com densidade de 10 kg ha<sup>-1</sup> de sementes viáveis, considerando 500 pontos de valor cultural ha<sup>-1</sup> e valor cultural de 50%. O espaçamento utilizado foi de 0,2 m entre fileiras. As parcelas continham dimensões de 9,0 x 20,0 m totalizado 180 m<sup>2</sup>.

As gramíneas forrageiras permaneceram na área por 11 meses e após esse período foram dessecadas para a implantação da cultura do milho. Para dessecação foi utilizado 4,0 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.), no dia 08/10/2015, e após uma semana desta aplicação, realizou-se a aplicação de 3,0 L ha<sup>-1</sup> de paraquat (200 g L<sup>-1</sup> i. a.) + diuron (100 g L<sup>-1</sup> i. a.). Na dessecação foi utilizado também 0,15 L ha<sup>-1</sup> de lambda-cialotrina (50 g L<sup>-1</sup> i. a.) + clorantraniliprole (100 g L<sup>-1</sup> i. a.) com objetivo de baixar população de lagartas.

A semeadura do milho foi realizada sob semeadura direta no dia 26/10/2015, utilizando o híbrido simples 2B810 da empresa Dow Agrosience. O espaçamento utilizado foi 0,75 m entre linhas e a população de plantas foi de 65.000 plantas ha<sup>-1</sup>, conforme recomendada pelo obtentor. Foi semeado em parcelas contendo dimensões de 4,5 x 10 m totalizado 45 m<sup>2</sup>. A adubação utilizada foi de 120 kg K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> e 120 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ha<sup>-1</sup> utilizando as fontes cloreto de potássio e superfosfato triplo, respectivamente, aplicados no sulco de semeadura, almejando produtividade de 13.000 kg ha<sup>-1</sup> de grãos, de acordo com a recomendação do estado de São Paulo (RAIJ et al., 1996). O N restante (40, 110 e 180 kg ha<sup>-1</sup>) foi aplicado em uma única vez no estágio de V4-V5 (RITCHIE & HANWAY, 1986) a lanço, no dia 20/11/2015 aos 25 dias após a semeadura do milho, concentrado sobre o solo, 0,02 m ao lado da linha de semeadura. A fonte nitrogenada utilizada foi o sulfato de amônio.

Os tratos culturais referentes ao controle de plantas daninhas, pragas e doenças foi realizado mediante monitoramento. Aos 10 e 16 dias após a semeadura (DAS) foi aplicado 0,3 L ha<sup>-1</sup> de tiametoxam (141 g L<sup>-1</sup> i. a.) + lambda-cialotrina (106 g L<sup>-1</sup> i. a.) para o controle de percevejos, sendo que na segunda aplicação 2,0 kg ha<sup>-1</sup> de glifosato (720 g kg<sup>-1</sup> i. a.) foi aplicado para controle de plantas daninhas. Aos 35 DAS

foram aplicados  $1,2 \text{ kg ha}^{-1}$  de Glifosato ( $720 \text{ g kg}^{-1} \text{ i. a.}$ ),  $0,3 \text{ L ha}^{-1}$  de tiametoxam ( $141 \text{ g L}^{-1} \text{ i. a.}$ ) + lambda-cialotrina ( $106 \text{ g L}^{-1} \text{ i. a.}$ ),  $0,3 \text{ L ha}^{-1}$  de azoxistrobina ( $200 \text{ g L}^{-1} \text{ i. a.}$ ) + ciproconazol ( $80 \text{ g L}^{-1} \text{ i. a.}$ ) e  $0,4 \text{ L ha}^{-1}$  de lufenuron ( $50 \text{ g L}^{-1} \text{ i. a.}$ ), visando o controle de plantas daninhas, percevejos, doenças e lagarta, respectivamente. Todas as aplicações ocorreram juntamente com  $0,6 \text{ L ha}^{-1}$  do produto assist que é adjuvante para melhor distribuição dos produtos. O volume de calda aplicada em todas as pulverizações foi de  $200 \text{ L ha}^{-1}$  aplicado com auxílio de trator e pulverizador montado.

O pleno florescimento do milho, estágio VT (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 08/01/2016, 74 dias após a semeadura. A maturação fisiologia, estágio R6 (RITCHIE & HANWAY, 1986), ocorreu no dia 25/02/2016 e a colheita no dia 07/03/2016, 122 e 133 dias após a semeadura, respectivamente.

#### **5.2.4 Entradas de N via chuva e fertilizante**

A entrada de N via chuva foi quantificada através da avaliação da quantidade de água da chuva e o teor de N nessa água. Foram instalados na área experimental dois pluviômetros para coleta da água. Imediatamente após cada chuva as amostras foram coletadas, armazenadas em frascos e refrigeradas até o momento da análise. O teor de nitrato foi quantificado por ultravioleta (EATON et al., 1993) e o amônio pelo método de azul de salicílico descrito por Qiu et al. (1987), ambos em um equipamento UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão).

#### **5.2.5 Saídas de N via lixiviação de nitrato, emissão de oxido nitroso e volatilização de amônia**

A umidade do perfil do solo foi mensurada utilizando sondas de capacitância, modelo Diviner 2000® da empresa Sentek. Foram instalados, em cada parcela, tubos de acesso até 1,0 m de profundidade que auxiliaram nas leituras, medidas em intervalo de 0,1 m de profundidade. Foram realizadas leituras semanais da umidade no perfil do solo, tanto nas gramíneas forrageiras como na cultura do milho. Com as leituras de umidade foi possível estimar a drenagem de água abaixo de 0,8 m de profundidade, pressupondo que esta água está fora do alcance das culturas. Foi considerada água drenada a que excedeu o ponto de saturação do solo. As

estimativas de drenagem de água foram realizadas com o auxílio do software Irrimax® (Sentek). Com a quantidade de água drenada em cada amostragem foi possível calcular a área abaixo da curva calculada (JAGGER & RICHARDS, 2008).

Foram alocados em cada parcela tubos de PVC com 0,5 polegada de diâmetro e 0,8 m de comprimento. Na extremidade do tubo foi acoplada uma cápsula porosa onde, por aplicação de vácuo, a solução do solo entra e é armazenada, similar à metodologia descrita por Reichardt et al. (1977). Imediatamente após eventos de chuva, vácuo foi aplicado às capsulas e as amostras da solução do solo foram coletadas 2 a 3 dias após a ocorrência de chuva. As amostras foram congeladas a -15 °C até o momento da análise. Foi determinado o teor de  $\text{N-NO}_3^-$  na solução por espectrofotometria de absorção ultravioleta (EATON et al., 1993), em um equipamento UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão). A estimativa de perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$  foi realizada através da concentração de  $\text{N-NO}_3^-$  da amostra multiplicado pelo volume de água drenado.

A emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  foi quantificada utilizando câmaras conforme metodologia descrita por Bowden et al. (1990). As medidas de emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  foram realizadas nas parcelas contendo as três espécies de gramíneas forrageiras e nas doses de 0 e 140  $\text{kg ha}^{-1}$  de N no milho. Foram alocadas, inicialmente e permanentemente nas parcelas, bases metálicas para a acoplagem das câmaras. As câmaras foram utilizadas somente no momento das amostragens. Os gases no interior das câmaras foram coletados a 0, 5, 10 e 20 minutos após a montagem das câmaras sobre as bases metálicas, com seringas de nylon de 20 mL (BOWDEN et al., 1990). A concentração de  $\text{N-N}_2\text{O}$  foi determinada por cromatografia gasosa. No momento das amostragens, medidas de temperatura e umidade do solo foram realizadas. O esquema de amostragem leva em consideração os trabalhos de La Scala Junior et al. (2009), Teixeira et al. (2010) e Castoldi (2014), tendo como data referência a semeadura das culturas. Assim, as coletas de gás foram realizadas a 1, 3, 5, 8, 15, 30 e 60 dias após a semeadura e dessecação das gramíneas e após a semeadura do milho, sempre entre as 08 e 10 horas da manhã. Nos outros períodos do ano, foi realizada uma amostragem mensal.

As perdas de N do sistema por volatilização de  $\text{N-NH}_3$  foram quantificadas pelo método de coletores abertos com absorvedores de espuma (OLIVEIRA et al., 2008). Cada absorvedor foi composto por uma espuma e uma placa de acrílico. As espumas utilizadas possuíam dimensão de 8 x 8 cm e densidade de 20  $\text{kg m}^{-3}$  e



foram embebidas com 11 mL de solução de ácido fosfórico 0,5 N + glicerina 4%. Embebidas, as espumas foram colocadas sobre placas de acrílico de 10 x 10 x 0,2 cm e envolvidas por uma camada de fita de politetrafluoroetileno (fita veda-rosca), que é permeável à N-NH<sub>3</sub> e impermeável à água. Até a sua alocação no campo, os absorvedores ficaram armazenados em sacos plásticos e refrigerados, para evitar contaminação com a N-NH<sub>3</sub> presente no ambiente. Nas gramíneas forrageiras e no milho foram instalados sobre o dossel das plantas ajustando-as quando necessário. As coletas foram realizadas a cada duas semanas no primeiro mês e mensalmente até a dessecação. Após a dessecação foi realizado um ciclo de coletas por 20 dias, espaçadas de quatro em quatro dias. Na cultura do milho foram realizados dois ciclos de coletas de 15 dias espaçados em cinco dias após a semeadura e a aplicação da adubação nitrogenada de cobertura. Nos demais períodos do ciclo do milho realizou-se uma amostragem mensal.

Recolhidos os absorvedores, as espumas foram embaladas individualmente e acondicionadas em geladeira a 4 °C ou analisadas. Para a determinação as espumas foram lavadas com volume de 100 mL de solução 0,0005 N de ácido sulfúrico por imersão e extração manual do conteúdo da espuma. As alíquotas extraídas foram analisadas em duplicata por colorimetria pelo método azul de salicílico descrito por Qiu et al. (1987), em um equipamento UVmini-1240 (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japão).

#### **5.2.6 Saída de N via exportação de forragem e grãos de milho**

Aos 6 e 8 MAS das gramíneas forrageiras foi realizado corte acima de 0,3 m de altura, simulando um pastejo e estimulando o crescimento das plantas. O material cortado foi retirado da parcela, sendo considerado material exportado. O corte foi realizado com tratorizado regulado para a altura estipulada. A quantificação de matéria seca exportada foi realizada cortando-se manualmente três sub-amostras por parcela com área de 0,25 m<sup>2</sup> em cada sub-amostra. O material amostrado foi seco a 60 °C e pesado. Uma sub-amostra foi utilizada para posterior determinação do teor de N. Com a produção de matéria seca e o teor de N no tecido foi estimada a quantidade de N exportada via forragem.

A produtividade de grãos de milho foi determinada colhendo-se três fileiras centrais com 6 m de comprimento cada, totalizando 13,5 m<sup>2</sup>. Foram coletadas as

espigas manualmente, e trilhadas com auxílio de um trilhador tratorizado. As amostras foram pesadas e uma subamostra, de massa conhecida, seguiu para secagem a 105 °C. Após secas, as subamostras foram pesadas novamente e através do teor de umidade encontrado forneceram um fator de correção das amostras, corrigindo-as para 13%. Uma sub-amostra de grãos foi retirada para a determinação do teor de N no tecido. Com os dados de produtividade de grãos e do teor de N no tecido foi estimada a quantidade de N exportado via grãos de milho. A quantificação do teor de N no tecido vegetal das gramíneas forrageiras e dos grãos de milho foi realizada por digestão ácida, destilação com soda cáustica e posterior titulação com ácido sulfúrico 0,1 N, conforme método descrito por Malavolta et al. (1997) e Tedesco et al. (1995).

### 5.2.7 Balanço de nitrogênio

O balanço de N dos esquemas de rotações das gramíneas forrageiras com milho foi realizado contabilizando a diferença das entradas e saídas de N avaliadas no presente trabalho. Foram utilizadas as entradas de N via chuva e adição de fertilizantes, subtraída das saídas com perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização de  $\text{N-NH}_3$ , além das saídas de N por exportação de forragem e via grãos de milho. O balanço foi realizado compreendendo todo o período de produção das gramíneas forrageiras (11 meses) e o ciclo de milho em sucessão (5 meses), totalizando 16 meses o ciclo inteiro do sistema de rotação. A equação de balanço de N esta apresentada na Equação 1.

$$(1) \quad \text{Balanço de N} = (chN + feN) - (NO_3^- + NH_3 + N_2O + grN + miN)$$

Onde:

$chN$  = N proveniente da chuva;

$feN$  = N proveniente do fertilizante;

$NO_3^-$  = Perda de N por lixiviação de nitrato;

$NH_3$  = Perda de N por volatilização de amônia;

$N_2O$  = Perda de N por emissão de óxido nitroso;

$grN$  = N exportado via gramíneas;

$miN$  = N exportado via grãos de milho.

### 5.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de homogeneidade de variância (teste de Levene) e de normalidade (Shapiro-Wilk). Atendidos estes pressupostos, os dados seguiram para análise de variância pelo teste F 5% ( $p < 0,05$ ). Ocorrendo significância, as médias dos tratamentos, do fator espécie, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Os tratamentos, do fator doses de N, foram submetidos à análise de regressão, e, em caso de interação, regressão das doses de N para cada espécie testada. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SAS 9.2.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Entrada de N via chuva e fertilizante

Em 16 meses de condução do experimento no campo foi constatado um volume de 3.316 mm de chuva (Tabela 15). Entretanto somente 5,8 kg ha<sup>-1</sup> de N entrou no sistema de produção junto à água da chuva. Nos 11 meses de permanência das gramíneas forrageiras no campo 3,0 kg ha<sup>-1</sup> de N entraram via chuva. Já no ciclo de cultivo de milho 2,7 kg ha<sup>-1</sup> de N foram introduzidos no sistema de produção via chuva.

**Tabela 15 – Precipitação acumulada e entrada de nitrogênio no sistema de produção em esquema de rotações de forrageiras com milho.**

	Gramíneas forrageiras	Milho	Total
Chuva (mm)	1.746	1.570	3.316
N (kg ha <sup>-1</sup> )	3,0	2,7	5,8

### 5.3.2 Saída de N via lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de óxido nitroso

As perdas de N por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, emissão de N-N<sub>2</sub>O e volatilização de N-NH<sub>3</sub>, somadas, não chegaram a 14 kg ha<sup>-1</sup> durante todo período de cultivo das gramíneas forrageiras e do milho, não havendo diferença entre os tratamentos

(Tabela 16). As quantidades de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-N<sub>2</sub>O perdidas foram em torno de 1,0 kg ha<sup>-1</sup> em todo período de cultivo das gramíneas forrageiras e do milho, independente da espécie da gramínea forrageira e da dose de N aplicado. A volatilização de N-NH<sub>3</sub> contribuiu, em média, compouco mais de 12 kg ha<sup>-1</sup> do N perdido.

**Tabela 16 – Saídas de nitrogênio por lixiviação de nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), volatilização de amônia (N-NH<sub>3</sub>) e emissão de óxido nitroso (N-N<sub>2</sub>O) em sistema de rotações de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* cultivado por 11 meses com um ciclo de milho com 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.**

Espécie	Dose	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	N-NH <sub>3</sub>	N-N <sub>2</sub> O	Total <sup>ns</sup>
		lixiviado <sup>ns</sup>	volatilizado <sup>ns</sup>	emitido <sup>ns</sup>	
		----- kg ha <sup>-1</sup> de N -----			
<i>U. ruziziensis</i>	0	0,41	12,3	0,49	13,2
	70	0,55	12,0	0,49	13,1
	140	0,33	12,0	0,49	12,8
	210	0,46	12,1	0,49	13,0
<i>U. brizantha</i>	0	0,48	12,3	0,51	13,3
	70	0,35	12,8	0,51	13,7
	140	0,46	12,3	0,51	13,3
	210	0,51	12,7	0,51	13,8
<i>P. maximum</i>	0	0,41	12,0	0,68	13,1
	70	0,47	12,1	0,68	13,3
	140	0,56	11,6	0,68	12,9
	210	0,66	12,1	0,68	13,4

<sup>ns</sup>Não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), independente da dose de N ou da espécie de gramínea forrageira.

### 5.3.3 Exportação de N via gramíneas forrageiras e grãos de milho

A soma de N exportado via matéria seca das gramíneas forrageiras foi de 50, 49 e 50 kg ha<sup>-1</sup> para *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente, não diferindo significativamente (Tabela 17). Já a exportação de N via grãos de milho foi significativamente diferente para as doses e para as espécies de gramíneas forrageiras, porém sem interação dos fatores (Tabela 18).

O N foi exportado em maior quantidade pelo milho produzido após *P. maximum*, sendo que o milho cultivado após *U. brizantha* e *U. ruziziensis* exportou a mesma quantidade de N (Tabela 18). A exportação de N em função das doses de N aplicadas no milho foi crescente juntamente com o aumento da dose de N aplicada. Na ausência de N o milho exportou, via grão, pouco mais de 30 kg ha<sup>-1</sup> de N, já na dose de 210 kg ha<sup>-1</sup> foi observada exportação média de 159 kg ha<sup>-1</sup> de N.

**Tabela 17 – Nitrogênio exportado no tecido vegetal de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* aos 6 e 8 meses após a semeadura.**

Espécie	N exportado (kg ha <sup>-1</sup> )
<i>U. ruziziensis</i>	50 <sup>ns</sup>
<i>U. brizantha</i>	49
<i>P. maximum</i>	50

<sup>ns</sup>Não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 18 – Nitrogênio exportado via grãos de milho cultivado após *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* com a aplicação de 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.**

Dose N (kg ha <sup>-1</sup> )	Espécie			Média
	<i>U. ruziziensis</i>	<i>U. brizantha</i>	<i>P. maximum</i>	
	kg ha <sup>-1</sup>			
0	26	29	37	30 d
70	54	61	77	64 c
140	100	106	103	103 b
210	150	153	173	159 a
Média	83 B	87 B	98 A	89

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem ao nível de 5% de probabilidade (Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### 5.3.4 Balanço de N nos sistemas de produção

O balanço de N no sistema de produção com gramíneas forrageiras e milho apresentou diferença entre as espécies de forrageiras e a doses de N aplicadas no milho, mas sem interação (Tabela 19). O balanço foi negativo em quase todos os tratamentos testados, sendo positivo somente onde foi utilizado 210 kg ha<sup>-1</sup> de N no milho produzido após *U. ruziziensis*. O sistema de produção com *P. maximum* teve o balanço mais negativo em relação às demais espécies testadas, retirando 21 kg ha<sup>-1</sup> de N a mais do que foi adicionado ao solo, na dose de 210 kg ha<sup>-1</sup> de N. Já na ausência de N, 94 kg ha<sup>-1</sup> de N foi o déficit deixado. O sistema de produção com *U. ruziziensis* e *U. brizantha* tiveram comportamento semelhante no balanço de N, sendo que na ausência de N ambas deixaram o solo em torno de 85 kg ha<sup>-1</sup> mais pobre em N. Na maior dose de N aplicada no milho o balanço de N em sistemas com *U. ruziziensis* e *U. brizantha* foi praticamente nulo. Na média, o sistema de produção com *P. maximum* se diferenciou significativamente das demais espécies, deixando um déficit de N maior em relação aos sistemas com *U. ruziziensis* e *U.*

*brizantha*. Foi observado ainda que a maior dose de N apresentou balanço de N menos negativo em relação ao tratamento conduzido na ausência de N.

**Tabela 19 – Balanço de nitrogênio em sistema de rotações de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* cultivado por 11 meses com um ciclo de milho em sucessão com 0, 70, 140 e 210 kg ha<sup>-1</sup> de N.**

Dose N	Espécie			Média
	<i>U. ruziziensis</i>	<i>U. brizantha</i>	<i>P. maximum</i>	
	kg ha <sup>-1</sup>			
0	-84	-86	-94	-88 d
70	-42	-49	-65	-52 c
140	-18	-24	-20	-21 b
210	2	-1	-21	-7 a
Média	-36 A	-40 A	-50 B	-42

Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5.4 Discussão

### 5.4.1 Entradas de nitrogênio no sistema de produção

A entrada de N via chuva foi de apenas 5,8 kg ha<sup>-1</sup> em 16 meses de avaliação. Esta quantidade representa em torno de 4,3 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N adicionado ao sistema de produção via chuva. Shaw et al. (1989) também observaram deposição anual de 4,2 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N via chuva. Assim, do ponto de vista nutricional, esta quantidade é baixa em um sistema de produção de alta produtividade, uma vez que representaria apenas 3,4% da exigência em N pelo milho para produzir entre 10.000 e 12.000 kg ha<sup>-1</sup> (RAIJ et al., 1996). Apesar da quantidade de chuva acumulada que ocorreu na condução do presente estudo, a concentração de N na água é muito baixa, refletindo em pequena entrada de N no sistema de produção.

A adição de fertilizante é a principal entrada de N no sistema de produção. É a forma de entrada de N que é controlada e que corrige e supre a cultura para que possa expressar seu máximo potencial produtivo. Entretanto a fonte a ser utilizada pode determinar o aproveitamento desse N aplicado e regular possíveis perdas. O sulfato de amônio utilizado como fonte no presente trabalho não apresenta grande potencial de perdas por volatilização de N-NH<sub>3</sub>, que somente poderia ocorrer em condições de zonas de alcalinidade do solo (VOLK, 1959).

A fonte amoniacal adicionada ao solo ainda pode passar pelo processo de nitrificação, entretanto podendo ser afetado este processo pelas forrageiras (Subbarao et al., 2009). A aplicação do sulfato de amônio foi realizada em boas condições de umidade (Figura 19), sendo o fertilizante dissolvido e incorporado ao solo junto à infiltração de água. Assim, o fertilizante aplicado pode ser utilizado pelo milho e este responder em produtividade. Entretanto, o aproveitamento do N do fertilizante foi de 35% (Capítulo 3), mas com balanço negativo, tendo N sendo retirado do solo.

O uso de 30 kg ha<sup>-1</sup> de N na semeadura pode não ter sido suficiente para anular o efeito de imobilização do N e fornecer o nutriente em quantidades adequadas para o milho. Isso pode ter ocorrido em função da baixa concentração de N-mineral no solo no momento da semeadura do milho (Capítulo 1). Nesse caso, o balanço de N tende a ser mais positivo, porém com menor produtividade.

#### **5.4.2 Saídas de nitrogênio no sistema de produção**

Apesar de ser 12 vezes maior que a perda por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e emissão de N-N<sub>2</sub>O juntas, a volatilização de N-NH<sub>3</sub> acumulou perdas que foram semelhantes para as espécies de gramíneas forrageiras e não se alterou com as doses de N aplicadas ao milho. O sistema de alta resposta a N, o qual o experimento foi conduzido (Tabela 14), fez com que as gramíneas forrageiras esgotassem o N do solo, diminuindo ainda mais sua oferta, deixando menor quantidade do nutriente disponível para perdas por lixiviação. Castoldi (2014) observaram perdas de N por volatilização de N-NH<sub>3</sub>, em sistemas de produção de soja rotacionado com *U. ruziziensis* e sorgo granífero, entre 11 e 17 kg ha<sup>-1</sup>, mais ricos em N. Dessa forma, mesmo com a aplicação de até 210 kg ha<sup>-1</sup> de N, as perdas de N por volatilização de não se elevaram, mas também pelo fato do N ter sido aplicado no milho, não sendo evidenciado o efeito da aplicação de N sobre as forrageiras na volatilização de N-NH<sub>3</sub>. Além do mais, a produtividade de milho apresentou resposta linear até a maior dose de N aplicada, evidenciando a baixa oferta de N inicial do solo. Apesar do alto volume de chuvas na condução do experimento (Figura 19), o efeito foi o mesmo entre as espécies de forrageiras, pois segundo Franco et al. (2008) as perdas de N por volatilização de N-NH<sub>3</sub> a partir de plantas, observadas em *U. decumbens*, em solos com maior umidade é maior devido ao aumento do fluxo de massa na planta

As perdas por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$  e emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  apesar de serem pequenas no presente trabalho tem sido bastante debatidas na literatura atual. A lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$  em solos de textura mais arenosa e a emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  com grande potencial causador do efeito estufa. Castoldi (2014) observou perdas de  $\text{N-NO}_3^-$  por lixiviação acima de  $17 \text{ kg ha}^{-1}$  em sistema de produção envolvendo cultivos de soja, crotalária, milho e sorgo, mesmo sem adição de fertilizante nitrogenado. Este mesmo autor também evidencia perdas de  $9,0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  de N por emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$ , acima de perdas observadas por Carmo et al. (2005) de apenas  $1,0 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ . Assim fica evidente que cada sistema de produção possui características distintas quanto às perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização de  $\text{N-NH}_3$  variando em função da disponibilidade e oferta de N no solo, tipo de solo, espécie cultivada e condições edafoclimáticas.

Apesar de haver variações no ciclo das gramíneas forrageiras cultivadas, as amostragens de plantas aos 6 e 8 MAS somadas demonstram que essa sazonalidade é anulada. Esta saída de N em sistemas integrados com pecuária nem sempre é de forma total, ou seja, os animais retornam parte do N à pastagem na forma de urina e fezes enquanto pastejam. Rodrigues et al. (2008) observaram que bovinos adultos em pastagem de *P. maximum* cv. Mombaça excretam em torno de  $100 \text{ g animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de N, que retorna ao sistema enquanto os animais estão pastejando. Assim, cada sistema deve observar com atenção e computar o mais precisamente possível as estimativas de saídas de N, e considerar perda realmente o que saiu do sistema.

Por apresentar maior produtividade de grãos (Capítulo 4), o milho produzido após *P. maximum* também exportou mais N. Como é indicado para solos mais férteis em relação ao do presente estudo (BORGHI & CRUSCIOL, 2007; FREITAS et al., 2008), o *P. maximum* não possui mecanismos de alta adaptabilidade e absorção de N, não esgotando o N do solo em relação à *U. ruziziensis* e *U. brizantha*. Assim o milho em sucessão ao *P. maximum* produziu mais e, conseqüentemente, exportou mais N. Já o milho produzido após *U. brizantha*, que em produtividade foi superior ao milho produzido após *U. ruziziensis*, não diferiu dessa espécie quanto ao N exportado via grão. Isso indica que a *U. ruziziensis* e *U. brizantha* forneceram N de forma similar, entretanto havendo efeito somente na produtividade de grãos.



### 5.4.3 Balanço de nitrogênio no sistema de produção

Em torno de 35% do N aplicado ao milho foi utilizado pela cultura (Capítulo 3). Entretanto, estimativas da quantidade de N contida nas raízes do milho não foram realizadas, sendo que parte do N ainda pode estar nessa parte da planta. Gava et al. (2006) observaram aproveitamento pelo milho de 45% do N aplicado, somando-se o N das raízes. Mas mesmo assim, grande parte do N utilizado pela cultura foi proveniente do solo e de outras entradas, como deposições atmosféricas e FBN (CASTOLDI, 2014). Dessa forma, o balanço praticamente nulo do sistema de produção com *U. ruziziensis* e *U. brizantha* com a dose de 210 kg ha<sup>-1</sup> de N no milho demonstraram que estes tiveram menor capacidade de disponibilizar N proveniente do solo para o milho, tendo por consequência menor produtividade de grãos.

Os balanços negativos encontrados na ausência de N de -84, -86 e -94 kg ha<sup>-1</sup> de N para *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, respectivamente, demonstram que, talvez, uma outra fonte de entrada de N no sistema de produção pode estar atuando além do fornecimento de N do solo. A FBN pode ser esta entrada, uma vez que Boddey & Victoria (1986) verificaram que cerca de 30 a 40% do N em plantas de *U. humidicola* e *U. decumbens* é proveniente da FBN, ou seja, nas condições do estudo isso representa 30 a 45 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> em sistemas adubados. Já quando se testou 25 genótipos de *P. maximum*, Miranda et al. (1990) demonstraram que estes possuem capacidade de utilizar 16 a 49 % do N via FBN. Assim estas espécies têm potencial de fixar N para sua utilização, o que incrementa o teor do nutriente no solo. O presente trabalho mostrou no Capítulo 2 que a FBN de N está ocorrendo nas espécies testadas, apesar de ser sazonal. Assim, sem as estimativas de entrada de N proveniente da FBN, pode-se inferir que os déficits de N nos sistemas de produção testados podem ser menos negativos em função desta entrada não computada. Reis et al. (2001) observaram que cerca de 20% do N no tecido de *U. ruziziensis* e *U. brizantha* é proveniente da FBN. Por esse motivo deve-se intensificar as investigações no processo de FBN em sistemas de produção envolvendo gramíneas do gênero *Urochloa*.

O balanço mais negativo, dado pelo sistema de produção envolvendo o *P. maximum*, é resultado da maior produtividade de grãos que esse sistema apresentou (Capítulo 4). Entretanto deve-se salientar que o milho nessas proporções

foi quem determinou o balanço de N, uma vez que foi na produtividade de grãos que houveram as maiores diferenças em quantidade de N exportado (ANEXO G). Assim pode-se inferir que em sistemas com *P. maximum* a disponibilidade de N é mais favorável ao milho, que resulta em maior produtividade e maior quantidade de N a ser aplicado para suprir o balanço negativo de N.

A obtenção de balanço negativo no sistema de produção representa um déficit de N para as culturas em sucessão, sendo necessário corrigir esse déficit conforme a exigência da cultura a ser implantada. Por outro lado, quanto mais negativo o balanço de N for maior está sendo a exportação de N, que sendo via grãos, carne, forragem, entre outros, não é um resultado indesejável. Entretanto, um sistema de alta produtividade com balanço negativo tende a ter maior necessidade de adição de N para suprir o déficit deixado, exigindo maior investimento. Se o balanço mais negativo é causado por fontes de perdas, como lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , volatilização de  $\text{N-NH}_3$  e emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$ , a mitigação deve ser preconizada. O uso de espécies específicas pode ajudar na redução de perdas, como apontado por Byrnes et al. (2017), que utilizaram *U. humidicola* e um híbrido chamado Mulato (*U. ruziziensis* x *U. brizantha* cv. Marandú) com sucesso para diminuir a nitrificação do  $\text{N-NH}_4^+$  proveniente da urina de bovinos em áreas de pastagem, resultando em menor perda por desnitrificação. Castoldi et al. (2014) também apontam que o maior pico de perdas de N por volatilização de  $\text{N-NH}_3$  é após a dessecação, sendo que nesse caso poderia ser estudado uma nova forma de manejo para diminuir estas perdas.

## 5.5 Conclusão

*U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* apresentam o mesmo potencial de perdas de N por lixiviação de  $\text{N-NO}_3^-$ , emissão de  $\text{N-N}_2\text{O}$  e volatilização de  $\text{N-NH}_3$ , que somam o mesmo montante de N perdido.

Sistema de produção de milho com *P. maximum* tem balanço mais negativo em relação a *U. ruziziensis* e *U. brizantha*.

Doses crescentes de N diminuem o esgotamento de N do solo em sistemas de produção de forrageiras com milho.

## 5.6 Referências

- BODDEY, R. M. & VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using  $^{15}\text{N}$  labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v.90, n.1–3, p.265–292, 1986.
- BORGHI, E. & CRUSCIOL, C. A. C. Produtividade de milho, espaçamento e modalidade de consorciação com *Brachiaria brizantha* em sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.42, n.2, p.163–171, 2007.
- BOWDEN, R. D.; STEUDLER, P. A.; MELILLO, J. M. Annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soil in the northeastern United State. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v.95, p.13997-14005, 1990.
- BYRNES, R. C.; NÚÑEZ, J.; ARENAS, L.; RAO, I.; TRUJILLO, C.; ALVAREZ, C.; ARANGO, J.; RASCHE, F.; CHIRINDA, N. Biological nitrification inhibition by *Brachiaria* grasses mitigates soil nitrous oxide emissions from bovine urine patches. **Soil Biology & Biochemistry**, v.107 p.156-163, 2017.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.7, p.375-470.
- CASTOLDI, G. **Dinâmica do nitrogênio em sistemas de produção sob semeadura direta**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2014, 134p.
- CASTOLDI, G.; PIVETTA, L.A.; ROSOLEM, C.A. Nitrogen budget in the soil-plant system after *brachiaria* grasses desiccation. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.60, p. 162-172, 2014.
- CARMO, J. B. do, ANDRADE, C. A. de, CERRI, C. C., PICCOLO, M de C. Disponibilidade de nitrogênio e fluxos de  $\text{N}_2\text{O}$  a partir de solo sob pastagem após aplicação de herbicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.735-746, 2005.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1999. 412p.
- FARQUHAR, G. D.; FIRTH, P. M.; WETSELAAR, R.; WEIR, B. On the gaseous exchange of ammonia between leaves and the environment: Determination of the ammonia compensation point. **Plant Physiology**, v.66, p.710-714, 1980.
- FERNANDES, A. M.; ANDRADE, G. J. M. de; SOUZA, E. de F. C. de; ROSOLEM, A. *Brachiaria* species affecting soil nitrification. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, n.1, p.1699–1706, 2011.

FRANCO, H. C. J.; DAMIN, V.; FRANCO, A.; MORAES, M. F.; TRIVELIN, P. C. O. Perda de nitrogênio pela *Brachiaria decumbens* após a antese: relação com a umidade do solo. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.96-102, 2008.

FREITAS, F. C. L.; SANTOS, M. V.; MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L. R.; FREITAS, M. A. M.; SILVA, M. G. O. Comportamento de Cultivares de Milho no Consórcio com *Brachiaria brizantha* na Presença e Ausência de Foramsulfuron + Iodosulfuron-Metil para o manejo da Forrageira. **Planta Daninha**, v.26, n.C, p.215–221, 2008.

GAVA, G. J. de C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. de A. Balanço do nitrogênio da uréia ( $^{15}\text{N}$ ) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, v.65, n.3, p.477-486, 2006.

JAGGER, M.; RICHARDS, K. Temporal Analysis I: Quantifying and Comparing Epidemics. In: **The Study of Plant Disease Epidemics**. The American Phytopathological Society, 2nd Printing, 2008.

KEENEY, D. R. & NELSON, D. W. Nitrogen: inorganic forms. In: PAGE AL; MILLER RH; KEENEY DR. 2nd ed. **Methods of soil analysis**. Madison: American Society of Agronomy, p. 625-642, 1982.

LA SCALA JUNIOR, N.; LOPES, A.; SPOKAS, K.; ARCHER, D. W.; REICOSKY, D. First-order decay models to describe soil C-CO<sub>2</sub> loss after rotary tillage. **Scientia Agricola**, v.66, n.5, p.650-657. 2009.

MARQUES, L. M. **Antecipação de nitrogênio para a cultura do milho em sucessão a gramíneas forrageiras no sistema plantio direto**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015, 47p.

MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, n.5, p.657–663, 1990.

OLIVEIRA, J. P. de; Chaves, L. J.; Duarte, J. B.; Brasil, E. M.; Ferreira Junior, L. T.; Ribeiro, K. de O. Teor de proteína no grão em populações de milho de alta qualidade protéica e seus cruzamentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, n.1, p.45-51, 2004.

QIU, X.; LIU, G; ZHU, Y. Determination of Water-soluble Ammonium Ion in Soil by Spectrophotometry. **Analyst**. v.112, p.909-911, 1987.

RAIJ, B., QUAGGIO, J.A., DA SILVA, N.M. Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by an ionexchange resin procedure. **Commun. Soil Science and Plant Analysis**. v.17, p.547-566. 1986.

RAIJ B. VAN; ANDRADE JC; CANTARELLA H; QUAGGIO JA. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. 285 p.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas : Instituto Agrônômico, 1996. 285p. (IAC. Boletim técnico, 100).

RITCHIE, S.W., HANWAY, J.J. **How a corn plant develops**. Special report 48. Iowa State University of Science and Technology, Ames. 1986.

REIS, V. M.; REIS JR, F. B. dos; QUESADA, D. M; OLIVEIRA, O. C. A. de; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.837–844, 2001.

RODRIGUES, A. M.; CECATO, U.; FUKUMOTO, N. M.; GALBEIRO, S.; SANTOS, G. T. DOS; BARBERO, L. M. Concentrações e quantidades de macronutrientes na excreção de animais em pastagem de capim-mombaça fertilizada com fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.6, p.990–997, 2008.

ROSOLEM, C. A.; FOLONI, J. S. S.; OLIVEIRA, R. H. de. Dinâmica do nitrogênio no solo em razão da calagem e adubação nitrogenada, com palha na superfície. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.2, p.301-309, 2003.

ROSOLEM, C. A. ; PACE, L. ; CRUSCIOL, C.A.C. Nitrogen management in maize cover crop rotations. **Plant and Soil**, v.264, n.1/2, p.261-271, 2004.

SHAW, R. D.; TRIMBEE, A. M.; MINTY, H.; FRICKER, H.; PREPAS, E.E. Atmospheric deposition of phosphorus and nitrogen in central Alberta with emphasis on Narrow Lake. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.43, p.119-134, 1989.

SILVA, I. R. da & MENDONÇA, E. de S. Matéria Orgânica do Solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.6, p.275-374.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, n.41, p.17302-17307, 2009.

SUBBARAO, G. V; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; SAHRAWAT, K. L.; ANDO, Y.; KAWASHIMA, T. Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N<sub>2</sub>O emissions in pasture crop-livestock systems. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v.7, n.2, p.322–332, 2013.

USDA, United States Department of Agriculture. **Keys to Soil Taxonomy**, Eleventh Edition, 2010. 338p.

VOLK, G. Volatile loss of ammonia following surface application of urea to turf or bare soil. **Agronomy Journal**, v.51, p.746-749, 1959.

WALKLEY, A. & BLACK, I.A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v.37, p.29-38. 1934.

## DISCUSSÃO GERAL

Sistemas de produção com alta resposta a N são mais sensíveis a fatores que afetam a disponibilidade do nutriente, como exsudação de compostos por raízes de plantas. Subbarao et al. (2009;2007) comprovaram que a *Urochloa humidicola* inibe o processo de nitrificação através da exsudação de uma substancia chamada Brachialactone, aumentando a relação  $N-NH_4^+/N-NO_3^-$  do solo (SUBBARAO et al., 2013). Entretanto Castoldi et al. (2013) não conseguiram demonstrar esse efeito em solos com pH mais alto e mais ricos em N em relação ao presente estudo. Assim, a dinâmica do N no solo é de difícil interpretação e generalização de recomendações de manejo dos sistemas de produção, pois sua disponibilidade pode variar facilmente de acordo com as condições edafoclimáticas, que pode até ocasionar perdas de N.

No presente trabalho, as perdas de N por lixiviação de  $N-NO_3^-$  e por emissão de  $N-N_2O$  foram muito pequenas. Apesar de que a perda por volatilização de  $N-NH_3$  ser de apenas  $12 \text{ kg ha}^{-1}$  de N em todo período de desenvolvimento das gramíneas forrageiras e do milho, foi 600% maior do que a perda de N por lixiviação de  $N-NO_3^-$  e emissão de  $N-N_2O$  somadas. Castoldi (2014) observou perdas de N por volatilização de  $N-NH_3$  variando de 11 a  $17 \text{ kg ha}^{-1}$  em sistemas de produção de soja rotacionado com *U. ruziziensis* e sorgo granífero. Castoldi et al. (2014) observaram maiores perdas de  $N-NH_3$  por volatilização ao medir essa perda após a dessecação de *U. brizantha* e *U. ruziziensis*, mas não observaram diferença entre as espécies. No presente trabalho, onde foram avaliadas as perdas de  $N-NH_3$  em todo ciclo das forrageiras e do milho, também não foram observadas diferenças entres as espécies de gramíneas forrageiras, indicando que este não é o mecanismo que diminui a oferta de N para o milho em sucessão.

Efeito de alelopatia também não foi o motivo da diminuição da oferta de N em sistema de rotações de gramíneas forrageiras com milho. Isso foi evidenciado ao se utilizar o sulfato de amônio marcado com  $^{15}N$  e observar que o aproveitamento do fertilizante pelo milho foi igual, independente da gramínea forrageira que o precedeu. Rosolem et al. (2012) também observaram que o fertilizante nitrogenado pode recuperar a diminuição da oferta de N causada por efeito do cultivo de gramíneas forrageiras. Entretanto, Souza et al. (2006) e Souza et al. (2014) demostram que a alelopatia ocorre e que pode diminuir o potencial produtivo da cultura em sucessão.

Durante o cultivo das gramíneas forrageiras, a atividade microbiana mostrou comportamento sazonal quanto à quantidade de microrganismos atuantes na FBN, *Achaea* e *Bacteria* totais e participantes do primeiro processo de oxidação do N- $\text{NH}_4^+$  (nitrificadores), bem como microrganismos amonificantes. Entretanto, os resultados mais expressivos foram observados sobre a atividade de FBN, que para *U. ruziziensis* apresentou picos de atividade durante seu desenvolvimento. Evidências de FBN, com cultivo de *P. maximum*, foram reportadas por Miranda et al. (1990) que, ao testar 25 genótipos de *P. maximum*, demonstraram que estes possuem capacidade de adquirir de 16 a 49 % do N via FBN. Já para o gênero *Urochloa*, Boddey & Victoria (1986) concluíram que cerca de 30 a 40% do N em plantas de *U. humidicola* e *U. decumbens* seria proveniente da FBN, ou seja, em torno de 30 a 45 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Entretanto, quando o milho foi cultivado após *U. ruziziensis*, a produtividade foi menor em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*, de modo que esta espécie pode fixar N mas, de alguma forma o nutriente não é absorvido pelo milho.

Ao observar o balanço de N nos sistemas de produção testados, pôde-se observar déficit de N, de forma geral, independente da espécie de gramíneas forrageira ou dose de N aplicada ao milho. Isso indica que pode haver uma entrada de N não computada, que seria FBN, ou que o solo, mesmo em condições de alta resposta a N conseguiu suprir a cultura do milho. Entretanto quando o estoque de N-total é levado em consideração, foi observado incremento de N-total no solo para *U. ruziziensis* e *P. maximum* após 16 meses de experimento. Assim, comprova-se que a FBN deve ser levada em conta em balanço de N em sistemas de produção com gramíneas forrageiras.



## CONCLUSÃO GERAL

O processo de amonificação não é diminuído no solo cultivado com *U. ruziziensis*, mas o milho cultivado após esta espécie produz menos em relação a *U. brizantha* e *P. maximum*.

Em sistemas de produção de alta resposta a N, o cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, mesmo com a adição de até 210 kg ha<sup>-1</sup> de N, não diferem em potencial de provocar perdas de N por lixiviação de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, emissão de N-N<sub>2</sub>O e volatilização de N-NH<sub>3</sub>.

A recuperação do N aplicado via fertilizante pelo milho foi de apenas 35%, indicando que 65% do N utilizado pelo milho é proveniente do N do solo e assim tendo alta dependência da dinâmica das gramíneas forrageiras sobre a disponibilidade de N em sistemas integrados de produção.

As evidências de que a FBN está ocorrendo em sistemas de produção com *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum*, aumentando a quantidade de nitrogênio total no solo, mostram uma importante entrada de N no sistema de produção.

Mais estudos devem ser conduzidos em sistemas de produção em clima tropical com gramíneas do gênero *Urochola* a fim de observar com mais detalhes o processo de FBN e processos de nitrificação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no solo cultivado com estas gramíneas.

## REFERÊNCIAS

- BODDEY, R. M. & VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using  $^{15}\text{N}$  labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v.90, n.1–3, p.265–292, 1986.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., 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 do Solo, 2007. Cap.7, p.375-470.
- CASTOLDI, G. **Dinâmica do nitrogênio em sistemas de produção sob semeadura direta**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2014, 134p.
- CASTOLDI, G.; PIVETTA, L.A.; ROSOLEM, C.A. Nitrogen budget in the soil-plant system after *brachiaria* grasses desiccation. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.60, p. 162-172, 2014.
- CASTOLDI, G.; REIS, J. G. dos; PIVETTA, L. A.; ROSOLEM, C. A. Soil nitrogen dynamics after *brachiaria* dissection. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, n.1, p.1620–1627, 2013.
- ECHER, F. R.; CASTRO, G. S. A.; BOGIANI, J. C.; ROSOLEM, C. A. Crescimento inicial e absorção de nutrientes pelo algodoeiro cultivado sobre a palhada de *Brachiaria ruziziensis*. **Planta Daninha**, v.30, n.4, p.783–790, 2012.
- MARQUES, L. M. **Antecipação de nitrogênio para a cultura do milho em sucessão a gramíneas forrageiras no sistema plantio direto**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2015, 47p.
- MIRANDA, C. H. B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the  $^{15}\text{N}$  isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 657–663, 1990.
- ROSOLEM, C. A.; STEINER, F.; ZOCCA, S. M.; DUCATTI, C. Nitrogen Immobilization by Congo Grass Roots Impairs Cotton Initial Growth. **Journal of Agricultural Science**, v.4, n.9, p.126-136, 2012.
- SOUZA, E. F. C.; FERNANDES, A. M.; SOUZA-SCHLICK, G. D.; ROSOLEM, C. A. Early growth of common bean cropped over ruzigrass residues. **Planta Daninha**, v.32, n.4, p.775-781, 2014.
- SOUZA, L. S.; VELLINI, E. D.; MARTINS, D.; ROSOLEM, C. A. Efeito Alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**, v.24, n.4, p.657–668, 2006.
- SUBBARAO, G. V. RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W. L. BIOLOGICAL NITRIFICATION INHIBITION (BNI) – is it a widespread phenomenon? **Plant Soil**, v.294, p.5-18, 2007.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY, W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.106, n.41, p.17302-17307, 2009.

SUBBARAO, G. V; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; SAHRAWAT, K. L.; ANDO, Y.; KAWASHIMA, T. Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N<sub>2</sub>O emissions in pasture crop-livestock systems. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v.7, n.2, p.322–332, 2013.

ÚLEHLOVÁ, B.; KUNC, F.; VANCURA, V. Nutrition and energy sources of microbial populations in ecosystems. In: VANCURA, V.; KUNC, F. **Soil Microbial Associations**, New York: Elsevier. Cap.2, p.15-156, 1988.

**ANEXO A – Medidas de umidade do solo (A) e amostragem de solução do solo (B) para estimar lixiviação de nitrato, amostragem de gás (C) para estimativas de emissão de óxido nitroso, coletor de amônia (D) para estimativas de volatilização e amostragem de solo (E) para estimar N-mineral, N- total e atividade microbiana do ciclo do nitrogênio.**

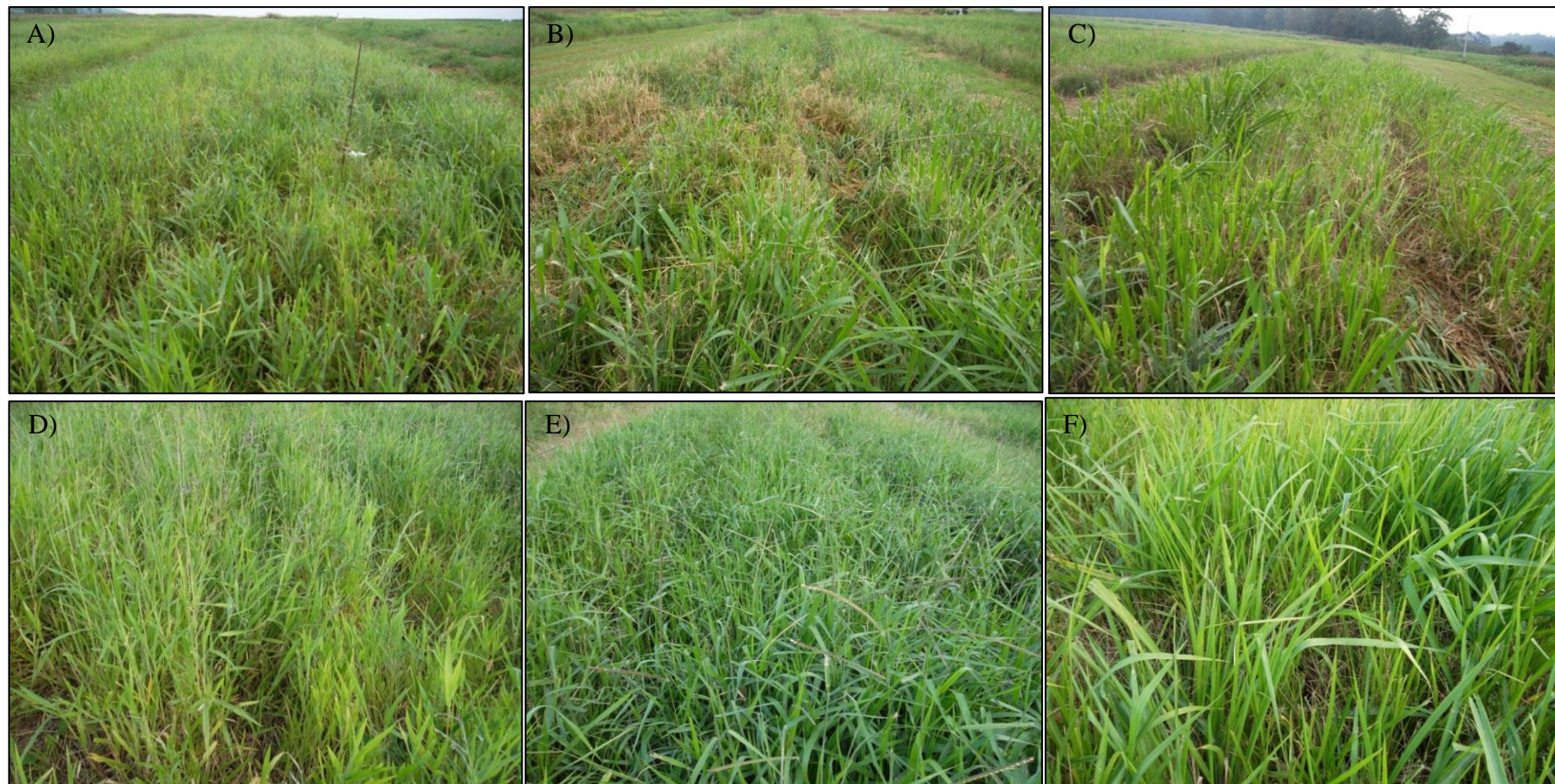


**ANEXO B – pH (CaCl<sub>2</sub>) do solo nas camadas de 0,00-0,10, 0,10-0,20, 0,20-0,40, 0,40-0,60 e 0,60-0,80 m de profundidade após o cultivo de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* por 11 meses e um cultivo de milho adubado com 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.**

Espécie	pH inicial	Dose de N kg ha <sup>-1</sup>	Profundidade (m)				
			0,0–0,1	0,1–0,2	0,2–0,4	0,4–0,6	0,6–0,8
<i>U. ruziziensis</i>	5,49	0	5,0	5,0	4,6	4,7	4,5
		70	5,4	5,3	5,0	4,8	4,7
		140	5,3	5,1	4,8	4,8	4,7
		210	5,0	5,0	4,8	4,7	4,4
<i>U. brizantha</i>	5,57	0	5,6	5,4	5,0	4,9	4,7
		70	5,5	5,3	5,1	5,0	5,0
		140	5,4	5,1	4,9	4,9	4,7
		210	5,4	5,1	4,8	4,8	4,5
<i>P. maximum</i>	5,66	0	5,6	5,2	4,9	4,7	4,5
		70	5,3	5,1	4,9	4,8	4,8
		140	5,7	5,5	5,0	5,0	4,9
		210	5,6	5,5	5,1	4,9	4,8

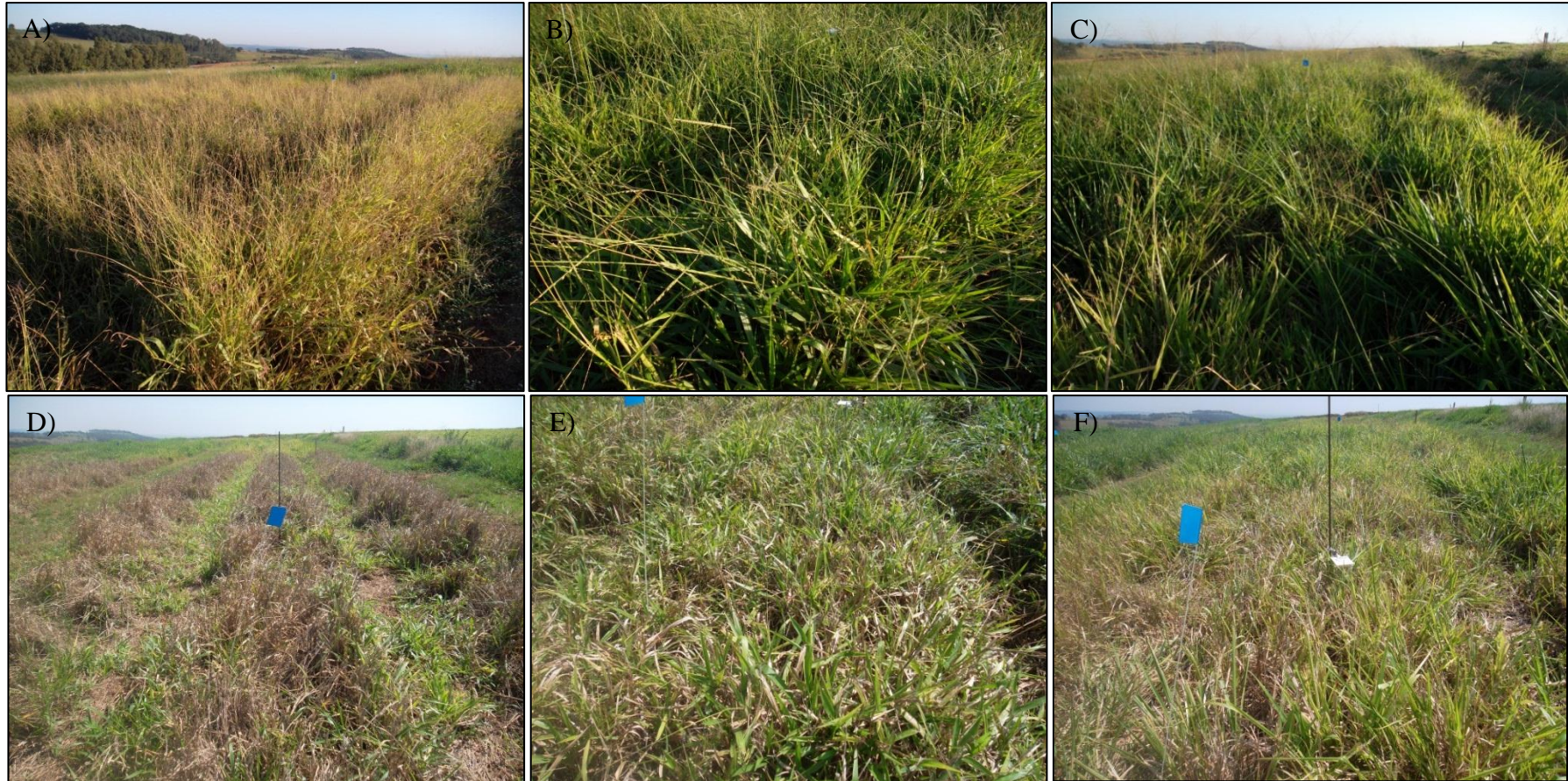


**ANEXO C – Estágios de desenvolvimento da *U. ruziziensis* (A e D), *U. brizantha* (B e E) e *P. maximum* (C e F) aos 5 (A, B e C) e aos 6 (D, E e F) meses após a semeadura.**





**ANEXO D – Estágios de desenvolvimento da *U. ruziziensis* (A e D), *U. brizantha* (B e E) e *P. maximum* (C e F) aos 8 (A, B e C) e aos 11 (D, E e F) meses após a semeadura.**





**ANEXO E – Dessecação das gramíneas forrageiras (A), semeadura (B) e colheita (C) do milho.**



**ANEXO F – Milho cultivado após *U. ruziziensis* (A), *U. brizantha* (B) e *P. maximum* (C) sem nitrogênio a frente e com 140 kg ha<sup>-1</sup> ao fundo aos 50 dias após a semeadura.**





**ANEXO G – Entradas, saídas e balanço de nitrogênio em sistemas de produção com rotações de *U. ruziziensis*, *U. brizantha* e *P. maximum* com milho fertilizado com 0, 70, 140 e 210 kg N ha<sup>-1</sup>.**

Espécie	----- Entradas -----		----- Saídas -----			Balanço
	Fertilizante	Chuva	Gramíneas	Grãos de milho	Perdas	
----- N (kg ha <sup>-1</sup> ) -----						
<i>U. ruziziensis</i>	0			-26	-13	-84
	70			-54	-13	-42
	140	5,80	-50,8	-101	-12	-18
	210			-150	-13	2
<i>U. brizantha</i>	0			-29	-13	-86
	70			-61	-13	-48
	140	5,80	-49,8	-106	-13	-23
	210			-153	-13	-1
<i>P. maximum</i>	0			-37	-13	-94
	70			-77	-13	-65
	140	5,80	-50,4	-103	-12	-20
	210			-173	-13	-21

