

BRUNO GAZOLA

**DESTINO DO NITROGÊNIO APLICADO AO MILHO SEGUNDA SAFRA E SEU
EFEITO NA SOJA CULTIVADA EM SEGUIDA**

Botucatu

2022

BRUNO GAZOLA

**DESTINO DO NITROGÊNIO APLICADO AO MILHO SEGUNDA SAFRA E SEU
EFEITO NA SOJA CULTIVADA EM SEGUIDA**

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Doutor em Agronomia -
Agricultura.**

Orientador: Ciro Antonio Rosolem

Coorientador: Eduardo Mariano

Botucatu

2022

G291d

Gazola, Bruno

Destino do nitrogênio aplicado ao milho segunda safra e seu efeito na soja cultivada em seguida / Bruno Gazola. -- Botucatu, 2022

111 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu

Orientador: Ciro Antonio Rosolem

Coorientador: Eduardo Mariano

1. Desnitrificação. 2. Fertilizante marcado. 3. Absorção de nitrogênio. 4. Perdas de nitrogênio. 5. Zea mays L.. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESTINO DO NITROGÊNIO APLICADO AO MILHO SEGUNDA SAFRA E SEU EFEITO
NA SOJA CULTIVADA EM SEGUIDA

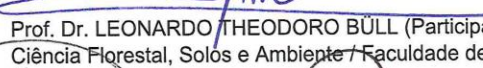
AUTOR: BRUNO GAZOLA

ORIENTADOR: CIRO ANTONIO ROSOLEM

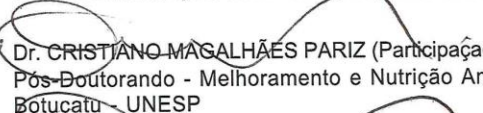
COORIENTADOR: EDUARDO MARIANO

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


Prof. Dr. CIRO ANTONIO ROSOLEM (Participação Presencial)
Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


Prof. Dr. LEONARDO THEODORO BULL (Participação Presencial)
Ciência Florestal, Solos e Ambiente / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP


PROF. DR. GUSTAVO CASTOLDI (Participação Virtual)
POLO DE INOVAÇÃO / INSTITUTO FEDERAL GOIANO


Dr. CRISTIANO MAGALHÃES PARIZ (Participação Virtual)
Pós-Doutorando - Melhoramento e Nutrição Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de
Botucatu - UNESP


Dra. CAMILA DA SILVA GRASSMANN (Participação Virtual)
Morrinhos/GO / Bayer Crop Science

Botucatu, 01 de julho de 2022

*Dedico a realização deste trabalho a minha esposa Juliane e a meus pais,
José Luiz e Aparecida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela imensa fonte de sabedoria, por me capacitar a cada dia, por ser o único e real sentido da minha vida.

A minha amada esposa, por toda a parceria, paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Aos meus familiares, pais e irmãos pelo berço da criação, por serem fonte de inesgotável amor e amparo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Antonio Rosolem, pela confiança a mim depositada, oportunidade do aprendizado, por acreditar no meu projeto e pela amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eduardo Mariano, por todos os momentos de aprendizagem, por acreditar em meu potencial e pela amizade.

Aos colaboradores e amigos do Departamento de Produção Vegetal – FCA: Iara, Vinícius, Júlia, Thaís, Dariele, Eliane, Adelina, Valéria, Ciro e Casemiro. Aos alunos estagiários José Barros, Gabriel Bueno e Matheus Cipriano. Obrigado por toda a colaboração e apoio.

Aos amigos da Pós-graduação: Camila Grassmann, Maria Gabriela, Gustavo Dario, Jonas Ferrari, Sérgio Freitas, Laudelino Mota, Jesion Jeibel, Jason Geter. Obrigado por todo apoio, especialmente nos momentos em que julguei não conseguir alcançar meus objetivos.

A UNESP/FCA, instituição a qual sinto orgulho em pertencer, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Agricultura, nas pessoas de todos os colaboradores e docentes.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Bolsa de doutorado - Processo nº 2018/15867-3).

A todos os membros do NUCLEUS: Um centro conjunto virtual para oferecer eficiência aprimorada de uso de N por meio de uma abordagem integrada de sistemas solo-

planta para o Reino Unido e o Brasil. Financiado no Brasil pela FAPESP–Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (número de concessão 2015/50305-8)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos, que direta ou indiretamente colaboraram para o êxito desta pesquisa, agradeço.

RESUMO

O milho segunda safra apresenta potencial para semeadura em consórcio com forrageiras do gênero *Urochloa* spp. e *Megathyrsus* spp., as quais podem modificar a população microbiana da rizosfera e afetar a dinâmica do nitrogênio (N) no sistema de produção. Esse manejo melhora as condições nutricionais do sistema, e a disponibilidade de N através da ciclagem do nutriente pelos resíduos, podendo ocorrer redução nas perdas de NO_3^- por lixiviação e de óxido nitroso (N_2O). A ciclagem de N favorece a nutrição do milho (*Zea mays* L.), no entanto as quantidades de N fertilizante absorvida por essa cultura em consórcio com forrageiras ainda necessitam ser esclarecidas. Estudos que explorem melhor o potencial agrônomo de forrageiras com o milho, e soja semeada em sucessão são de extrema importância. Para confirmar a hipótese de que as forrageiras apresentam capacidade de melhorar a ciclagem do N, atuando na diminuição das perdas, foram conduzidos estudos entre os anos de 2018 e 2021 em Botucatu, com os objetivos de (1) avaliar a influência das forrageiras no número de cópias dos principais genes relacionados ao ciclo do N e na emissão de N_2O na soja (Capítulo 1), (2) verificar se o consórcio milho – forrageira interfere na recuperação de ^{15}N fertilizante aplicado na safra e o destino do ^{15}N na soja em sucessão (Capítulo 2), e (3) avaliar se o consórcio mitiga as emissões de N_2O e qual a influência nas perdas de NH_3 (Capítulo 3). Para atingir os objetivos propostos foram realizados os seguintes experimentos de campo. Estudo 1; em janeiro de 2018 foi realizada a semeadura das forrageiras *Megathyrsus maximus* (Tanzânia) e *Urochloa ruziziensis* (Ruziziensis comum) que foram conduzidas durante sete meses, o experimento contou também com um manejo sem forrageira. Em sequência ocorreu a semeadura da soja referente a safra 18-19. Para avaliação da abundância de genes foi realizada a amostragem de solo em setembro, outubro de 2018 e janeiro de 2019 e durante o ciclo da soja 18-19 foi realizada a amostragem da emissão de N_2O . Estudos 2 e 3; após a retirada da soja 18-19, em fevereiro de 2019 foi realizada a semeadura do milho segunda safra consorciado com as forrageiras e solteiro. A partir desta safra o experimento teve subparcelas referentes às doses de 120 kg ha^{-1} de N e o controle sem N. O manejo com milho segunda safra e soja verão foi realizado por dois anos agrícola, safras 19-20 e 20-21. No estudo 2 foram avaliados o destino do ^{15}N no sistema solo-planta nas safras de milho e soja, com coletas de plantas e solos. Para o estudo 3 foram realizadas amostragens da emissão de gases de efeito estufa

e NH_3 durante o ciclo das culturas e na entressafra, com maior intensidade após a semeadura e adubação de cobertura com N no milho. A abundância de genes AOA prevaleceu sobre a AOB, e a soja cultivada sobre essas forrageiras emitiram mais N_2O . Quando absorvido pelo milho o ^{15}N fertilizante apresentou como principal destino os grãos, no entanto, o solo ainda é o maior reservatório de ^{15}N fertilizante nas safras de soja. Maiores perdas de N_2O ocorreram no início do experimento em decorrência da movimentação do solo na semeadura, e ao longo do experimento houve predominância de absorção de CH_4 . Os sistemas com forrageiras não diminuíram o número de cópias de AOB ou AOA, no entanto, essas apresentam boa capacidade de absorção do N, armazenando este na sua parte aérea, possibilitando maior absorção pela soja cultivada em sucessão. O CH_4 não é menos absorvido com milho fertilizado e soja em rotação, enquanto a principal via de perda gasosa de N é por volatilização de NH_3 no manejo com e sem forrageira.

Palavras-chave: ciclo do N; sistemas de rotação; nitrificação; N_2O ; ^{15}N fertilizante.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) second crop has potential for sowing in intercropping with forages of the genus *Urochloa* spp. and *Megathyrsus* spp., which can modify the microbial population of the rhizosphere and affect the dynamics of nitrogen (N) in the production system. This management improves the nutritional conditions of the system, and the availability of N through the cycling of the nutrient by the residues, and there may be a reduction in the losses of NO_3^- by leaching and nitrous oxide (N_2O). The N cycling favors the nutrition of maize, however the amount of N fertilizer absorbed by this crop in intercropping with forage still need to be clarified. Studies that better explore the agronomic potential of forages with maize and soybeans sown in succession are extremely important. To confirm the hypothesis that forages have the ability to improve N cycling, acting to reduce losses, studies were conducted between 2018 and 2021 in Botucatu, with the objectives of (1) evaluate the influence of forages on the number of copies of the main genes related to the N cycle and N_2O emission in soybean (Chapter 1), (2) to verify if the maize - forage intercrop interferes in the recovery of ^{15}N fertilizer applied in the crop and the fate of ^{15}N in soybean in succession (Chapter 2), and (3) assess whether the consortium mitigates N_2O emissions and what influence it has on NH_3 losses (Chapter 3). To achieve the proposed objectives, the following field experiments were carried out. Study 1; in January 2018, the sowing of the forages *Megathyrsus maximus* (Guinea grass) and *Urochloa ruziziensis* (Ruzigrass - common) was carried out, which were conducted for seven months, the experiment also had a management without forage. In sequence, the sowing of soybeans for the 18-19 harvest took place. To evaluate gene abundance, soil collection was carried out in September, October 2018 and January 2019 and during the soybean cycle 18-19, sampling of N_2O emission was carried out. Studies 2 and 3; After the removal of soybean 18-19, in February 2019, second crop maize was sowed intercropped with forages and single. From this season, the experiment started to have subplots referring to doses of 120 kg ha^{-1} of N and the control without N. The management with second crop maize and summer soybean was carried out for two crop years, 19-20 and 20-21. In study 2, the fate of ^{15}N in the soil-plant system in maize and soybean crops was evaluated, with plant and soil collections. For study 3, greenhouse gas and NH_3 emissions were collected during the crop cycle and in the off-season, with greater intensity after sowing and topdressing with N in maize. The abundance of AOA genes

prevailed over AOB and soybeans cultivated on these forages emitted more N_2O . When absorbed by maize, the ^{15}N fertilizer presented grains as its main destination, however the soil is still the largest reservoir of ^{15}N fertilizer in soybean crops. Higher N_2O losses occurred at the beginning of the experiment, and throughout the experiment there was a predominance of CH_4 absorption. The system with forages did not reduce the number of copies of AOB or AOA, however these have a good capacity for N absorption, storing it in their shoots, allowing a greater absorption by the soybean cultivated afterwards. CH_4 is no less absorbed with fertilized maize and soybeans in rotation, while the main route of gaseous N loss is by volatilization of NH_3 in species managed with and without forage.

Keywords: N cycle; rotation systems; nitrification; N_2O ; ^{15}N fertilizer.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO 1 - INFLUÊNCIA DO MANEJO NA ABUNDÂNCIA DE GENES RELACIONADOS COM O CICLO DO NITROGÊNIO E EMISSÃO DE N ₂ O .	18
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1.1 INTRODUÇÃO	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	21
1.2.1 Descrição do local.....	21
1.2.2 Design experimental e gerenciamento da safra	23
1.2.3 Amostragem de solo	24
1.2.4 Avaliação laboratorial da nitrificação do solo	24
1.2.5 Isolamento de DNA e PCR quantitativo em tempo real.....	25
1.2.6 Análise química do solo	25
1.2.7 Amostragem de N ₂ O e medições auxiliares.....	26
1.2.8 Determinação de matéria seca da biomassa e produtividade da soja	27
1.2.9 Análise estatística	28
1.3 RESULTADOS.....	28
1.3.1 Genes relacionados ao ciclo do N e taxa de nitrificação líquida	28
1.3.2 Emissão de N ₂ O, matéria seca da biomassa e produtividade da soja.....	32
1.3.3 Correlações entre os genes do ciclo do N e propriedades químicas do solo	33
1.4 DISCUSSÃO	36
1.5 CONCLUSÕES	39
Referências	40
Material suplementar.....	46
CAPÍTULO 2 - FERTILIZAÇÃO COM ¹⁵ N EM FORRAGEIRAS CONSORCIADA COM MILHO E A RECUPERAÇÃO PELA SOJA EM SUCESSÃO.....	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
2.1 INTRODUÇÃO	50
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.2.1 Descrição do estudo	51
2.2.2 Design de estudo.....	52
2.2.3 Condução das culturas.....	53
2.2.4 Microparcelas com ¹⁵ N fertilizante.....	54
2.2.5 Procedimento de amostragem e análises ¹⁵ N.....	55
2.2.6 Cálculos e análises estatísticas	56
2.3 RESULTADOS.....	57
2.3.1 Distribuição e destino do ¹⁵ N fertilizante aplicado no milho e do ¹⁵ N residual na soja.....	57

2.3.2	Porcentagem de ¹⁵ N-fertilizante recuperado no solo nas safras de milho e ¹⁵ N-residual recuperado no solo nas safras de soja	59
2.3.3	Produção de matéria seca da biomassa de plantas	63
2.4	DISCUSSÃO.....	67
2.4.1	N derivado do fertilizante e recuperação de ¹⁵ N na planta.....	67
2.4.2	N derivado do fertilizante e recuperação de ¹⁵ N no solo	70
2.5	CONCLUSÕES.....	70
	Referências	71
	Material suplementar	76
	CHAPTER 3 - ¹⁵ GREENHOUSE GASES EMISSION AND AMMONIA VOLATILIZATION FROM A SOYBEAN-MAIZE/FORAGE ROTATION UNDER NO-TIL.....	79
	ABSTRACT	79
3.1	INTRODUCTION	79
3.2	MATERIAL AND METHODS.....	81
3.2.1	Local characterization, treatments and statistical design	81
3.2.2	Conducting the experiment.....	82
3.2.3	Gas sampling and analysis	82
3.2.4	Ammonia sampling and Analysis.....	83
3.2.5	Dry matter and grain production	84
3.2.6	Soil nitrate and ammonium sampling and analysis.....	84
3.2.7	Calculations and statistics.....	84
3.3	RESULTS	86
3.3.1	Environmental conditions and soil properties	86
3.3.2	Emissions of nitrous oxide, methane, carbon dioxide and ammonia	86
3.3.3	N-mineral content in the soil.....	88
3.4.	DISCUSSION.....	88
3.4.1	GHG flux and ammonia volatilization.....	88
3.4.2	Cumulative emissions	89
3.4.3	Normalized emissions	91
3.5	CONCLUSIONS	92
	References	93
	Supplementary material	105
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS	1099

INTRODUÇÃO GERAL

O nitrogênio (N) pode ingressar no sistema solo-planta por fertilizantes, fixação biológica ou deposições atmosféricas, e pode sair do agroecossistema via lixiviação de nitrato (N-NO_3^-), emissão de óxido nitroso ($\text{N-N}_2\text{O}$), volatilização de amônia (N-NH_3), erosão e remoção pelas culturas.

A principal fonte de N para as plantas é a matéria orgânica do solo (MOS), através da sua mineralização (EPSTEIN et al., 1972). A direção dos processos de imobilização–mineralização é dependente do conteúdo de N no material vegetal, relação C/N, quantidade de N no sistema, temperatura, aeração, umidade e pH do solo (ROSOLEM; PACE; CRUSCIOL, 2004). O processo de mineralização se dá inicialmente pela oxidação do N orgânico à NH_3 por microrganismos amonificadores. A NH_3 é então transformada em amônio (N-NH_4^+) pela reação com um próton de hidrogênio. A nitrificação, é um processo dependente da amonificação ou de alguma fonte que forneça NH_4^+ . Em meio aeróbico, ocorre a oxidação do NH_4^+ à nitrito (N-NO_2^-) por bactérias do gênero *Nitrosomonas*. O NO_2^- é rapidamente oxidado por bactérias do gênero *Nitrobacter* e *Nitrospira*, obtendo-se assim o NO_3^- . Por ser um cátion, o NH_4^+ pode ser adsorvido aos sítios de troca catiônica, aumentando assim seu tempo de residência no solo em comparação ao NO_3^- , um ânion livre que pode ser deslocado mais facilmente (ROSOLEM; FOLONI; OLIVEIRA, 2003).

A ocorrência de microsítios anaeróbios podem resultar na utilização do NO_3^- como fonte aceptora de elétrons por bactérias anaeróbias facultativas. Este ânion é então reduzido a forma volátil, como óxido nitroso ($\text{N-N}_2\text{O}$) e perdido para a atmosfera (SUBBARAO et al., 2013). Além das saídas por lixiviação e emissão de gases por desnitrificação, a volatilização de NH_3 oriundo de fertilizantes nitrogenados e durante a senescência dos vegetais também é de importância econômica e ambiental no ciclo do N (CANTARELLA, 2007). Todas as vias de perdas acima descritas implicam em menor eficiência de uso do N pelas culturas.

Dentre as entradas de N no sistema, a fixação biológica do N_2 atmosférico é um importante processo de conversão do N reativo à NH_3 , ocorrendo por microrganismos em associação simbiótica com as plantas, como também bactérias de vida livre não-simbiontes (VITTI; HEIRINCHS, 2007). O N pode entrar também na forma de óxidos depositado ao solo pela ação de chuvas, como também pode haver contribuição por descargas elétricas e deposição de poeira. Para a soja [*Glycine max* (L) Merrill], o N

é o nutriente mais requerido, principalmente devido ao elevado teor de proteína nos grãos, que pode chegar a 40 g kg⁻¹ de N (TRZECIAK, 2012). Para suprir a elevada demanda a principal fonte de N para a soja é a fixação biológica de nitrogênio, realizada por bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, chegando a fornecer até 200 kg ha⁻¹ de N (UNKOVICH et al., 2008). A inoculação de sementes de soja com bactérias diazotróficas é um exemplo clássico de sucesso para a agricultura brasileira, pois a aplicação de fertilizante nitrogenado é dispensada, visto que a FBN supre a demanda do nutriente para a cultura (FAGERIA, 2014).

Contudo, o N proveniente da adubação realizada na safra antecessora pode complementar necessidade caso ocorra, principalmente na fase reprodutiva considerada o período de elevada demanda por N (AMADO; SCHLEINDWEIN; FIORIN, 2010; CÂMARA, 2014). A adubação com N em milho (*Zea mays* L.) segunda safra pode proporcionar aumentos de produtividade na safra de soja cultivada em sucessão (CAIONI et al., 2017), pois o N fertilizante residual que permanece no sistema após o cultivo de milho pode chegar a 50% do fertilizante aplicado (ROCHA et al., 2019).

Assim como para a soja, o N é o nutriente exigido em maior quantidade para o milho, em solos com baixa disponibilidade de N a adubação é indispensável para se obter altas produtividades, pois o aumento da produtividade do milho está diretamente relacionado à aplicação de N fertilizante (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000). O milho pode ser semeado em sucessão ou consórcio com forrageiras do gênero *Urochloa*, utilizadas em sistemas de integração lavoura pecuária (ILP). A ILP é um sistema de produção que possibilita alternar anos ou períodos de culturas graníferas, ou fibrosa com atividade pecuária (MACEDO, 2009). Os benefícios da ILP incluem a recuperação de pastagens degradadas, melhorias nos atributos químicos, físicos e biológicos do solo, (MACEDO, 2009; KLUTHCOUSKI; STONE, 2003) com intuito de recuperar e manter a produção de pastagem e grãos (BALBINO; BARCELLOS; STONE, 2011). Esse sistema de produção torna possível e promissor o cultivo de soja em áreas que estavam sendo ocupadas com pastagem ou cultivadas com forrageiras em consórcio com milho.

As forrageiras apresentam sistema radicular vigoroso, capaz de explorar profundamente o solo, diminuindo perdas de N e favorecendo a ciclagem e aproveitamento do fertilizante aplicado em safras anteriores, melhorando a eficiência de uso do adubo (ROSOLEM et al., 2018). Como desvantagem, a palha das

forrageiras, assim como os resíduos de raízes, podem resultar em imobilização microbiana do N mineral do solo, devido à alta relação C/N de seus resíduos vegetais (PERIN et al., 2004; ROSOLEM et al., 2012). Silgram e Shepherd (1999) postularam que os resíduos vegetais devem possuir ao menos 15 g kg⁻¹ de N para atender às necessidades dos microrganismos decompositores sem estes precisarem recorrer ao N mineral do solo. Os sistemas de produção com cultivo consorciado de milho e forrageira apresentam poucos relatos de redução na produtividade de grãos do milho devido à competição pelo N fertilizante exercida pela forrageira (KLUTHICOUSKI; AIDAR, 2003; BROCH; CECCON, 2007; CECCON et al., 2013).

Algumas espécies de manejo do gênero *Urochloa* (sin. *Brachiaria*) inibem a atividade de Nitrosomonas (ISHIKAWA et al., 2003; SUBBARAO et al., 2006), e a liberação de compostos no solo por forrageiras desse gênero pode afetar a biomassa microbiana do solo (ULEHLOVA; KUNC; VANCURA 1988). A supressão da conversão do NH₄⁺ a NO₃⁻ por compostos de plantas é usualmente denominada inibição biológica da nitrificação (SUBBARAO et al., 2009; SUBBARAO et al., 2012). A inibição da nitrificação tem sido descrita como medida oportuna para aumentar a eficiência de uso do N pelas culturas e também reduzir a poluição ambiental causada pela fertilização. Preservação do N mineral do solo na forma de NH₄⁺ pode favorecer a absorção de N pelo milho, e aumentar a eficiência de uso do nutriente e a produtividade da cultura (MORETA et al., 2020). Em adição, o bloqueio da nitrificação pelo cultivo de forrageiras pode ser útil na mitigação de perdas de N por N₂O, pois o NO₃⁻ está diretamente relacionado à ambos os processos (CAMERON; MOIR, 2013).

Diante do exposto, para confirmar a hipótese de que as forrageiras melhoram a ciclagem do N no sistema, atuando na diminuição das perdas em relação a um sistema sem forrageira, foram conduzidos estudos com os objetivos de verificar (i) a influência na comunidade microbiana relacionada ao ciclo do N no solo, (ii) a absorção de ¹⁵N fertilizante pelo milho e o destino do ¹⁵N na soja, (iii) e a emissão de gases do efeito estufa com as perdas de NH₃ em cada ano agrícola.

CAPÍTULO 1

INFLUÊNCIA DO MANEJO NA ABUNDÂNCIA DE GENES RELACIONADOS COM O CICLO DO NITROGÊNIO E EMISSÃO DE N₂O

RESUMO

Algumas forrageiras tropicais com sistema radicular profundo e vigoroso usadas como plantas de cobertura podem aumentar a matéria orgânica do solo (MOS) e melhoram a ciclagem de nutrientes, alterando não apenas o acúmulo de resíduos orgânicos na superfície, mas também em todo o perfil do solo através da liberação de exsudatos radiculares e decomposição de microrganismos e raízes. As forrageiras podem diminuir a formação de N-NO₃⁻, forma passiva de perdas por lixiviação e desnitrificação. A fim de verificar essas alterações, este estudo buscou quantificar a abundância de genes envolvidos no ciclo do N e a emissão de N-N₂O na soja cultivada sobre resíduos de diferentes sistemas. Para isso foi realizado um experimento de campo com cultivo de capim ruziziensis - cv. comum (*Urochloa ruziziensis* - Ruzi.), capim tanzânia (*Megathyrsus maximus* - Tan.) e um manejo sem forrageira durante sete meses, seguido da semeadura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] na safra 18-19. A abundância de genes AOA diminuiu após outubro, no entanto, esse gene prevaleceu sobre AOB, os genes relacionados a desnitrificação apresentaram predominância de *nosZ* sobre *nirS*. A taxa de nitrificação líquida foi maior após a dessecação e início das chuvas, no entanto, os manejos com forrageiras apresentaram menor taxa. A ruziziensis e a tanzânia aumentaram a produtividade e o acúmulo de matéria seca da soja, porém, a soja cultivada sobre essas forrageiras emitiu mais N₂O. As forrageiras não diminuíram o número de cópias AOB ou AOA, mas esses sistemas apresentam menor taxa de nitrificação quando comparadas ao sistema sem forrageira.

Palavras chave: genes; desnitrificação; forrageira; qPCR; *Glycine max* (L.) Merrill.

ABSTRACT

Some tropical forages with deep and vigorous root systems used as cover crops can increase soil organic matter (SOM) and improve nutrient cycling, altering not only the accumulation of organic residues on the surface, but also the entire soil profile through the release of root exudates and decomposition of microorganisms and roots. Forages can reduce N-NO_3^- formation, a passive form of leaching and denitrification losses. In order to verify these alterations, this study sought to quantify the abundance of genes involved in the N cycle and the emission of $\text{N-N}_2\text{O}$ in soybean cultivated on residues of different system. For this, a field experiment was carried out with cultivation of Brachiaria ruzigrass - cv. common (*Urochloa ruziziensis* - Ruzi), Guinea grass (*Megathyrsus maximus* - Gg.) and a forage-free management for seven months, followed by sowing of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. The abundance of AOA genes decreased after October, however this gene still prevailed over AOB. The genes related to denitrification showed a predominance of *nosZ* over *nirS*. The net nitrification rate was higher after the desiccation of the cover crops and the beginning of the rains, however the forage managements showed a lower rate. Ruzigrass and Guinea grass increased soybean yield and dry matter accumulation, however soybean cultivated on these forages emitted more N_2O . The forages did not reduce the number of copies of AOB or AOA, but these species have a lower nitrification rate when compared to the system without forage.

Keywords: genes; denitrification; forager; qPCR; *Glycine max* (L.) Merrill.

1.1 INTRODUÇÃO

O solo é considerado um reservatório biológico e atua como importante fonte de água e nutrientes essenciais aos sistemas agrícolas (RAAIJMAKERS et al., 2009), e a ocorrência dos microorganismos em abundância com diversidade é vital para a funcionalidade do solo (BEVER et al., 2012). O ambiente não afeta apenas a estruturação das comunidades microbianas, mas também regula muitas das funções realizadas pelos microorganismos, tais como a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, dentre eles o nitrogênio (N) (BAGGS; PHILIPPOT, 2010). A manutenção dos resíduos de culturas oferece vários benefícios para a saúde do solo, dentre eles o aumento de carbono (C) orgânico (LEMKE et al., 2010; STETSON et al., 2012), proteção física contra erosão (BENISTON et al., 2015), melhor estabilidade de agregados (KARLEN et al., 1994), diversidade e riqueza da comunidade microbiana (CEJA-NAVARRO et al., 2010) e eleva a biomassa microbiana do solo (KUSHWAHA; TRIPATHI; Singh, 2000; GOVAERTS et al., 2007).

Em sistemas agrícolas, a nitrificação, quando ocorre de maneira rápida e desregulada, acaba resultando no uso ineficiente de N pelas culturas, levando a maior perda de N e poluição do ambiente pela lixiviação e desnitrificação (SCHLESINGER, 2009). As plantas tem a capacidade de absorver N na forma de amônio (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-) (KIELLAND, 2001) conseqüentemente, não se espera que a redução das taxas de nitrificação em sistemas agrícolas altere a capacidade intrínseca das plantas de absorver N, mas que essa redução possa aumentar o tempo de retenção de N na zona radicular. O NH_4^+ é menos móvel que o NO_3^- proporcionando um tempo adicional para as plantas absorverem o nutriente, isso aumenta a eficiência do uso de N e reduz as perdas (SUBBARAO et al., 2012). Por outro lado, a manutenção do N mineral do solo como NH_4^+ pode aumentar a sua imobilização pela microbiota do solo, pois os microorganismos competem com as plantas pelo N disponível (MARIANO et al., 2016).

A microbiota do solo afeta a dinâmica do N de várias maneiras, através da fixação biológica, nitrificação e desnitrificação. Portanto, a avaliação da abundância e estrutura da comunidade de genes é essencial para entender o papel dos microorganismos no ciclo do N (LEVY-BOOTH; PRESCOTT; GRAYSTON, 2014). A maioria dos estudos sugere que o NH_4^+ no solo é oxidado principalmente por bactérias (AOB), embora se tenha sugerido a dominância de arqueias (AOA) (JIA; CONRAD

2009). O papel das AOA para nitrificação em solos ricos com N pode ser reduzido em comparação com AOB (BEECKMAN et al., 2018). Enwall et al. (2005) mostraram que a adição de fertilizante à base de amônio elevou as emissões de N_2O e modificou a comunidade desnitrificante, mas não a comunidade oxidante de amônia, evidenciando a complexidade do tema.

Entretanto, a remoção de resíduos refletiu negativamente em alguns genes funcionais do ciclo N no solo (SEGAL et al., 2017). Espécies de manejos dos gêneros *Urochloa* e *Megathyrus* proporcionam acúmulo de resíduos com maior relação C/N na superfície, e isso pode afetar processos microbiológicos do solo, além da ação de exsudados radiculares que podem inibir biologicamente a nitrificação (SUBBARAO et al., 2012), embora a significância desta inibição pelas brachiarias no N do solo tenha sido discutida (CASTOLDI et al., 2017). Essas mudanças também modificam a abundância, a estrutura e a diversidade das comunidades microbianas (KIM et al., 2020), elevam a matéria orgânica do solo e a ciclagem de nutrientes através de sistemas radiculares profundos e vigorosos (ROSOLEM; CALONEGO, 2013; GARCIA et al., 2013; CALONEGO et al., 2017) demonstrando assim que a manutenção de resíduos vegetais na superfície do solo é primordial (SEBEN et al., 2014).

Desta forma foi elaborada a hipótese de que sistemas de manejo que envolvam forrageiras possam atuar na microbiota do solo associada ao ciclo do N. O objetivo do presente experimento foi (i) caracterizar mudanças nas abundâncias dos principais genes envolvidos com o ciclo do N, (ii) e medir as emissões de N_2O da soja sobre os resíduos dos sistemas de manejo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Descrição do local

Um experimento de campo em sequeiro foi conduzido em Botucatu, SP, Brasil (22°49' S, 48°26' W; 750 m) entre 2018 e 2019, composto pelo cultivo de uma safra de forrageira e uma safra de soja. O solo local é um Rhodic Hapludox (SOIL SURVEY STAFF, 2014) de textura argilosa. Antes do início do experimento (janeiro 2018) foram analisados os teores de $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, N orgânico total (N total) e C orgânico total (C total) até 80 cm, seguindo a metodologia salicilato-hipoclorito (MULVANEY, 1996), VCl_3 -Griess (MIRANDA et al., 2001) e combustão a seco, (CHN-2000, LECO Corp.,

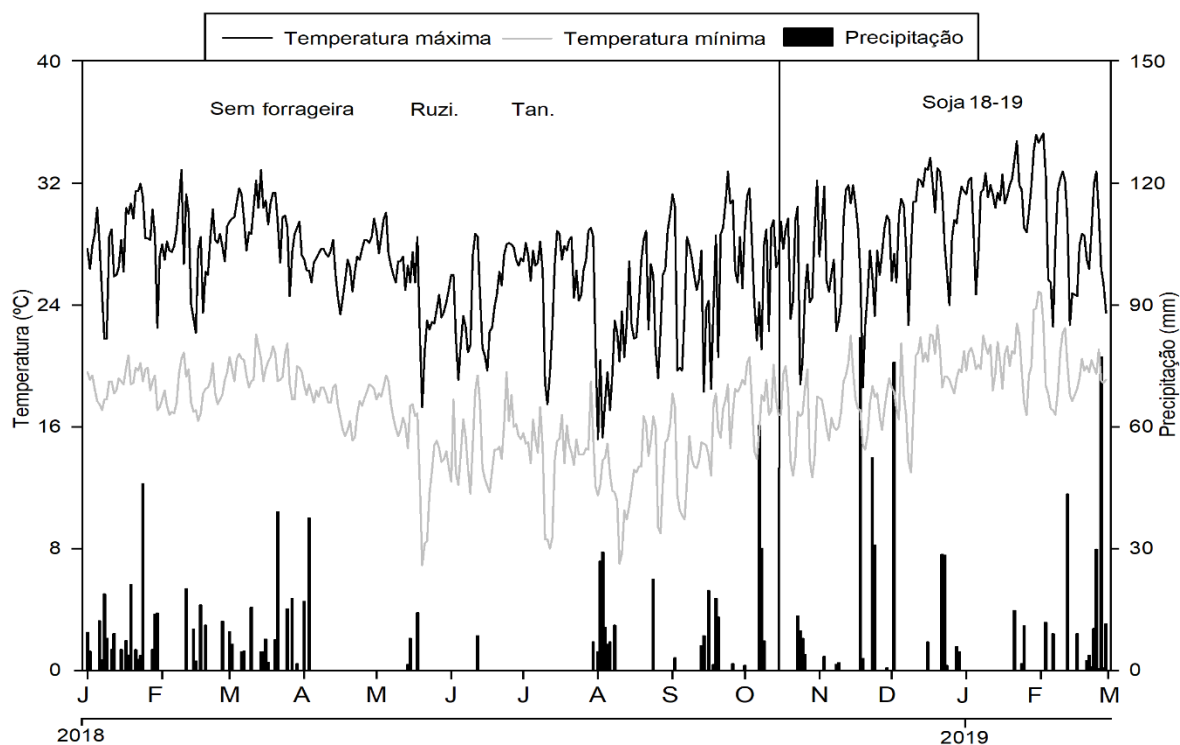
St. Joseph, EUA) respectivamente. As demais propriedades químicas e físicas do solo foram determinadas de acordo com Raij et al. (2001) e Almeida et al. (2012) respectivamente (Tabela 1).

Tabela – 1 Propriedades físicas e químicas do solo até 80 cm

Propriedade	Unidade	Camada (cm)				
		0-10	10-20	20-40	40-60	60-80
pH _{CaCl2}		4,9	4,6	4,6	4,9	5
P _{resina}	mg dm ⁻³	10	5	2	1	0,5
H+Al ³⁺		39	47	41	31	31
K ⁺		4	2	1	1	1
Ca ⁺²	mmol _c dm ⁻³	38	28	22	23	27
Mg ⁺²		15	8	6	5	5
CTC		96	85	70	60	64
SB		57	38	29	29	33
V%		59	44	41	48	51
Areia	g kg ⁻¹	214	203	191	175	183
Silte		203	191	170	157	173
Argila		584	607	639	668	645
NH ₄ ⁺	mg kg ⁻¹	12,5	11,3	10,4	13,6	13,9
NO ₃ ⁻		0,7	0,4	0,5	1,2	1,0
N total	g kg ⁻¹	1,6	1,4	1,3	1,0	0,9
C total		22	18	15	12	12

CTC: Capacidade de troca catiônica; SB: Saturação de base

Figura – 1 Temperatura do ar e precipitação registrados durante o período do experimento (janeiro 2018 a março 2019)



O local de estudo normalmente apresenta invernos secos e verões quentes, com temperatura média anual mínima e máxima de 15,3 e 26,1 °C, respectivamente, e precipitação média anual de 1696 mm. Durante o período do experimento, os dados de temperatura e precipitação foram registrados por uma estação meteorológica próxima ao local (Figura 1).

1.2.2 Design experimental e gerenciamento da safra

O experimento foi conduzido em parcelas medindo 9 m × 20 m, dispostas em blocos casualizados, com quatro repetições. A área se encontrava em pousio há ~4 anos, com vegetação de plantas espontâneas, predominando forrageiras. A primeira parte do estudo, relativa ao cultivo das forrageiras, se iniciou em janeiro de 2018 com a aplicação de 5 kg ha⁻¹ de herbicida dessecante glifosato (720 g kg⁻¹ de ingrediente ativo-i.a.) como manejo químico das plantas espontâneas. Em fevereiro de 2018 foram semeadas as forrageiras: capim ruziziensis - cv. comum (*Urochloa ruziziensis* - Ruzi.) e capim tanzânia (*Megathyrsus maximus* - Tan.) sobre os resíduos das plantas espontâneas. O estudo também contou com um manejo sem forrageira.

A semeadura das espécies de forrageiras foi realizada sem uso de fertilizante, com espaçamento de 17 cm entre linhas e densidade de 14 kg ha⁻¹ (50% de valor cultural). Nas parcelas sem forrageira foi realizada a retirada de toda a palha das plantas espontâneas que se desenvolviam no local, visando suprimir o efeito da cobertura vegetal no referido tratamento. Posteriormente essas parcelas foram cobertas com sombrite (80%) para simular o sombreamento no solo causado pelas forrageiras, proporcionando menor amplitude térmica e inibindo o desenvolvimento de plantas daninhas. Após 90 d da semeadura as forrageiras atingiram o florescimento, com isso foi realizado um manejo de corte a 25 cm de altura (GUEDES, 2012), e toda a biomassa verde cortada foi retirada das parcelas. As forrageiras e o sombrite permaneceram no local por um período de 7 meses, até setembro de 2018, quando foi realizada a dessecação química da área com 4 kg ha⁻¹ de herbicida dessecante glifosato (720 g - i.a). A semeadura da soja ocorreu em outubro, realizada com auxílio de uma semeadora direta, com espaçamento de 45 cm entre linha e um estande de 330 mil plantas ha⁻¹ (TMG 7062 IPRO). A soja foi adubada com 35 kg ha⁻¹ de P e 83 kg ha⁻¹ de K, utilizando-se superfosfato triplo e cloreto de potássio, respectivamente.

No dia da semeadura, a semente foi inoculada com solução de *Bradyrhizobium spp.* (120 ml do i.a. para 50 kg de semente).

O controle de plantas daninhas foi realizado 30 dias após a semeadura (DAS) com aplicação de 2 kg ha⁻¹ de glifosato (720 g i.a). O controle de doenças e pragas foi feito conforme a necessidade. A colheita foi realizada quando a soja atingiu o estágio de maturação R8 (FEHR; CAVINESS, 1977), em fevereiro de 2019, e os resíduos da cultura (folhas, caules e vagens) foram deixados sobre o solo.

1.2.3 Amostragem de solo

O solo foi amostrado em setembro de 2018 (antes da dessecação), outubro de 2018 (na semeadura) e janeiro de 2019 (estágio R2) para avaliação da nitrificação líquida e abundância de genes. Todas as amostragens foram realizadas nas camadas de 0-10 e 10-20 cm com auxílio de trado tubular com diâmetro de 5 cm. Foram retiradas seis amostras simples para composição da amostra composta da parcela (na pastagem e na soja, foram retiradas na linha de cultura). As amostras foram divididas em duas partes: (i) 50 g de solo foi armazenado a -20 °C para análise molecular e teor de N mineral (NH₄⁺ e NO₃⁻) e (ii) 200 g foram secos em estufa a 40°C para determinação das propriedades químicas.

1.2.4 Avaliação laboratorial da nitrificação do solo

A oxidação de NO₃⁻ no solo foi avaliada em um estudo de incubação de curta duração. O solo foi seco em estufa a 40°C, moído e passado em peneira de malha < 2 mm. Subsequentemente, 20 g de solo seco foram transferidos para pote de vidro de 250 mL de capacidade. As amostras foram umedecidas até 65% da capacidade de retenção de água (MARIANO et al., 2012). As amostras foram pré-incubadas a 25°C por 15 dias para diminuir o pico de N mineral causado pela secagem e reumedecimento. Aos 15 d após a incubação (DAI; tempo 1 - T1) metade das amostras foi agitada com solução de 2 M KCl (em uma razão solo: solução de 1: 5) em agitador orbital (200 rev min⁻¹, 1h). O sobrenadante foi filtrado usando papel de filtro nº42 e o teor de NO₃⁻ foi determinado por colorimetria (MIRANDA et al., 2001). Após 4 dias, totalizando 19 DAI, a outra metade das amostras foram extraídas e analisados o teor de NO₃⁻ como descrito anteriormente (tempo 2 - T2). A taxa de

nitrificação líquida foi calculada pela subtração de NO_3^- de amostras (T2 - T1), e dividido pelo período de incubação entre os tempos (3 dias).

1.2.5 Isolamento de DNA e PCR quantitativo em tempo real

Para a extração do DNA do solo, foi utilizado o DNeasy PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Uma alíquota de 5-mL foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) corado com GelRed™ (Uniscience) em tampão borato de sódio (BRODY; KERN, 2004) para confirmar a qualidade do DNA. O gel foi submetido a um campo elétrico de 85 V por ~30 min. Posteriormente, o DNA foi quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) a 260 nm (SAMBROOK et al., 1989). A quantidade de genes funcionais do ciclo N foram determinados por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Os seguintes genes (codificadores de enzima) foram avaliados: amônia monooxigenase de bactéria e arqueia (AOB e AOA, respectivamente); nitrito redutase (*nirS*); óxido nitroso redutase (*nosZ*) e nitrogenase (*nifH*). Foi realizada com o Sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ com placas de 96 poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para melhor eficiência da curva padrão, todos os genes usados nas curvas foram purificados com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purificação (GE Healthcare, Reino Unido) seguindo os protocolos do fabricante. Os DNA padrões, primers e condições de amplificação usados no ensaio foram apresentados como material suplementar (Tabela 3). Todas as amostras tiveram um volume final de reação de 10 µL compreendendo 5 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,67 a 2,0 µL de cada iniciador, 0,5 µL de albumina de soro bovino (6 mg mL⁻¹), 1,0 µL de DNA diluído em 10 vezes e água ultra pura para completar o volume. A observação da fusão de um único pico confirmou a pureza do produto amplificado, notado em gel de agarose 1% como uma banda única. Todos os genes microbianos foram expressos como o número de cópias do gene por g de solo seco.

1.2.6 Análise química do solo

O pH foi determinado em CaCl_2 0,01 M. Os teores de K, Ca e Mg e o P disponível foram extraídos com resina trocadora de íons (van Raij et al., 2001). No extrato, o P

foi determinado colorimetricamente, e os cátions por espectrometria de absorção atômica (Shimadzu AA-7000). Os micronutrientes Fe, Mn, Zn e Cu foram extraídos com solução de DTPA em pH 7,3 (Raij et al., 2001) seguido da leitura por espectrometria de absorção atômica (Shimadzu AA-7000). A acidez potencial do solo (H+Al) foi determinada pelo método de solução tampão Shoemaker-McLean-Pratt. O Al trocável foi extraído com 1 mol L⁻¹ KCl (pH 7,0) na relação solo/solução 1:10, agitado por 15 min e determinado por titulação com solução de NaOH 0,025 mol L⁻¹. Para extrair as formas de N mineral, 5 g de solo úmido foi agitado com 2 M KCl (em uma proporção solo: solução de 1: 5) em um agitador alternativo (200 rotações min⁻¹ por 1 h) e filtrado usando papel de filtro nº42. Após a extração, o teor de NH₄⁺ e NO₃⁻ foi determinado seguindo a metodologia salicilato-hipoclorito (MULVANEY, 1996) VCl₃-Griess (MIRANDA et al., 2001), respectivamente. Os teores totais de N e C foram obtidos por combustão a seco (CHN-2000, LECO Corp., St. Joseph, EUA).

1.2.7 Amostragem de N₂O e medições auxiliares

A avaliação do fluxo de gás foi iniciada logo após a semeadura da soja, usando câmaras estáticas (PAVELKA et al., 2018). Uma base de aço galvanizado em formato retangular (45 cm de largura × 50 cm de comprimento × 15 cm de altura) foi inserida ~5 cm no solo, ocupando a entrelinha completa da cultura (45 cm de largura). A câmara foi instalada na semeadura da soja e permaneceu na mesma posição até a colheita. Uma tampa opaca de polipropileno não ventilada (47 cm de largura × 52 cm de comprimento × 10 cm de altura) foi ajustada em torno da borda superior da base através de um flange, adicionada água ao espaço do flange para criar uma vedação hermética. Um septo de borracha (0,5 cm de diâmetro) foi colocado no centro da tampa. Antecedendo cada amostragem eram retirados 40 mL de gás do interior da câmara e reinjetados para promover a mistura do ar, usando-se uma seringa de polipropileno. Uma amostra de gás (10 mL) foi retirada e mantida em seringa aos 0, 10 e 30 min após o fechamento da câmara, entre 9:00 h e 10:00 h da manhã, conforme recomendação de Alves et al. (2012). A amostragem de gases foi realizada aos 1, 3, 5, 8, 15 e 30 d após a semeadura, seguido de avaliações mensais.

As amostras foram analisadas dentro de 24 h em um cromatógrafo de gás (GC-2014, Shimadzu Corp., Japão) equipado com detector de captura de elétrons a⁶³Ni (ECD) para N₂O. O FID e o ECD operaram a 250 e 325 °C, respectivamente. N₂

(99,999%) foi usado como gás portador. Quatro padrões de N₂O foram utilizados para plotar a curva de calibração.

O fluxo de N₂O foi calculado usando a equação:

$$\text{Fluxo N}_2\text{O} = (\Delta C/\Delta t) \times (V/A) \times m \times [P/(T \times R)] \times n \times 24$$

onde o Fluxo N₂O é mg m⁻² d⁻¹ de N; $\Delta C/\Delta t$ é o coeficiente linear da variação da concentração de gás ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) durante o período de amostragem Δt (h); V e A são o volume (m³) e a área (m²) da câmara, respectivamente; m é a massa molecular (g) de cada gás; P é a pressão atmosférica (atm); T é a temperatura do solo (K); R é a constante do gás; n é a razão entre a massa molecular de N com N₂O, e 24 é o fator para converter a horas em dia.

A emissão acumulativa de N₂O foi calculada por integração trapezoidal usando o SigmaPlot (versão 14.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

A emissão normalizada de N₂O foi calculada da seguinte forma:

$$EN = E/P$$

onde EN é a emissão normalizada de N na forma de N₂O (kg de N Mg⁻¹ grão) pela produtividade de grãos; E é a emissão acumulativa do gás; e P é a produtividade total de grãos de soja (Mg ha⁻¹).

Além da amostragem de gases, a temperatura do solo e o conteúdo volumétrico de água foram medidos a uma profundidade de 5,5 cm próximo à câmara usando sensores de umidade e temperatura (Teros 11, Meter Group Inc., Pullman, WA, EUA). O conteúdo volumétrico de água do solo foi convertido em espaço de poro cheio de água (EPOA) como segue:

$$\text{EPOA} = \text{CVA} / [1 - (\text{DS}/\text{DP})]$$

onde EPOA é o espaço de poro ocupado por água (%); CVA é o conteúdo volumétrico de água (%); DS é a densidade do solo (g cm³); e DP é a densidade de partículas do solo (g cm³). A DS e DP foram avaliados pelo método do anel volumétrico e do balão volumétrico, respectivamente (BLAKE; HARTGE, 1986a).

1.2.8 Determinação de matéria seca da biomassa e produtividade da soja

No estágio R6 as plantas presentes em 1 m de linha foram cortadas na base do caule, secas à 65°C até obtenção de massa constante e pesadas para estimativa da matéria seca da biomassa. A colheita de grãos foi realizada no estágio R8 por meio da amostragem de plantas presentes em 8 m de linha. A produtividade foi corrigida para 13% de umidade.

1.2.9 Análise estatística

As análises foram realizadas no programa SAS (versão 9.4, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) usando modelos lineares generalizados mistos por meio do procedimento GLIMMIX. Foi realizada ANOVA de três vias, sendo os fatores sistema de manejo, época de amostragem e camada de solo. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para atestar a normalidade. Variáveis com distribuição não-normal foram ajustadas a uma distribuição lognormal, seguido da retransformação dos valores. Em caso de significância, comparações múltiplas dos efeitos principais e interações foram estimadas pelo LSMEANS com ajuste por meio do simulate ao nível de 5% de probabilidade. A relação entre abundância relativa de genes funcionais do ciclo do N e propriedades químicas do solo foi determinada por correlação de Pearson.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Genes relacionados ao ciclo do N e taxa de nitrificação líquida

O número de genes AOA presentes em outubro nas duas camadas e em setembro na camada 0-10 cm foram iguais, e superiores em relação a setembro na camada 10-20 cm e a janeiro nas duas camadas de solo (Figura 2). Para a AOA, médias de $1,65 \times 10^8$ e $5,9 \times 10^7$ cópias do gene g^{-1} solo foram detectadas em outubro e janeiro respectivamente, indicando uma ligeira queda no número de cópias 80 dias após a dessecação das forrageiras. Para o AOB o manejo com *ruziziensis* apresentou 40% superior em relação à sem forrageira (Figura 3). A abundância de AOA foi em média $1,12 \times 10^8$ enquanto AOB foi em média de $7,5 \times 10^4$ (Figuras 2 e 3).

Figura – 2 Cópias de genes AOA *amoA* em função da época e da camada de solo amostrada. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade

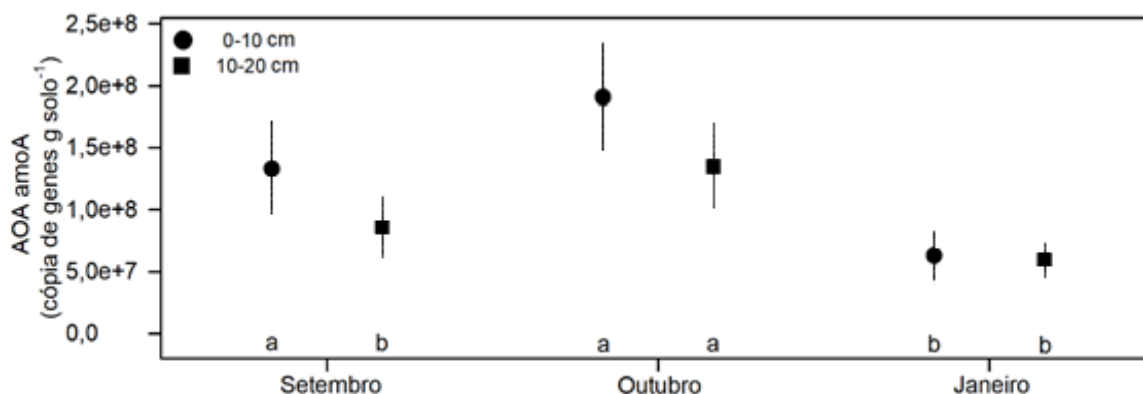
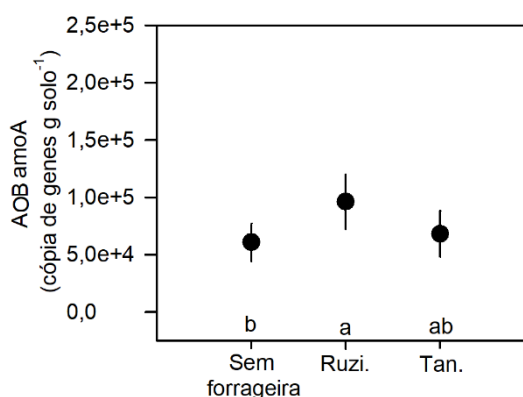


Figura – 3 Cópias de genes AOB *amoA* em função dos sistemas de manejo. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia



Em outubro, na camada 0-10 cm a abundância de *nirS* foi 73% maior quando comparada às demais épocas e camadas. Nota-se também que de setembro para outubro o número de cópias de *nirS* apresentou aumento de 60% na camada 0-10 cm (Figura 4). O maior número de cópias de *nosZ* foi observado em outubro, sendo 29 e 22% superior a setembro e janeiro respectivamente, ocorrendo também maior abundância na camada de 0-10 cm (Figura 5a, b). Em adição, foi encontrado um maior número de cópias de *nosZ* do que *nirS* (Figura 4, 5a, b), e a abundância do gene *nifH* foi 40% inferior na camada subsuperficial (Figura 6).

Figura – 4 Cópias de genes *nirS* em função da época e da camada de solo amostrada. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade

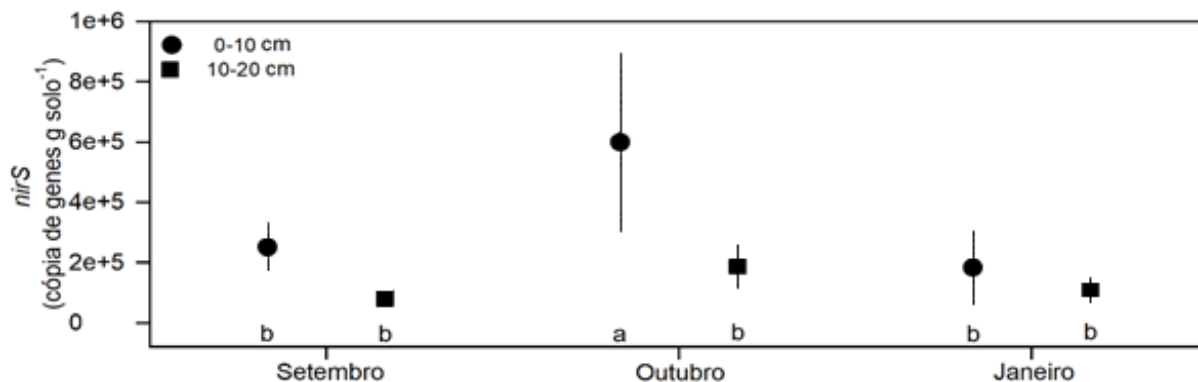


Figura – 5 Cópias de genes *nosZ* em função da época (a) e da camada de solo amostrada (b). Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade

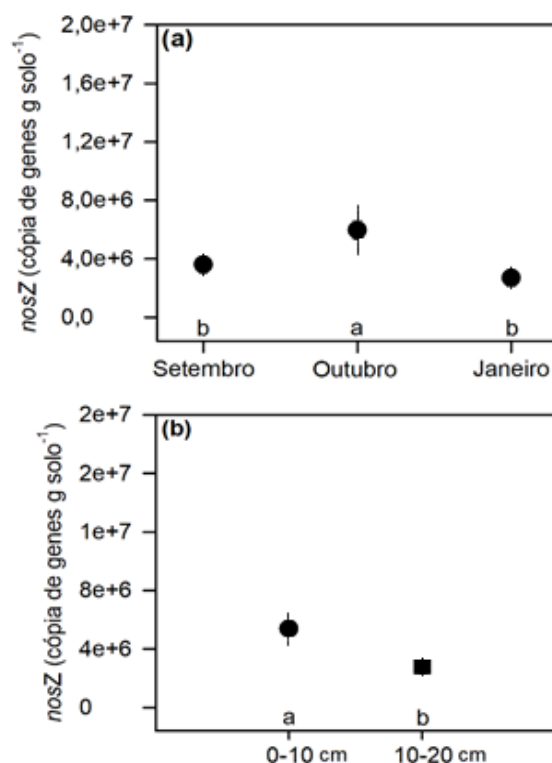
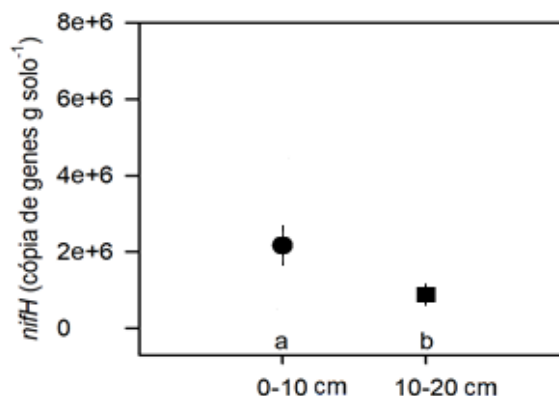


Figura – 6 Cópias de genes *nifH* em função da camada de solo amostrada. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade



A taxa de nitrificação líquida após o manejo de dessecação e durante a safra de soja foi mais elevada quando comparada com setembro. Nota-se um aumento de 70 e 30% na taxa de nitrificação de setembro para outubro na camada 0-10 e 10-20, respectivamente (Figura 7). Em setembro o sistema com tanzânia apresentou maior nitrificação líquida, seguida da sem forrageira e ruziziensis, neste mês o sistema de manejo não influenciou estatisticamente a nitrificação (Figura 8). Em outubro o sistema sem forrageira foi 52 e 35% superior a ruziziensis e tanzânia, respectivamente, enquanto na coleta de janeiro o sistema sem forrageira foi apenas 23 e 20% maior que a ruziziensis e tanzânia, respectivamente (Figura 8).

Figura – 7 Taxa de nitrificação líquida em função da época e da camada de solo amostrada. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade

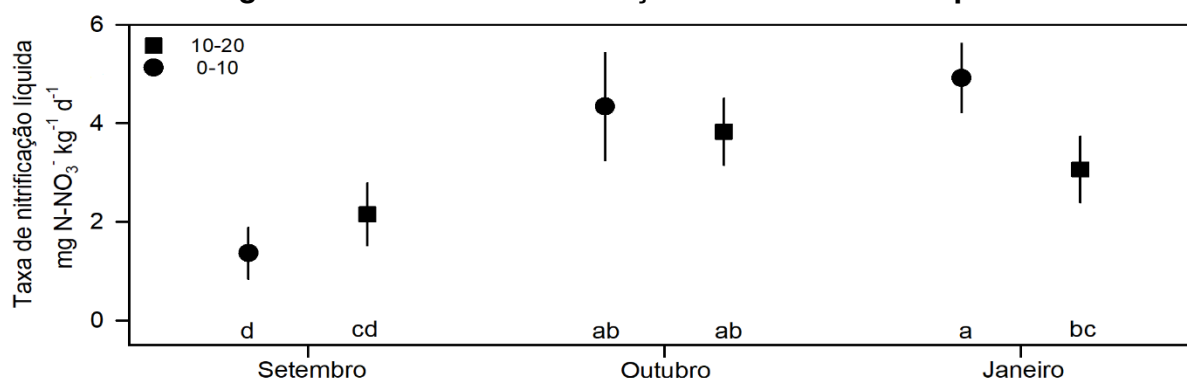
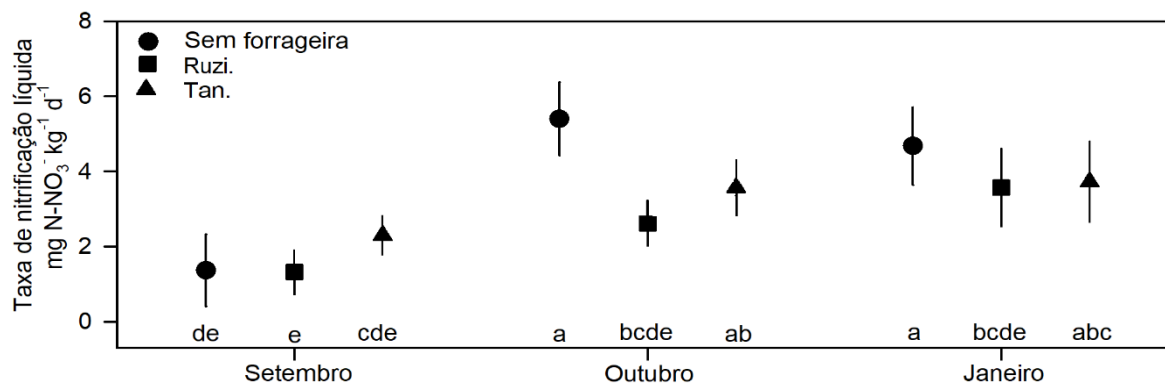


Figura – 8 Taxa de nitrificação líquida em função dos sistemas de manejo e época de amostragem. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade



1.3.2 Emissão de N_2O , matéria seca da biomassa e produtividade da soja

Durante o período de amostragem os fluxos de N_2O variaram de 0,1 a 1,8 $\text{mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de N entre os sistemas, com fluxos mais elevados ocorrendo logo após a semeadura da soja sobre a ruziziensis e tanzânia. O fluxo médio de N_2O foi de 0,29 $\text{mg m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de N (Figura 9). A ruziziensis e tanzânia antecedendo a soja aumentaram 47% em média a emissão acumulada de N_2O em comparação a sem forrageira (Figura 10a). Porém, a produtividade de grãos e matéria seca da biomassa da soja semeada sobre ruziziensis e tanzânia, foram em média 52% e 20% maiores que sem forrageira, respectivamente (Figura 10b, c).

Figura – 9 Variação sazonal do fluxo de N_2O na safra de soja em função dos sistemas de manejo. Símbolos representam valores médios e as barras representam o erro padrão ($n = 4$). Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia

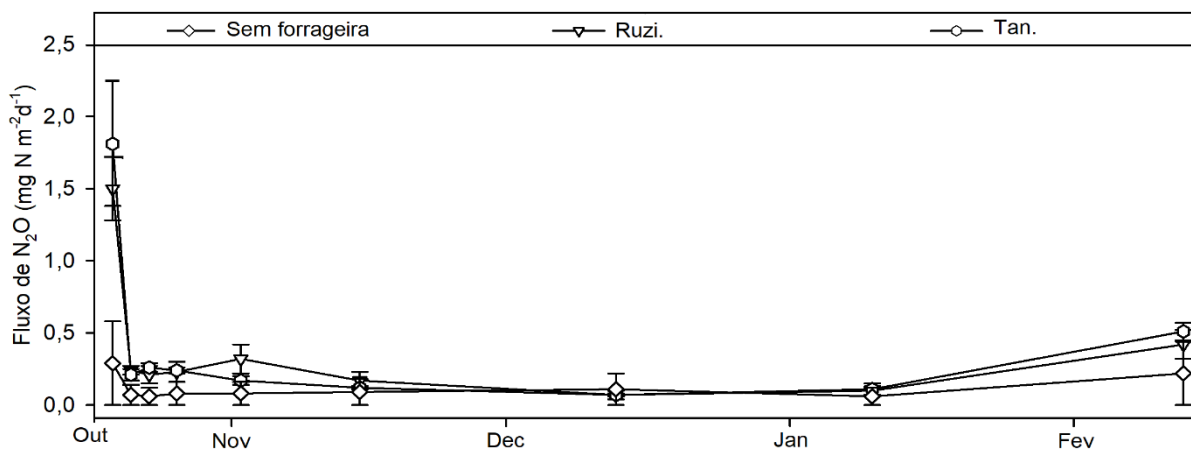
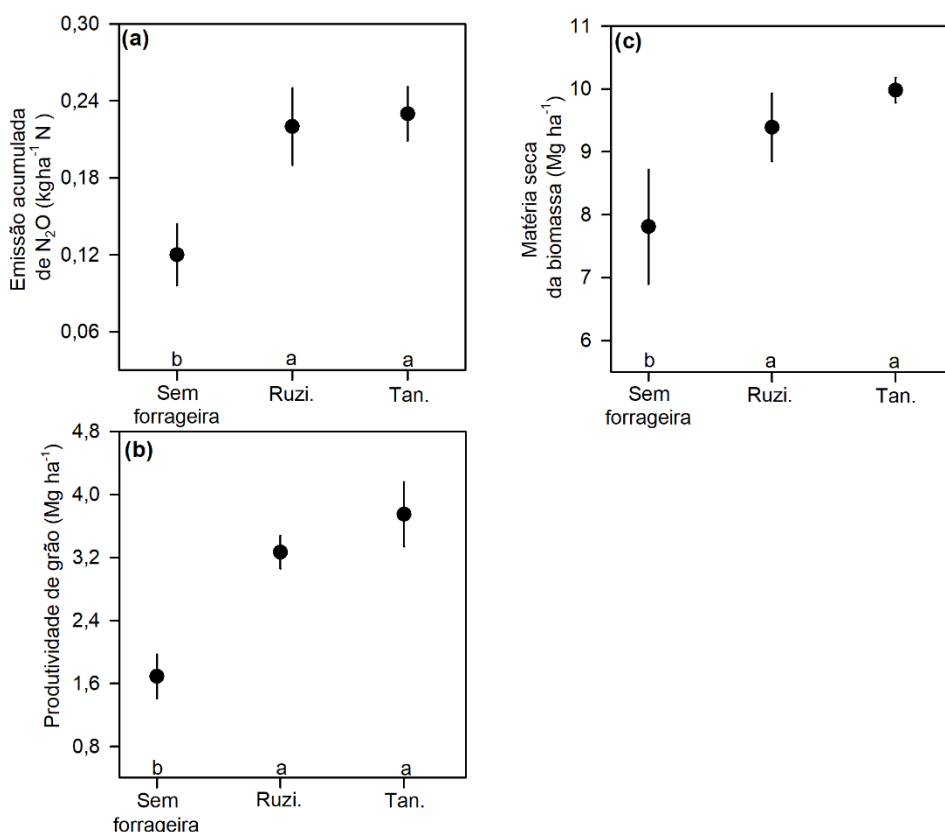


Figura – 10 Emissão acumulada de N₂O (a), produtividade de grãos (b) e matéria seca da biomassa (c) na safra de soja em função dos sistemas de manejo. Os símbolos pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança a 95%. Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia



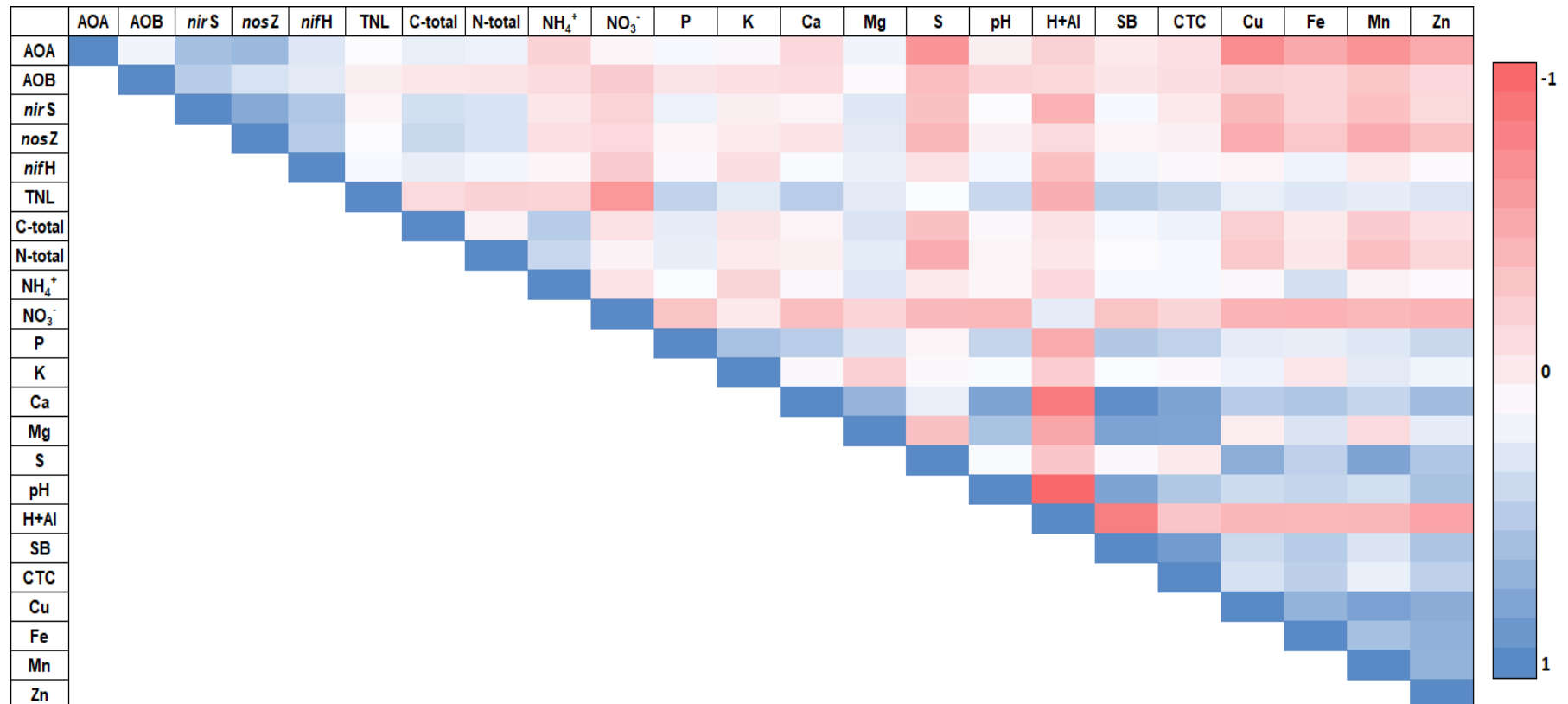
1.3.3 Correlações entre os genes do ciclo do N e propriedades químicas do solo

O número de cópias de genes AOA apresentou correlação forte com *nirS*, *nosZ*, enquanto para *nifH*, C total e N total essa correlação foi mais fraca, e negativa para S e micronutrientes. AOB apresentou maior força de correlação positiva apenas com *nirS*, e menos intensidade para *nosZ* e *nifH*, negativa com S (Tabela 2).

O *nirS* se correlacionou negativamente com H+Al e Cu, enquanto com *nosZ*, *nifH*, C total, N total, P e Mg apresentou correlação positiva. Os parâmetros S, Cu e Mn se correlacionaram negativamente com *nosZ*, e *nifH*, C total, N total e Mg foram positivas, com maior força com *nifH*. C total e Mg foram correlacionados positivamente com *nifH*. Para a taxa de nitrificação líquida ocorreu correlação negativa com NO₃⁻ e H+Al e positiva com P, K, Ca, Mg, pH, SB, CTC e micronutrientes. A nitrificação líquida e os

teores de NH_4^+ e NO_3^- não se correlacionaram positivamente com nenhum gene do ciclo do N estudados (Tabela 2).

Tabela – 2 Coeficiente de correlação linear de Pearson



TNL – taxa de nitrificação líquida; SB – soma de base; CTC – capacidade de troca catiônica; Valores de R entre 0,231 e 0,271 significativo a 5%; R > 0,271 significativo a 1% para correlação positiva. Valores de R entre -0,233 e -0,292 significativo a 5%, R > -0,292 significativo a 1% para correlação negativa.

1.4 DISCUSSÃO

A dessecação química das forrageiras no mês de setembro com o início das chuvas explica o aumento no número de cópias de genes AOA, *nirS* e *nosZ* em outubro, pois ocorreu entrada de C e N no solo por resíduos vegetais da parte aérea e radiculares das forrageiras (GILLER et al., 2015; CASTOLDI et al., 2017) se tornando fonte de energia para o crescimento da biomassa microbiana (ZIEGLER; BILLINGS 2011; KONG et al., 2005). A abundância de AOA se correlacionou positivamente com os teores de C total no solo, corroborando com resultados encontrados por Momesso et al. (2022). Orchard e Cook, (1983) relacionaram a atividade microbiana com o potencial matricial da água no solo e verificaram uma relação linear negativa, ou seja, quanto menor o potencial, menor a atividade microbiana no solo.

Assim, sistemas agrícolas que forneçam resíduos vegetais, influenciam o microclima do solo, distribuição e decomposição dos resíduos da cultura e a mineralização e imobilização de nutrientes (CHENG et al., 2017), e tais fatores alteram a biomassa microbiana do solo e a estrutura da comunidade microbiana (JOHNSON; HOYT, 1999). Apesar do grande aumento de *nirS* em outubro, a abundância desse gene foi inferior ao de *nosZ*, como já reportado em outros estudos prévios (THOMPSON et al., 2018; LIU et al., 2018), embora as abundâncias desses dois genes apresentassem correlação positiva, o que também já foi relatado (MOMESSO et al., 2022).

As maiores respostas dos genes AOA, *nirS*, *nosZ* e *nifH* na camada 0–10 cm indicam ocorrência de condições mais favoráveis, podendo ser considerada a influência de diversos fatores bióticos e abióticos, cuja interação afeta diretamente a atividade e a dinâmica populacional de microrganismos (MOREIRA 2006). Tortora, Funke e Case, (2000) afirmaram que a população de microrganismos é maior nos primeiros centímetros da superfície do solo, e declina rapidamente com a profundidade, pois à medida que aumenta a profundidade do solo ocorre redução na MOS e nos nutrientes, fato que pode ter reflexo direto na abundância de genes (RASCHE; CADISH, 2013), visto que a dinâmica de uso do carbono pela microbiota é limitada pela falta de nutrientes (BARCELOS et al., 2021).

Os genes envolvidos na nitrificação e na desnitrificação mostram correlação positiva com C total e N total no solo, demonstrando que os sistemas de manejo

influenciam na ciclagem de nutrientes e na abundância de genes. A deficiência N é um dos principais limitantes da atividade microbiana no solo (BARCELOS et al., 2021), e sabe-se que após a aplicação de herbicida dessecante há importante migração do N da planta para o solo durante a senescência (CASTOLDI et al., 2017) e o C total do solo exerce forte influência na abundância e diversidade de genes relacionados ao ciclo do N (PROSSER; NICOL, 2012; WANG et al., 2017).

As abundâncias de AOA e AOB se correlacionaram com as de *nirS* e *nosZ*, sendo consistente com uma meta-análise que examinou relações positivas entre a abundância de genes nitrificantes e os genes desnitrificantes (ROCCA et al., 2015; OUYANG et al., 2018). Este estudo mostrou maior abundância de AOA sobre AOB, assim como relatado anteriormente por Catão et al. (2017) e Zhang et al. (2010). No entanto, não foi observada correlação negativa entre AOA e AOB, e a predominância de AOA sobre AOB ainda é debatida para solos ácidos (LIN et al., 2021), pois a estrutura da comunidade de bactérias é alterada de acordo com a temperatura do solo, fertilização e pH (HE et al., 2007), apesar disso AOA pode ser até 10 vezes mais abundantes do que AOB (LEVIČNIK-HÖFFERLE et al., 2012).

A maior abundância de AOB com forrageiras em relação ao tratamento sem forrageira segue o relatado por outros autores, que a adição de resíduos vegetais no sistema resulta em estímulo aos microrganismos (MOMESSO et al., 2022), isso ocorre pelo fato das raízes das forrageiras liberarem grandes quantidades de C (FISHER et al., 1995), que serve como fonte para aumentar as populações de arqueias e bactérias (FLEMMING; WUERTZ, 2019), incluindo os relacionados com a nitrificação do solo. Apesar desse estudo não ter a influência da fertilização nitrogenada, outras pesquisas sugerem que o N aumenta a abundância de AOB e AOA em solos agrícolas, mas não há consenso sobre as respostas relativas desses genes à fertilização com N (HIRSH et al., 2015; BEECKMAN et al., 2018). Prosser et al. (2020) postularam que a fertilização com N favorece o crescimento de AOB, enquanto solos sem adubação ou que recebem baixas doses de N favoreceriam AOA. É visto nesse estudo, que a amostragem de solo no início do experimento (Tabela 1) demonstra pequenos teores de NH_4^+ e NO_3^- , concordando com pesquisadores que relatam que o fornecimento de N baixo ou proveniente da mineralização tenderia a predominar AOA (HINK et al., 2018).

Como discutido e encontrado por outros autores a introdução de plantas de cobertura que apresentam grande aporte de matéria seca e raízes profundas

intensificam a ciclagem de nutrientes, dentre eles o N (HASHEMI et al., 2013), resultando em aumento no número de genes AOB nesses sistemas. Embora os genes AOA e AOB codifiquem a redutase de nitrito, a maioria das AOB também codifica a redutase de óxido nítrico, permitindo-lhes sustentar o metabolismo de respiração sob limitação de oxigênio usando o NO_2^- e NO como elétron alternativo através da chamada desnitrificação de nitrificação (HINK et al., 2018). Esses fatores explicam as maiores perdas de N_2O no ciclo da soja cultivada sobre os manejos com forrageiras, concordando com outros estudos que sugerem que a AOB seja o grupo principal para as emissões de N_2O em solos agrícolas tropicais (LOURENÇO et al., 2018).

Os valores de *nifH* observados foram maiores que os encontrados por Momesso et al. (2022), mas semelhantes ao relatado por, Rocha et al. (2020) ambos em solo e clima semelhantes ao do presente estudo. Contudo, não foi observada diferença na abundância de genes *nifH* entre os sistemas de manejo, fato mencionado por outros autores (ROCHA et al., 2020).

A taxa de nitrificação líquida com forrageiras nos meses de outubro e janeiro foram semelhantes a relatada por Rocha et al. (2019), que também não encontrou diferença entre a *ruziziensis* e *tanzânia*. Este estudo indica um possível potencial de inibição biológica da nitrificação, pois a taxa de nitrificação líquida no solo com *ruziziensis* e *tanzânia* foi menor que no manejo sem forrageira, embora Castoldi et al. 2017 não tenham observado esse efeito em vasos. Esse potencial de inibição foi evidenciado após a dessecação das forrageiras, portanto, isso se deve possivelmente ao aporte de resíduos da parte aérea das forrageiras, que contém ácidos linoleico e linolênico, e raízes que contém compostos como p-coumarato metil e ferrulato metil, inibidores do processo de nitrificação (SUBBARAO et al., 2015).

Os fluxos de emissão de N_2O na soja cultivada sobre resíduos de forrageiras foi mais elevado no início da safra, possivelmente ocasionado pela operação semeadura associado a uma maior umidade. Maiores fluxos de N_2O na semeadura da soja já foram relatados por outros autores (FIORENTIN et al., 2015). Esse elevado fluxo de emissão no início do experimento associado a maiores fluxos durante o período amostrado, resultou em maior emissão acumulada nos manejos com as forrageiras. No entanto, como já discutido, a taxa de nitrificação líquida foi inferior nesse manejo. Além da taxa de nitrificação, a emissão de N_2O é fortemente influenciada pela umidade do solo (SILVA et al., 2017). Alguns trabalhos no Brasil relataram que as maiores emissões de N_2O estão associadas primeiramente a umidade do solo e mais

fracamente as formas de N mineral presente (SOUZA et al., 2021). Apesar de os maiores fluxos terem ocorrido no manejo da soja sobre as forrageiras, o acúmulo na emissão de N_2O no final do ciclo da soja ainda foi menor em comparação ao observado por outros autores (ZANATTA et al., 2011; FIORENTIN et al., 2015).

Porém, apesar da soja cultivada sobre resíduos das forrageiras ter apresentado maior emissão acumulada de N_2O a produtividade de grãos foi quase 50% superior em comparação ao manejo sem forrageira. A precipitação pluviométrica durante o ciclo da soja foi baixa, de apenas 450 mm ficando muito próxima da baixa demanda hídrica necessária para o desenvolvimento satisfatório da soja, que está entre 450 e 800 mm (FRANKE; DORFMAN, 2000). Outros relatórios também observaram maiores rendimentos na soja quando semeada sobre a palha de forrageiras, e esse efeito tem sido associado a uma melhoria geral do sistema (COSTA et al., 2015). Autores relatam que a comunidade microbiana é particularmente importante nos sistemas com semeadura direta, pois atua diretamente na decomposição de resíduos orgânicos, aumenta a ciclagem de nutrientes e eventualmente, influencia positivamente o crescimento e produtividade das plantas (ARAÚJO et al., 2019).

1.5 CONCLUSÕES

Este estudo fornece informações anteriormente indisponíveis sobre os genes funcionais do ciclo N em sistemas de manejo com forrageiras e sem forrageira. Conclui-se que as forrageiras não diminuem o número de cópias genes de bactéria relacionados a oxidação de amônia, mas a diminuição na taxa de nitrificação líquida pelo cultivo de forrageiras é confirmado. No entanto, a soja cultivada sobre a palha das forrageiras apresenta maior emissão acumulada de N_2O , demonstrando que nitrificar menos não reflete em menor emissão. A época de amostragem impacta mais no número de cópias de genes do que os sistemas de manejo utilizados. Por fim, a soja apresentou maior produtividade de grãos quando manejada sobre a palha das forrageiras em relação ao manejo sem forrageira.

Referências

ALMEIDA, Brivaldo Gomes et al. Padronização de métodos para análise granulométrica no Brasil. **Embrapa Solos-Comunicado Técnico (infoteca-e)**, 2012.

ALVES, Bruno JR et al. Selection of the most suitable sampling time for static chambers for the estimation of daily mean N₂O flux from soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 129-135, 2012.

ARAUJO, Ademir Sergio Ferreira et al. Bacterial community associated with rhizosphere of maize and cowpea in a subsequent cultivation. **Applied soil ecology**, v. 143, p. 26-34, 2019.

BAGGS, Elizabeth M.; PHILIPPOT, Laurent. Microbial terrestrial pathways to nitrous oxide. **Nitrous oxide and climate change**, p. 256, 2010.

BARCELOS, Jéssica PQ et al. Topsoil and subsoil C and N turnover are affected by superficial lime and gypsum application in the short-term. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 163, p. 108456, 2021.

BEECKMAN, Fabian; MOTTE, Hans; BEECKMAN, Tom. Nitrification in agricultural soils: impact, actors and mitigation. **Current opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 166-173, 2018.

BENISTON, J. W. et al. Carbon and macronutrient losses during accelerated erosion under different tillage and residue management. **European Journal of Soil Science**, v. 66, n. 1, p. 218-225, 2015.

BEVER, James D.; PLATT, Thomas G.; MORTON, Elise R. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. **Annual review of microbiology**, v. 66, p. 265-283, 2012.

BLAKE, G. R; HARTGE, K. H. Bulk density. **Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods**, v. 5, p. 363-375, 1986.

BRODY, Jonathan R.; KERN, Scott E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques**, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

CALONEGO, Juliano C. et al. Soil compaction management and soybean yields with cover crops under no-till and occasional chiseling. **European Journal of Agronomy**, v. 85, p. 31-37, 2017.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). Fertilidade do solo Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470. Câmara, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações agronômicas**, n. 147, p. 1-9, 2014.

CASTOLDI, Gustavo et al. Soil dynamic alterations and use efficiency of nitrogen by *Brachiaria* species. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 9, p. 1221-1227, 2017.

CATÃO, Elisa CP et al. Ammonia oxidisers in a non-nitrifying Brazilian savanna soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 11, 2017.

CEJA-NAVARRO, Javier A. et al. Phylogenetic and multivariate analyses to determine the effects of different tillage and residue management practices on soil bacterial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 11, p. 3685-3691, 2010.

CHENG, Yi et al. The quality and quantity of exogenous organic carbon input control microbial NO₃⁻ immobilization: a meta-analysis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 115, p. 357-363, 2017.

COSTA, Nídia Raquel et al. Produtividade da soja sobre palhada de forrageiras semeadas em diferentes épocas e alterações químicas no solo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, p. 8-16, 2015.

ENWALL, Karin; PHILIPPOT, Laurent; HALLIN, Sara. Activity and composition of the denitrifying bacterial community respond differently to long-term fertilization. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8335-8343, 2005.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; VORST, J. J. Response of Indeterminate and Determinate Soybean Cultivars to Defoliation and Half-plant Cut-off 1. **Crop Science**, v. 17, n. 6, p. 913-917, 1977.

FIORENTIN, M. et al. Emissão de óxido nitroso na safra de verão em experimento de longa duração, em Passo Fundo, RS. In: **Embrapa Trigo-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., MOSTRA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA TRIGO, 7., 2015, Passo Fundo. Resumos... Brasília, DF: Embrapa, 2015. Graduação PIBIC., 2015.

FISHER, Myles J. et al. Pasture soils as carbon sink. **Nature**, v. 376, n. 6540, p. 473-473, 1995.

FLEMMING, Hans-Curt; WUERTZ, Stefan. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 247-260, 2019.

FRANKE, Alberto Elvino; DORFMAN, Raul. Necessidades de irrigação suplementar em soja nas condições edafoclimáticas do Planalto Médio e Missões, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1675-1683, 2000.

GARCIA, Rodrigo Arroyo; LI, Yuncong; ROSOLEM, Ciro Antonio. Soil organic matter and physical attributes affected by crop rotation under no-till. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 5, p. 1724-1731, 2013.

GILLER, Ken E. et al. Beyond conservation agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 870, 2015.

GOVAERTS, Bram et al. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. **Applied soil ecology**, v. 37, n. 1-2, p. 18-30, 2007.

GUEDES, R. G. Avaliação do potencial produtivo de gramíneas do gênero *Brachiaria* nos lavrados Roraimenses. **Universidade Federal de Roraima**. **33f**, 2012.

HASHEMI, Masoud et al. Cover-crop seeding-date influence on fall nitrogen recovery. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 1, p. 69-75, 2013.

HE, Ji-zheng et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 9, p. 2364-2374, 2007.

HINK, Linda et al. The consequences of niche and physiological differentiation of archaeal and bacterial ammonia oxidisers for nitrous oxide emissions. **The ISME journal**, v. 12, n. 4, p. 1084-1093, 2018.

HIRSCH, Penny R.; MAUCLINE, Tim H. The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. **Advances in applied microbiology**, v. 93, p. 45-71, 2015.

JIA, Zhongjun; CONRAD, Ralf. Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1658-1671, 2009.

JOHNSON, A. M.; HOYT, G. D. Changes to the soil environment under conservation tillage. **HortTechnology**, v. 9, n. 3, p. 380-393, 1999.

KARLEN, D. L. et al. Crop residue effects on soil quality following 10-years of no-till corn. **Soil and Tillage Research**, v. 31, n. 2-3, p. 149-167, 1994.

KIELLAND, Knut. Stable isotope signatures of moose in relation to seasonal forage composition: a hypothesis. **Alces: A Journal Devoted to the Biology and Management of Moose**, v. 37, n. 2, p. 329-337, 2001.

KIM, Nakian et al. Do cover crops benefit soil microbiome? A meta-analysis of current research. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 142, p. 107701, 2020.

KONG, Angela YY et al. The relationship between carbon input, aggregation, and soil organic carbon stabilization in sustainable cropping systems. **Soil science society of America journal**, v. 69, n. 4, p. 1078-1085, 2005.

KUSHWAHA, C. P.; TRIPATHI, S. K.; SINGH, K. P. Variations in soil microbial biomass and N availability due to residue and tillage management in a dryland rice agroecosystem. **Soil and Tillage Research**, v. 56, n. 3-4, p. 153-166, 2000.

LEMKE, R. L. et al. Crop residue removal and fertilizer N: effects on soil organic carbon in a long-term crop rotation experiment on a Udic Boroll. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 135, n. 1-2, p. 42-51, 2010.

LEVIČNIK-HÖFFERLE, Špela et al. Stimulation of thaumarchaeal ammonia oxidation by ammonia derived from organic nitrogen but not added inorganic nitrogen. **FEMS microbiology ecology**, v. 80, n. 1, p. 114-123, 2012.

LEVY-BOOTH, David J.; PRESCOTT, Cindy E.; GRAYSTON, Susan J. Microbial functional genes involved in nitrogen fixation, nitrification and denitrification in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 11-25, 2014.

LIU, Yuan et al. Effects of biochar application on the abundance and community composition of denitrifying bacteria in a reclaimed soil from coal mining subsidence area. **Science of the Total Environment**, v. 625, p. 1218-1224, 2018.

LOURENÇO, Késia S. et al. Dominance of bacterial ammonium oxidizers and fungal denitrifiers in the complex nitrogen cycle pathways related to nitrous oxide emission. **GCB Bioenergy**, v. 10, n. 9, p. 645-660, 2018.

MARIANO, Eduardo et al. Ammonia losses estimated by an open collector from urea applied to sugarcane straw. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 2, p. 411-419, 2012.

MARIANO, Eduardo et al. Mineral nitrogen forms alter ¹⁴C-glucose mineralisation and nitrogen transformations in litter and soil from two sugarcane fields. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 154-161, 2016.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 5-62, 2001.

MOMESSO, Letusa et al. Forage Grasses Steer Soil Nitrogen Processes, Microbial Populations, and Microbiome Composition in A Long-term Tropical Agriculture System. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 323, p. 107688, 2022.

MOREIRA, FM de S. **Microbiologia e bioquímica do solo**. UFLa, 2006.

MULVANEY, Richard L. Nitrogen—inorganic forms. **Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods**, v. 5, p. 1123-1184, 1996.

ORCHARD, Valerie A.; COOK, F. J. Relationship between soil respiration and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, n. 4, p. 447-453, 1983.

OUYANG, Yang et al. Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils: a meta-analysis of field studies. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 127, p. 71-78, 2018.

PAVELKA, Marian et al. Standardisation of chamber technique for CO₂, N₂O and CH₄ fluxes measurements from terrestrial ecosystems. 2018.

PROSSER, James I. et al. Nitrous oxide production by ammonia oxidizers: Physiological diversity, niche differentiation and potential mitigation strategies. **Global Change Biology**, v. 26, n. 1, p. 103-118, 2020.

PROSSER, James I.; NICOL, Graeme W. Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: the quest for niche specialisation and differentiation. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 11, p. 523-531, 2012.

RAAIJMAKERS, Jos M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1, p. 341-361, 2009.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Campinas, **Instituto Agrônomo**, 285p. 2001.

RASCHE, Frank; CADISCH, Georg. The molecular microbial perspective of organic matter turnover and nutrient cycling in tropical agroecosystems-What do we know? **Biology and fertility of soils**, v. 49, n. 3, p. 251-262, 2013.

ROCCA, Jennifer D. et al. Relationships between protein-encoding gene abundance and corresponding process are commonly assumed yet rarely observed. **The ISME journal**, v. 9, n. 8, p. 1693-1699, 2015.

ROCHA, Kassiano F. et al. Fate of ¹⁵N fertilizer applied to maize in rotation with tropical forage grasses. **Field Crops Research**, v. 238, p. 35-44, 2019.

ROCHA, Kassiano Felipe et al. Microbial N-cycling gene abundance is affected by cover crop specie and development stage in an integrated cropping system. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 7, p. 2005-2012, 2020.

ROSOLEM, Ciro Antonio; CALONEGO, Juliano Carlos. Phosphorus and potassium budget in the soil-plant system in crop rotations under no-till. **Soil and Tillage Research**, v. 126, p. 127-133, 2013.

SAHRAWAT, K. L. Factors affecting nitrification in soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 39, n. 9-10, p. 1436-1446, 2008.

SAMBROOK, Joseph; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Harvesting and Lysis of the Bacteria. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Sambrook, J., et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, p. 1.22-1.23, 1989.

SCHLENKER, Wolfram; ROBERTS, Michael J. Nonlinear temperature effects indicate severe damages to US crop yields under climate change. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 106, n. 37, p. 15594-15598, 2009.

SEBEN JUNIOR, Getulio de Freitas; CORÁ, José Eduardo; LAL, Rattan. Effect of cropping systems in no-till farming on the quality of a Brazilian Oxisol. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 4, p. 1268-1280, 2014.

SEGAL, Lauren M. et al. Bacterial and archaeal ammonia oxidizers respond differently to long-term tillage and fertilizer management at a continuous maize site. **Soil and Tillage Research**, v. 168, p. 110-117, 2017.

SILVA, Jessica Fonseca et al. Nitrous oxide emissions from sugarcane fields in the Brazilian Cerrado. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 246, p. 55-65, 2017.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. 12th ed. USDA– NRCS., Washington, 2014.

SOUSA, Thais Rodrigues de et al. N₂O emissions from soils under different uses in the Brazilian Cerrado-A review. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021.

STEINFELD, Bradley et al. The role of lean process improvement in implementation of evidence-based practices in behavioral health care. **The Journal of Behavioral Health Services & Research**, v. 42, n. 4, p. 504-518, 2015.

STETSON, Sarah J. et al. Corn residue removal impact on topsoil organic carbon in a corn–soybean rotation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 76, n. 4, p. 1399-1406, 2012.

SUBBARAO, G. V. et al. Biological nitrification inhibition—a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. **Advances in agronomy**, v. 114, p. 249-302, 2012.

SUBBARAO, Guntur Venkata et al. Suppression of soil nitrification by plants. **Plant Science**, v. 233, p. 155-164, 2015.

THOMPSON, Karen A.; DEEN, Bill; DUNFIELD, Kari E. Impacts of surface-applied residues on N-cycling soil microbial communities in miscanthus and switchgrass cropping systems. **Applied Soil Ecology**, v. 130, p. 79-83, 2018.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 6^a edição. **Porto Alegre: Artmed**, 2000.

WANG, Chao et al. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in southern China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 113, p. 240-249, 2017.

ZANATTA, Josiléia Acordi et al. Emissões de gases de efeito estufa em sistemas de manejo do solo durante ciclo de produção da soja no Cerrado. In: **Embrapa Florestas-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO PARANAENSE DE CIÊNCIA DO SOLO, 2., 2011, Curitiba. Resumos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; Sociedade Paranaense de Ciência do Solo, 2011., 2011.

ZHANG, Li-Mei et al. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 40, p. 17240-17245, 2010.

ZIEGLER, Susan E.; BILLINGS, Sharon A. Soil nitrogen status as a regulator of carbon substrate flows through microbial communities with elevated CO₂. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 116, n. G1, 2011.

Material suplementar

Tabela – 3 Descrição dos primers, padrões de DNA e condições de amplificação usados na análise qPCR

Gene alvo	*DSMZ ou **BR código	Primers	Sequência (5' - 3')	Comp. frag. (pb)	Quantidade de primer (ul)	Conteúdo de primer (pmol)	Referência	Condições de amplificação
<i>amoA</i> de bactéria	DSMZ 28437 <i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>amoB1F</i> <i>amoB2R</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	491	1	0.2	Rotthauwe et al. (1997)	95°C-10 min, 40 ciclos de 95°C-45s, 60°C-45s, 72°C-45s; 95 °C-15s, 60 °C-1min, 95 °C-15s
<i>amoA</i> de arqueia	Environmental DNA	<i>amoA1F</i> <i>amoA2R</i>	STAATGGTCTGGCTTAGA CGGCGGCCATCCATCTGTATGT	635	0.56	0.7	Francis et al. (2005)	95°C-5 min, 40 ciclos de 95°C-40s, 56°C-30s, 72°C-1 min; 95 °C-15s, 56 °C-1min, 95 °C-15s
<i>nirS</i>	DSMZ 1690 <i>Nitrospirillum brasilense</i> Sp7	4 QF 6 QR	GTSAACGYSAAGGARACSGG GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA	410	0.67	0.3	Kandeler et al. (2006)	95°C-5 min; 10 ciclos de 95°C-5s, 63°C-40s, 72°C-40s; 40 cycles of 95°C-15s, 58°C-40s, 72°C-40s; 95 °C-15s, 58 °C-1min, 95 °C-15s
<i>nosZ</i>	BR 11003 <i>Nitrospirillum brasilense</i>	2F 2R	CGCRACGGCAASAAGGTSMSST CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	267	2	5	Henry et al. (2006)	95°C-10 min; 4 ciclos de 95°C-20s, 63°C-30s, 72°C-30s; 40 ciclos de 95°C-20s, 60 °C-20s, 72°C-30s; 95 °C-15s, 60 °C-1min, 95 °C-15s
<i>nifH</i>	DSMZ 17167 <i>Paraburkholderia phymatum</i>	FR	AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC TTGTTSGCSGCRTACATSGCCATCAT	457	1	5	Wallenstein e Vilgalys (2005)	95°C-10 min, 40 ciclos de 95°C-1 min, 53°C-27s, 72°C-1 min; 95 °C-15s, 53°C-1min, 95°C-15s

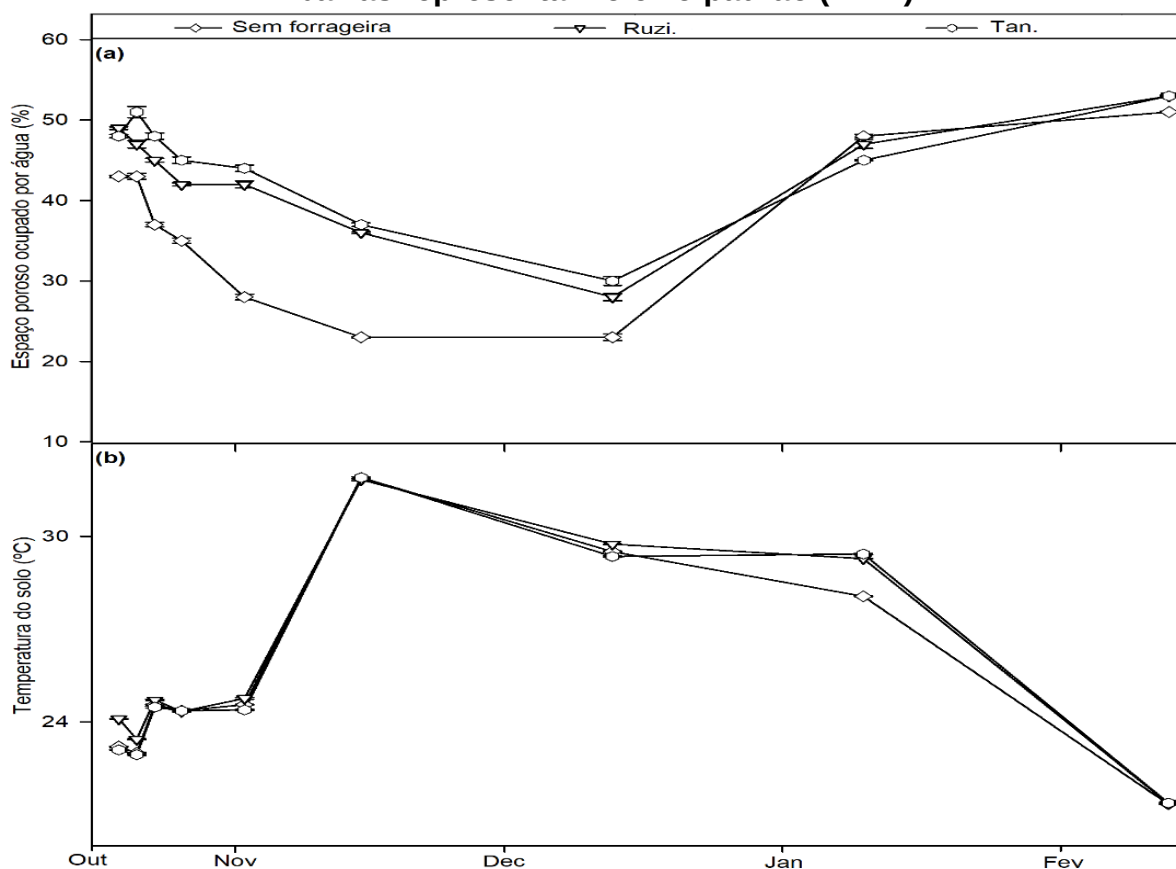
* Código DSMZ: código de referência do catálogo de células do Leibniz Institute DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), utilizado na construção das curvas padrão para análise qPCR; Código BR: código de referência do catálogo do Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD), Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, utilizado na construção das curvas padrão para qPCR.

Tabela – 4 Valores de probabilidade (*P*) para as variáveis taxa de nitrificação líquida e número de cópias de genes (*AOA*, *AOB*, *nirS*, *nosZ* e *nifH*) afetados pelo sistema de manejo × época × camada, e emissão acumulada de N_2O , produtividade de grãos, biomassa seca e emissão normalizada de N_2O afetado pelo sistema de manejo

	Sistema (S)	Época (E)	Camada (C)	SxE	SxC	ExC	SxExC
TNL	0,068	<0,001	0,040	0,037	0,518	<0,001	0,165
<i>AOA amoA</i>	0,638	<0,001	0,019	0,441	0,258	0,030	0,071
<i>AOB amoA</i>	0,017	0,102	0,247	0,113	0,756	0,055	0,201
<i>nirS</i>	0,714	<0,001	<0,001	0,852	0,963	0,037	0,714
<i>nosZ</i>	0,455	<0,001	<0,001	0,308	0,998	0,351	0,134
<i>nifH</i>	0,293	0,318	<0,001	0,120	0,476	0,476	0,163
Emissão acumulada	0,002						
Produtividade de grãos	<0,001						
Biomassa seca	0,011						
Emissão normalizada	0,432						

TNL – taxa de nitrificação líquida.

Figura – 11 Variação sazonal do espaço poroso ocupado por água (a) e temperatura do solo (b) na profundidade de 5,5 cm na safra de soja (18-19) afetado pelo sistema de manejo. Símbolos representam valores médios e as barras representam o erro padrão (*n* = 4)



CAPÍTULO 2

FERTILIZAÇÃO COM ^{15}N EM FORRAGEIRAS CONSORCIADA COM MILHO E A RECUPERAÇÃO PELA SOJA EM SUCESSÃO

RESUMO

Compreender o destino do nitrogênio (N) no milho (*Zea mays* L.) consorciado com forrageiras é fundamental para atender o gerenciamento sustentável da fertilização. Foi formulada a hipótese de que uma forrageira consorciada com milho poderia melhorar a produtividade e a recuperação de N fertilizante no sistema. O objetivo foi avaliar a influência de forrageiras tropicais como capim tanzânia (*Megathyrsus maximus* cv. Tanzânia) e capim ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) e um manejo sem forrageira (SF) na recuperação do N aplicado ao milho consorciado cultivado em segunda safra, e na soja [*Glycine max* (L.) Merrill] semeada em sequência. Um experimento de campo foi conduzido por dois anos agrícolas no sudeste do Brasil, com milho fertilizado ou não com nitrogênio. A maior recuperação de N no milho ocorreu no grão, e as forrageiras se mostraram eficientes como um reservatório de N, absorvendo até 14,7% do N fertilizante. A maioria do N aplicado ao milho permaneceu no sistema para a próxima safra, sendo parte recuperado pela soja cultivada em seguida. O solo se mostrou como o principal reservatório do N proveniente do fertilizante. As forrageiras absorvem boa parte do N fertilizante, mitigando possíveis perdas, o que resulta em maior recuperação de N pela soja, principalmente quando a produtividade e a absorção de N pelo milho são baixas.

Palavras chave: absorção de nitrogênio; forrageiras; leguminosas; ^{15}N .

ABSTRACT

Understanding the fate of nitrogen (N) in maize (*Zea mays* L.) intercropped with forages is essential to meet sustainable fertilization management and mitigate greenhouse gas emissions. It was hypothesized that a forage intercropped with maize could improve productivity and the recovery of ^{15}N of fertilizer in the system. The objective was to evaluate the influence of tropical forages such as guinea grass (*Megathyrsus maximus*) and ruzigrass (*Urochloa ruziziensis*) and a no forage (NF) management, in the recovery of ^{15}N of intercropped maize cultivated in second crop and in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeded in sequence, for this a two-year field experiment was conducted in southeastern Brazil, with maize fertilized or not with nitrogen. The highest recovery of N in maize occurred in the grain, while forages proved to be efficient as a reservoir of N, absorbing up to 14.7% of N fertilizer. Most of the N applied to maize remained in the system for the next crop, and part was recovered by the soybeans grown afterwards. Soil proved to be the main reservoir of N from the fertilizer. The forages take up a good part of the N-fertilizer mitigating possible losses, which results in greater recovery of N by soybeans, especially when maize yield and N uptake are low.

Keywords: nitrogen absorption; foragers; legumes; ^{15}N .

2.1 INTRODUÇÃO

Com aumento da população mundial e a limitação de terras agrícolas a fertilização com nitrogênio (N) desempenha um papel cada vez mais importante para garantir a segurança alimentar (TILMAN et al., 2011). Entretanto, 50% do N fertilizante aplicado no solo não é utilizado pelas culturas, elevando o N mineral no solo (N-NO_3^- e N-NH_4^+), passível de perdas por lixiviação, emissões gasosas e por escoamento superficial (ROSOLEM et al., 2017). Isso normalmente implica em poluição ambiental, sendo que a emissão de N como óxido nitroso (N_2O), por exemplo, está diretamente ligada ao aquecimento global (GALLOWAY et al., 2003).

O milho [*Zea mays* (L.)] é uma cultura mais utilizada em consórcio com forrageiras (KLUTHCOUSKI et al., 2003). Após a colheita do milho cultivado em segunda safra, as forrageiras são utilizadas como planta de cobertura na entressafra (julho a setembro), proporcionando a implantação da semeadura direta (BORGHI et al., 2013) da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. As forrageiras apresentam alta produtividade de matéria seca de biomassa e são eficientes na ciclagem de nutrientes, com isso o consórcio e/ou rotação entre as forrageiras e leguminosas são considerados sistemas produtivos, lucrativos e ecologicamente corretos (CHEN et al., 2017). As forrageiras apresentam boa tolerância à baixa disponibilidade de água no período da entressafra, devido ao sistema radicular profundo e abundante (CALONEGO; ROSOLEM, 2008), tornando ainda mais interessante a adoção do manejo consorciado (ROCHA et al., 2019; GRASSMANN et al., 2020; MATEUS et al., 2020; CRUSCIOL et al., 2021). Desta forma as forrageiras, por apresentarem relação C/N elevada, resultam em liberação gradual de N ao sistema, através da mineralização da palha após a dessecação (ALVARENGA et al., 2001).

A liberação de exsudados no solo por forrageiras pode afetar a biomassa microbiana do solo (SUBBARAO et al., 2006) dando origem a inibição biológica da nitrificação (IBN), sendo uma forma sustentável de diminuir a poluição ambiental causada pela fertilização com N (desnitrificação e lixiviação) melhorando a absorção e recuperação de N fertilizante (SUBBARAO et al., 2012).

Para obtenção de um sistema agrícola sustentável e eficiente se torna necessário conhecer o destino e a quantidade do N fertilizante no sistema produtivo (BURZACO et al., 2014). Ocorre grande variação na absorção de N fertilizante pela cultura do milho, podendo essa absorção ficar entre 27 a 66% do N aplicado (RIMSKI-

KORSAKOV; RUBIO; LAVADO, 2012; ROCHA et al., 2019; COSTA et al., 2021), e a recuperação do N residual pela safra subsequente é de apenas 5,4% de acordo com uma meta-análise global (SMITH; CHALK, 2018).

Práticas para reduzir perdas e diminuir a necessidade de N fertilizante têm sido desenvolvidas, incluindo a introdução de forrageiras no sistema, quando essas são cultivadas como plantas de cobertura (CRUSCIOL et al., 2015; COUTO-VÁZQUEZ; GONZÁLEZ-PRIETO, 2016; LUCE, et al., 2015). Esses sistemas de manejos podem recuperar a fertilidade do solo, fornecendo resíduos vegetais adicionais, reduzir possíveis erosões e aumentar o N orgânico do solo (SAINJU et al., 2000). Em um manejo somente com semeadura de forrageira, essa foi responsável por recuperar 50% de todo N aplicado (OLIVEIRA; TRIVELIN; OLIVEIRA, 2007), quando em consórcio com milho, a forrageira recuperou 4,5 kg ha⁻¹ de N (COSTA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2020; ALMEIDA et al., 2018), e em consórcio triplo composto por milho mais forrageira mais feijão guandu (leguminosa) essa recuperação sobe para 7,4 kg ha⁻¹ de N pela forrageira (COSTA et al., 2021). Portanto, a diversificação dos sistemas de manejos agrícolas, associando culturas de cobertura com culturas de rendimento oferece uma oportunidade para diminuir as perdas de N no sistema (SCHINDEWOLF et al., 2014; COSER et al., 2015; GALDOS et al., 2020) possibilitando aumentos na disponibilidade de N nesses manejos.

Contudo, algumas lacunas ainda precisam ser esclarecidas sobre a influência do manejo com forrageiras na aquisição do N fertilizante e o seu destino em um sistema rotacionado com soja. A hipótese deste estudo é que os sistemas de manejo com forrageira melhora a absorção e a produtividade do milho, aumentando a recuperação de ¹⁵N no sistema solo-planta, com reflexos positivos na cultura subsequente. Os objetivos foram avaliar (i) o cultivo de milho com diferentes sistemas de forrageiras para a recuperação do N fertilizante e (ii) o destino do N residual na safra de soja cultivada em sequência.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Descrição do estudo

Um experimento de campo em sequeiro foi conduzido em Botucatu, SP, Brasil (22° 49' S, 48° 26' W; 750 m) por dois anos agrícolas, representado com cultivo de milho segunda safra e soja verão. O solo local é um Rhodic Hapludox (SOIL SURVEY

STAFF, 2014) de textura argilosa. Antes do início do experimento, em outubro de 2018, o solo foi amostrado até 0-80 cm para análises das propriedades químicas, (RAIJ et al., 2001). Os teores de N-NH_4^+ , N-NO_3^- , N orgânico total (N total) e C orgânico total (C total), foram determinados seguindo a metodologia salicilato-hipoclorito (MULVANEY, 1996), VCl_3 -Griess (MIRANDA et al., 2001) e combustão a seco, (CHN-2000, LECO Corp., St. Joseph, EUA), respectivamente (Tabela 1).

O local de estudo normalmente apresenta invernos secos e verões quentes, com temperaturas médias anuais históricas mínimas e máximas de 15,3 e 26,1 °C, respectivamente, a precipitação média anual é de 1696 mm. A temperatura e precipitação durante o experimento se encontram na figura 1.

Tabela – 1 Propriedades físicas e químicas do solo da área experimental

Propriedade	Unidade	Camada (cm)				
		0-10	10-20	20-40	40-60	60-80
$\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$		4,7	4,6	4,7	4,9	5,0
MOS	g dm^{-3}	21	14	11	10	8
P_{resina}	mg dm^{-3}	7	10	6	3	3
H+Al^{+3}		48	48	45	39	37
K^+		3	2	1	1	1
Ca^{+2}	$\text{mmol}_c \text{ dm}^{-3}$	22	20	17	19	17
Mg^{+2}		15	14	10	9	9
CTC		88	84	73	68	64
SB		40	36	28	29	27
$\text{V}\%$		45	42	38	42	42
NH_4^+	mg kg^{-1}	10,1	8,5	9,1	8,0	7,8
NO_3^-		4,1	3,2	3,4	2,3	1,6
N Total	g kg^{-1}	1,6	1,4	1,2	1,0	0,9
C Total		21	18	15	12	12

MOS: Matéria orgânica do solo; CTC: Capacidade de troca catiônica; SB: Saturação de base

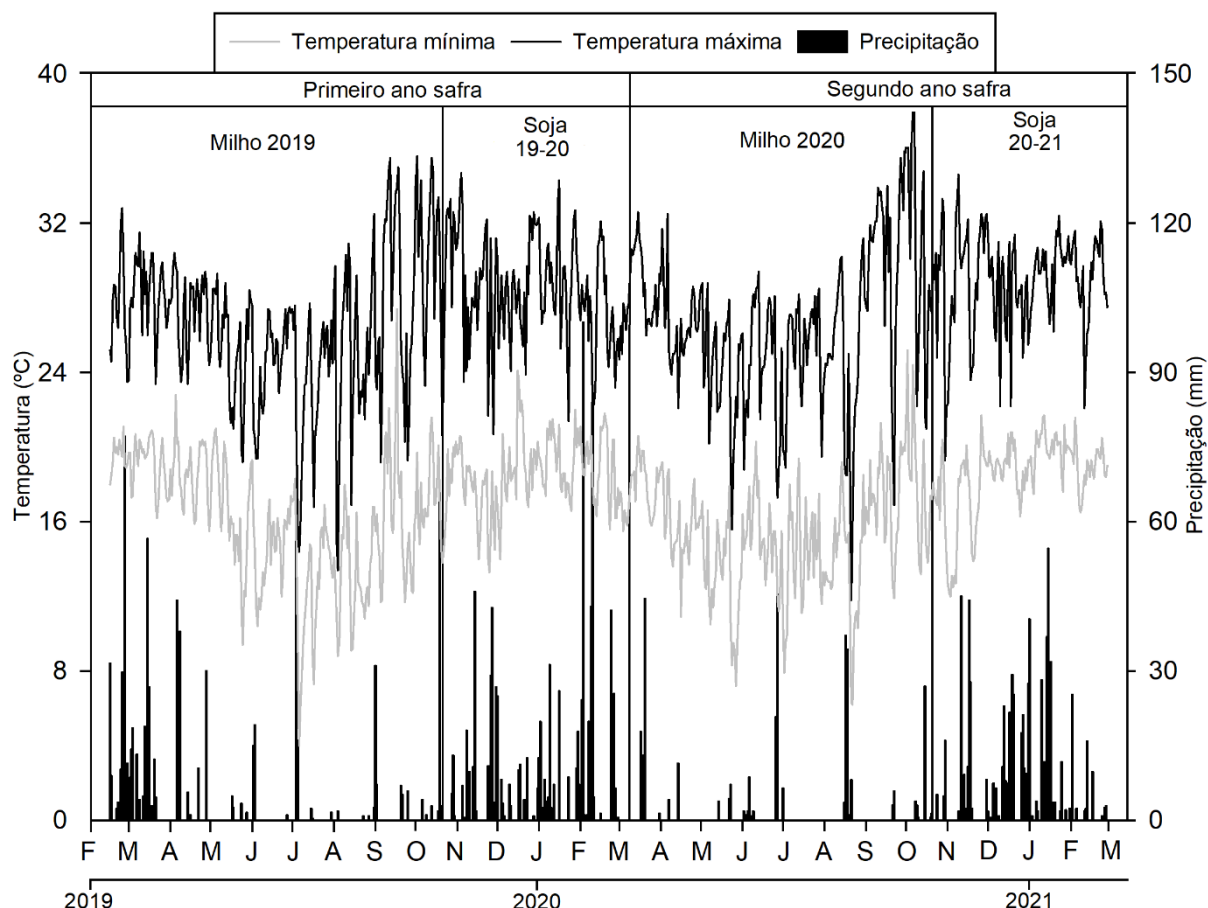
2.2.2 Design de estudo

O experimento foi conduzido em parcelas subdivididas e dispostas em blocos ao acaso, com quatro repetições. As forrageiras foram cultivadas nas parcelas, enquanto as doses de N foram alocadas nas subparcelas. O experimento foi iniciado em fevereiro de 2018 com a semeadura das forrageiras Ruziziensis (*Urochloa ruziziensis*) e Tanzânia (*Megathyrsus maximus*), além de um tratamento sem forrageira (SF) compondo os sistemas de manejo estudadas neste experimento. Em outubro de 2018 foi semeada a soja, sem aplicação de N.

Após a colheita da soja, em fevereiro de 2019, o milho de segunda safra foi semeado em consórcio com as forrageiras e em monocultivo (parcelas com 20 m

comprimento $\times$ 4,5 m largura), subdividindo-se as parcelas nas seguintes doses de N: controle não fertilizado e 120 kg ha⁻¹ de N, se iniciando as aplicações com ¹⁵N fertilizante. As subparcelas mediam 4,5 m $\times$ 10 m e dentro de cada subparcelas fertilizada foi inserida uma microparcela (1,5 m $\times$ 1,8 m) para avaliar o ¹⁵N.

Figura – 1 Temperatura do ar e precipitação durante o período experimental (fevereiro de 2019 à fevereiro de 2021).



2.2.3 Condução das culturas

Antes da semeadura do milho, em ambas as safras, a área foi dessecada quimicamente com 2 kg ha⁻¹ de glifosato (792,5 g kg⁻¹ de ingrediente ativo - i.a.). Todo o experimento foi conduzido em semeadura direta, utilizando uma semeadora adaptada. Foi utilizado o híbrido 30A37 PW - Morgan, com espaçamento entre linhas de 45 cm para atingir um estande final de 65 mil plantas ha⁻¹ em ambas as safras. A adubação constou da aplicação de 35 kg ha⁻¹ de P e 75 kg ha⁻¹ de K, como superfosfato triplo e KCl, respectivamente. As forrageiras foram semeadas na mesma

linha do milho com densidade de 10 kg ha^{-1} de sementes com 50% de valor cultural, misturadas com o fertilizante. Os tratamentos correspondentes ao fertilizante nitrogenado (sulfato de amônio) foram divididos da seguinte forma: 20 kg ha^{-1} de N na semeadura e 100 kg ha^{-1} de N em cobertura no estágio V5, aplicado em faixas cerca de 5 cm distante da linha. O milho foi colhido manualmente na maturidade fisiológica (R6) em julho de 2019 e 2020, e a palha da cultura (ou seja, folhas, caule e espiga) foram deixadas na superfície do solo. As forrageiras foram mantidas na área até dessecação química em setembro (2019 e 2020), sendo utilizado 4 kg ha^{-1} de glifosato ($792,5 \text{ g kg}^{-1}$ de ia) combinado com 1 L ha^{-1} de haloxifope-p-metílico (108 g L^{-1} de i.a.).

Em junho de 2019 foi realizada a aplicação superficial de $1,9 \text{ Mg ha}^{-1}$ de calcário, para correção da acidez do solo e $0,85 \text{ Mg ha}^{-1}$ de gesso agrícola.

Posteriormente, a cada safra de milho em monocultivo e consorciado foi cultivado a soja nos anos agrícolas de 19-20 e 20-21, utilizando a cultivar TMG 7062 IPRO, e espaçamento entre linhas de 45 cm, com estande 330 mil plantas ha^{-1} . A adubação constou da aplicação, por safra, de 35 kg ha^{-1} de P e 83 kg ha^{-1} de K, como superfosfato triplo e KCl, respectivamente. As sementes foram inoculadas utilizando-se uma solução de *Bradyrhizobium spp* no dia da semeadura (60 mL do i.a. para 50 kg de semente). No estágio de maturação R8 foi efetuada a colheita, em março de 2020 e fevereiro de 2021. A palha (folhas, caules e vagens) foi deixada na superfície do solo. Os tratos culturais para controle de pragas, doenças e herbicida durante todo o experimento, foram realizadas conforme as recomendações.

2.2.4 Microparcels com ^{15}N fertilizante

As safras de milho contaram com a instalação das microparcels nas subparcelas fertilizadas com N. Cada microparcela continha quatro linhas de milho, com quatro plantas em cada linha. Foi utilizado sulfato de amônio marcado [$^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] obtido da Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO, EUA) com uma abundância de 6,8 e 7,4% de excesso de átomos de ^{15}N na safra 2019 e 2020, respectivamente. O fertilizante sólido marcado com ^{15}N foi aplicado do mesmo modo que o $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não marcado: sobre a camada de palha, ao lado da linha de milho, porém apenas na cobertura (100 kg N ha^{-1}) no estágio V5 do milho. No cultivo da soja, não foi aplicado N fertilizante nas parcelas ou microparcels, visando avaliar a absorção do residual de ^{15}N pela leguminosa do N aplicado na cultura antecessora (milho).

2.2.5 Procedimento de amostragem e análises ^{15}N

Os procedimentos de amostragem de plantas de milho, e palha foram os mesmos em ambas as safras. Na maturidade fisiológica (R6), quatro plantas de milho do meio de cada microparcela foram cortadas na base do caule. As plantas foram divididas em grãos, folha + caule + sabugo. Amostras frescas foram secas em estufa à 65°C até massa constante, para avaliar a matéria seca da biomassa. O material foi posteriormente moído em um moinho Wiley e peneirado (0,50 mm). A determinação da abundância do ^{15}N foi usando um espectrômetro de massas de razão isotópica (IRMS; Delta V Advantage, Thermo Scientific, Alemanha) acoplado a um analisador elementar (Flash 2000, Thermo Scientific, Alemanha).

Amostras das forrageiras presentes nas duas linhas centrais (90 cm × 90 cm) foram cortadas rente ao solo. No mesmo local também foi amostrada a palha presente na superfície do solo (resíduos da estação de crescimento anterior). As amostras foram secas, moídas e analisados o teor de N total e abundância de ^{15}N conforme descrito anteriormente. Todas as partes da planta de milho, forrageiras e palha restantes foram devolvidas ao campo nas respectivas microparcelsas.

A amostragem de plantas de soja e palha sobre o solo foram as mesmas nas duas safras. Na maturidade fisiológica (R6), plantas presentes em 0,5 m das linhas centrais de cada microparcela (instalada no milho antecessor) foram cortadas na base da haste. As plantas foram divididas em vagem, folha + haste. Amostras de palha presentes nas duas linhas centrais (90 cm × 90 cm) também foram amostradas. As partes da soja e dos resíduos na superfície do solo foram secas, processadas e analisada conforme descrito anteriormente (^{15}N abundância).

Em ambas as safras de milho e soja, as amostras de solo foram coletadas usando um trado tubular (5 cm de diâmetro) nas profundidades de 0-10, 10-20, 20-40, 40-60 e 60-80 cm, em quatro pontos de cada microparcela, (i) dois pontos na entrelinha do centro da microparcela e (ii) dois pontos nas linhas que receberam ^{15}N fertilizante. Amostras de solo da mesma profundidade e posição de amostragem foram combinados ($n = 2$), secas a 40 °C, moídas em um moinho de bola, e passadas por uma peneira de 100 mesh para determinação de abundância do ^{15}N como descrito anteriormente. Para estimar o acúmulo de N no solo, a densidade do solo em cada

profundidade e posição foi avaliada em fevereiro de 2019 usando o método do anel volumétrico (BLAKE; HARTGE, 1986).

2.2.6 Cálculos e análises estatísticas

A quantidade de N derivado do fertilizante (Nddf), recuperação de ^{15}N no milho, forrageiras, soja, palha, solo, e ^{15}N não recuperado foram calculados usando as seguintes equações:

$$\text{Nddf (kg ha}^{-1}\text{)} = (a/b) \times \text{CN (1)}$$

$$^{15}\text{N recuperado (\%)} = (\text{Nddf}/\text{DNF}) \times 100 \text{ (2)}$$

$$^{15}\text{N não recuperado no milho (\%)} = 100\% - \%^{15}\text{N recuperado}_{\text{TM}} \text{ (3)}$$

$$^{15}\text{N remanescente após milho (\%)} = [(\text{Nddf}_{\text{TM}} - \text{Nddf}_{\text{GM}})/\text{DNF}] \times 100 \text{ (4)}$$

$$^{15}\text{N não recuperado na soja (\%)} = \{[(\text{Nddf}_{\text{TM}} - \text{Nddf}_{\text{GM}}) - \text{Nddf}_{\text{TS}}]/\text{DNF}\} \times 100 \text{ (5)}$$

$$^{15}\text{N não recuperado no primeiro/ segundo ano safra (\%)} = [^{15}\text{N}_{(2019/2020)} \text{ não recuperado no milho} + (^{15}\text{N remanescente após milho (2019/2020)} - \text{Nddf}_{\text{TS}} (19-20/ 20-21))]/ \text{DNF} \} \times 100 \text{ (6)}$$

onde Nddf é o N derivado de fertilizante; a e b é o enriquecimento ^{15}N (excesso de átomo% ^{15}N) no produto (planta, serapilheira ou solo) e substrato (fertilizante), respectivamente, ambos obtidos pela dedução da abundância natural (0,368 átomo% ^{15}N); CN é o conteúdo de N (kg ha $^{-1}$) no produto; ^{15}N recuperado é a porcentagem de recuperação de N do fertilizante; DNF é a dose de N fertilizante aplicada (kg ha $^{-1}$), como a dose utilizada foi de 100 kg N ha $^{-1}$ [$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] os valores de Nddf em kg ha $^{-1}$ e o recuperado em % são iguais, optou-se por apresentar os valores em % de ^{15}N recuperado; $^{15}\text{N}_\text{M}$ não recuperado (%) e $^{15}\text{N}_\text{S}$ não recuperado (%) são a porcentagem de fertilizante N não contabilizado (ou seja, perdas potenciais) no milho e na soja após aplicação de ^{15}N -fertilizante, respectivamente; ^{15}N recuperado $_{\text{TM}}$ é a recuperação total de N (%; soma da planta, palha e solo) no milho; Nddf $_{\text{TM}}$ e Nddf $_{\text{GM}}$ são o N derivado do N fertilizante (kg ha $^{-1}$) encontrado no sistema solo-planta e grãos, respectivamente, para o milho; e Nddf $_{\text{TS}}$ é o N derivado do fertilizante (kg ha $^{-1}$) no sistema solo-planta para a soja.

A análise estatística foi realizada por modelos lineares generalizados com o procedimento GLIMMIX do SAS (versão 9.4 M3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). O bloco foi considerado efeito aleatório nos modelos. A safra foi tratada como medida repetida no tempo usando a simetria composta para composição da matriz de covariância. Para as variáveis isotópicas, o sistema de manejo e a safra agrícola foram consideradas de efeito fixo, em um fatorial duplo. A produção de matéria seca da

biomassa no milho e na soja foram analisadas em um fatorial triplo considerando-se espécie de manejo, dose de N e safra agrícola como fatores fixos. Em caso de significância dos efeitos marginais e suas interações, as médias foram separadas por meio do procedimento LSMEANS com ajuste pelo *simulate*. A significância estatística é relatada ao nível de significância de 5%.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Distribuição e destino do ^{15}N fertilizante aplicado no milho e do ^{15}N residual na soja

Os tratamentos sem forrageira e com tanzânia resultaram em maior recuperação de ^{15}N nos grãos de milho em comparação a ruziziensis (Figura 2a). Na safra de milho 2019 a recuperação de ^{15}N nos grãos de milho com a ruziziensis foi menor, em comparação a sem forrageira e tanzânia, respectivamente. Na safra de milho 2020 essa diferença aumentou, passando a ser de 4,8 e 2,1%, respectivamente (Tabela 5 - material suplementar). A recuperação de ^{15}N nos grãos, folha + colmo + sabugo e parte aérea total foram 9, 6 e 15% menores na safra de milho 2020 quando comparado ao milho 2019 (Figura 2b, c, d). O ^{15}N recuperado nas forrageiras e na palha foi maior no milho 2020 (Figura 2e, f). A porcentagem de recuperação de ^{15}N na palha foi melhor nos manejos com ruziziensis e tanzânia na safra de milho 2020 (Figura 2g). Essas recuperações corresponderam a 3, 3,6 e 3,9% a mais de ^{15}N na palha em comparação à safra de milho 2019 nos tratamentos sem forrageira, ruziziensis e tanzânia, respectivamente (Tabela 5).

Uma menor recuperação de ^{15}N na parte aérea total do milho na safra 2020 resultou em maior absorção pelas forrageiras, chegando a recuperar até 14,7% de ^{15}N -fertilizante, e em média, foram encontrados 5% do N aplicado na palha dos tratamentos com ruziziensis e tanzânia. Esses dois depósitos corresponderam a quase 20% de todo ^{15}N -fertilizante aplicado, enquanto que sem forrageira foram recuperados apenas 3,6% na palha (Tabela 5).

O cultivado de milho com ruziziensis e tanzânia resultou em menor recuperação do ^{15}N -fertilizante no solo (Figura 2h), sendo 7,5% menor na tanzânia em comparação a sem forrageira. O fato de ter sido recuperado mais ^{15}N no solo sem forrageira é devido possivelmente à falta de raízes ativa para absorver e armazenar este N na parte aérea. Na safra de milho 2019 o tratamento sem forrageira recuperou 9,7% de

N a mais no solo em relação a *ruzizensis* e *tanzânia*. No entanto essas duas forrageiras foram responsáveis por recuperar em média 10% de N na parte aérea (Figura 2e).

O ^{15}N não recuperado no milho e o ^{15}N remanescente após o milho não foram influenciados pelos fatores analisados (Figuras 2i, j). Nas duas safras de milho a porcentagem de ^{15}N não recuperado no milho no sistema solo-planta atingiu 17% na média dos manejos utilizadas (Figura 2i), no entanto apesar de não ter ocorrido diferença estatística a espécie de manejo sem forrageira apresentou maior porcentagem de ^{15}N não recuperado no milho. O ^{15}N remanescente após as duas safras de milho foi de 63% em média, após a safra de milho 2020 o consócio com *ruzizensis* e *tanzânia* esse valor chegou a 70%, enquanto os demais tratamentos apresentaram 59% (Figura 2j). Essa maior porcentagem de ^{15}N remanescente após a safra de milho 2020 foi devida à introdução das espécies *ruzizensis* e *tanzânia*, pois a porcentagem de ^{15}N recuperado pela folha + caule + sabugo no milho variou de 6,8% a 7,6% e o recuperado pelo solo do milho variou de 43,2% a 46,1%, dentro d de manejos (Tabela 5).

A recuperação do ^{15}N residual na vagem e folha + caule na safra de soja 19-20 foram iguais entre os sistemas de manejos, no entanto na safra de soja 20-21 as recuperações do ^{15}N residual na vagem e folha + caule foram maiores com *ruzizensis* e *tanzânia*, recuperando 5% e 6% de ^{15}N residual, respectivamente, na ausência das forrageiras a recuperação foi de apenas 0,5% na vagem e 2,5% na folha + caule de recuperação (Figura 3a, b). Assim, a recuperação de 11% do ^{15}N residual remanescente na parte aérea total da soja 20-21 ocorreu na presença das forrageiras *ruzizensis* e *tanzânia* foi maior que sem forrageira (Figura 3c).

No entanto, o ^{15}N residual recuperado pela parte aérea total da soja na safra 19-20 não diferiu entre os manejos de forrageiras. Na palha, as maiores recuperações foram encontradas com *ruzizensis* e *tanzânia*, sendo o dobro em comparação a sem forrageira (Figura 3d).

Os manejos com *ruzizensis* e *tanzânia* na safra de soja 19-20 apresentaram maior recuperação de ^{15}N residual no solo em comparação com o manejo sem forrageira na safra 20-21 (Figura 3e). Observa-se que, para a recuperação de ^{15}N no solo na safra 19-20 não houve diferença entre os manejos com e sem forrageiras, enquanto que na safra 20-21 o manejo sem forrageira foi inferior a *ruzizensis* e *tanzânia*. O ^{15}N não recuperado na soja foi maior na ausência de forrageira em relação a *tanzânia* (Figura

3f), e o efeito das safras sobre o ^{15}N não recuperado na soja implicou em 24% a mais de ^{15}N não recuperado na safra de soja 20-21 em relação à safra 19-20 (Figura 3g).

A ausência de forrageira na safra de soja 20-21 resultou na maior quantidade de ^{15}N não recuperado no ano safra, com 21% e 24% a mais de ^{15}N não recuperado que a ruziziensis e tanzânia, respectivamente. A baixa recuperação sem forrageira correspondeu também a 53% a mais de ^{15}N não recuperado no ano safra 20-21 comparando com à média dos sistemas na safra 19-20 (Figura 3h). O ^{15}N não recuperado no ano safra 20-21 sem forrageira foi elevado pelo fato de ter ocorrido uma baixa recuperação de ^{15}N no solo desta safra neste tratamento (Figura 3e). Como consequência disso, a porcentagem de ^{15}N não recuperado na soja no sistema sem forrageiras também foi elevada em comparação a ruziziensis e tanzânia (Tabela 5), um outro ponto é que a safra antecedente, milho 2020, apresentou um valor de ^{15}N não recuperado no milho de 10% a mais sem forrageira em comparação com ruziziensis e tanzânia (Figura 2i).

2.3.2 Porcentagem de ^{15}N -fertilizante recuperado no solo nas safras de milho e ^{15}N -residual recuperado no solo nas safras de soja

Independentemente da camada de solo o ^{15}N recuperado foi semelhante entre os anos-safra. Nas duas safras de milho a recuperação foi maior na camada 0-10 cm em relação às camadas mais profundas, nota-se que o ^{15}N nessas camadas subjacentes ao 0-10 não apresentaram grandes diferenças entre o milho 2019 e 2020 (Figura 4a). As maiores recuperações de ^{15}N durante a cultura do milho foram verificadas sem forrageira e ruziziensis (Figura 4b).

Na cultura da soja o ^{15}N residual na camada 0-10 cm na safra 20-21 foi menor sem forrageira em comparação à presença de forrageiras (Figura 4c). A camada 10-20 cm sem forrageira na safra 20-21 foi inferior apenas à ruziziensis e tanzânia na safra 19-20 (Figura 4d). As demais camadas apresentaram menor recuperação no segundo ano safra (Figura 4e, f, g).

Figura – 2 Porcentagem ^{15}N nos grãos (a), na palha (g) e no solo (h) afetados pelos sistemas de manejo; ^{15}N nos grãos (b), folha + colmo + sabugo (c), parte aérea total (d), forrageiras (e) e palha (f) afetados pelas safras; ^{15}N não recuperado total (i) e remanescente total (j) afetados pela interação sistema de manejo $\times$ safras no milho. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. SF: Sem forrageira / Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia

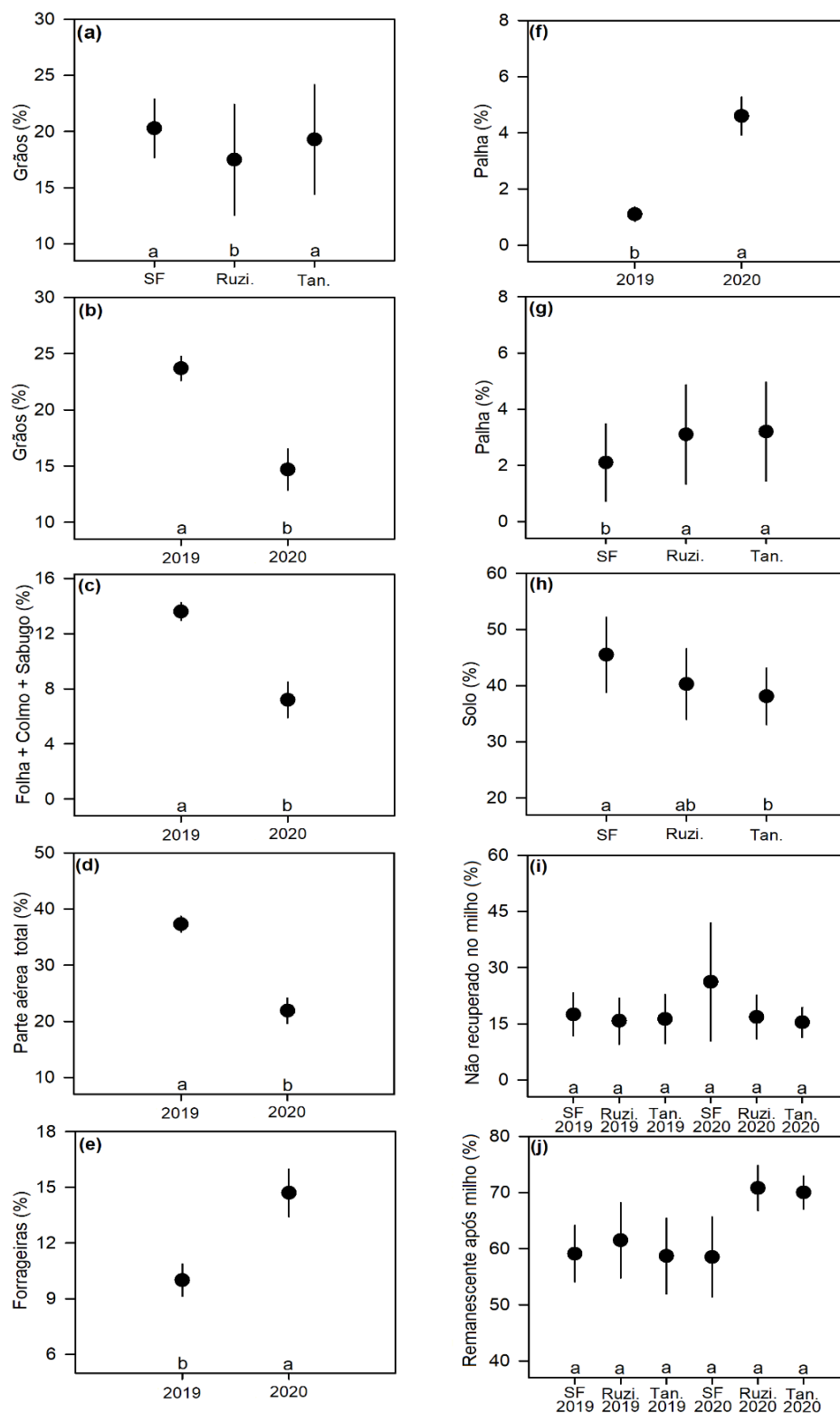


Figura – 3 Porcentagem de recuperação de ^{15}N residual na vagem (a), folha + caule (b), parte aérea total (c), solo (e) e o não recuperado total no ano safra (h) afetado pelo sistema de manejo $\times$ safras; ^{15}N residual na palha (d) na soja e não recuperado (f) afetados pelos sistemas de manejo; e ^{15}N não recuperado (g) afetado pelas safras. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. SF: Sem forrageira / Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia

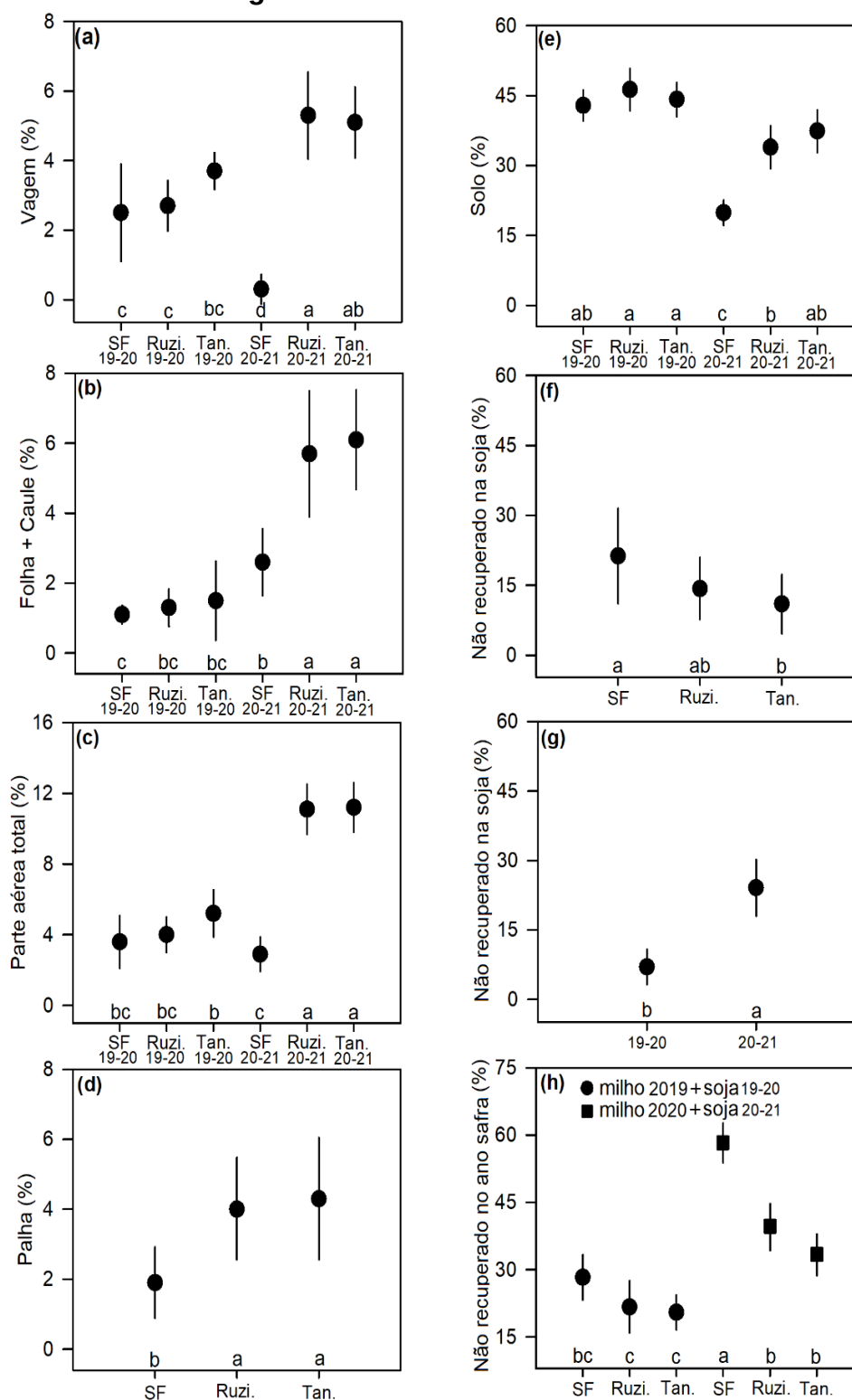
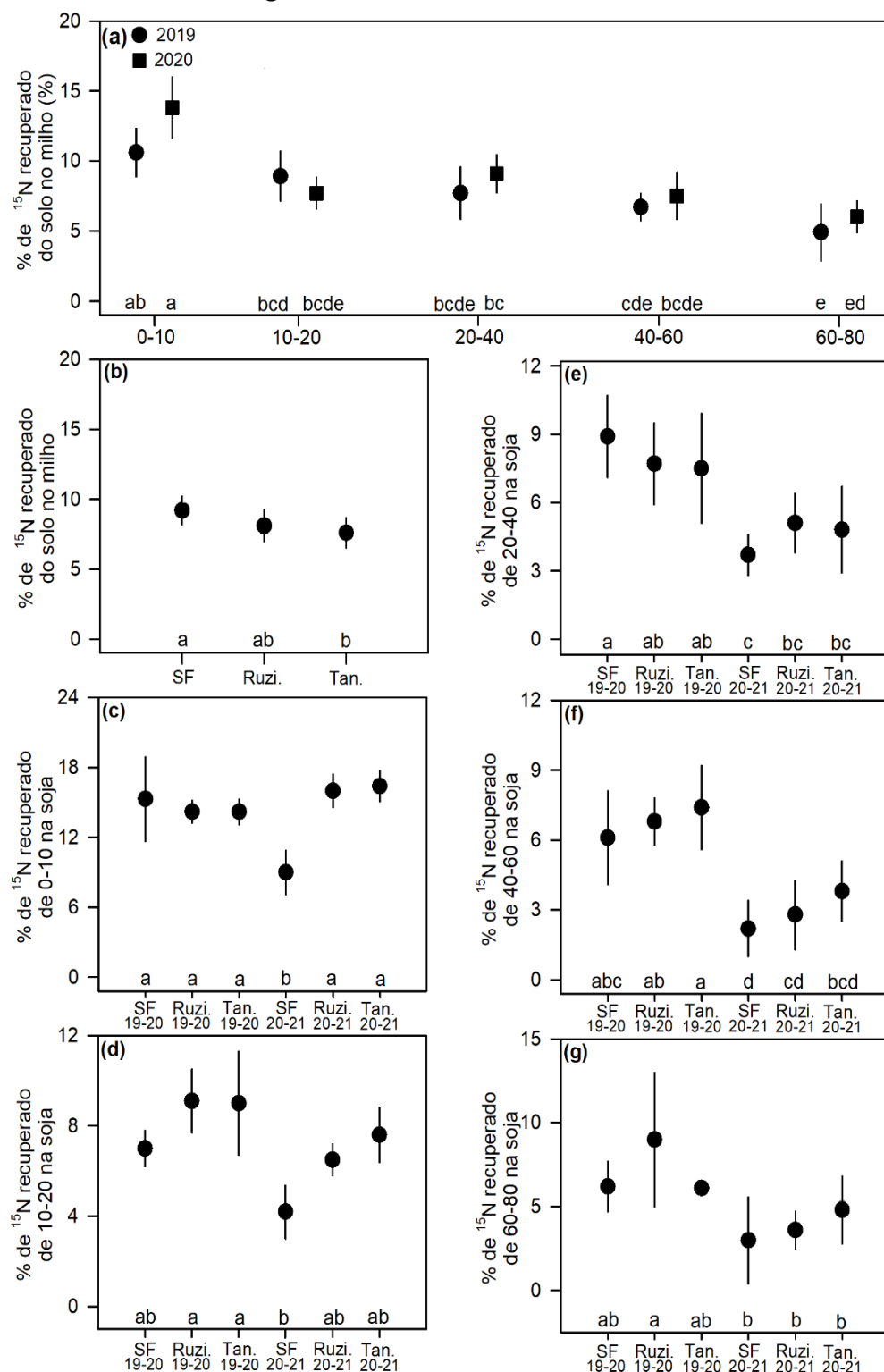


Figura – 4 Porcentagem de ^{15}N recuperado no solo para as safras de milho, afetados pelas camadas $\times$ safras (a) e sistema de manejo (b); ^{15}N recuperado no solo da soja afetado pela interação dos sistemas de manejo $\times$ camadas $\times$ safras, com desdobramento para as camadas de 0-10 (c); 10-20 (d); 20-40 (e); 40-60 (f); e 60-80 cm (g). Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. SF: Sem forrageira / Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia



2.3.3 Produção de matéria seca da biomassa de plantas

A matéria seca dos grãos de milho em 2019 sem forrageira foi superior em relação à ruziziensis e a tanzânia (Figura 5a). A matéria seca de grãos no milho 2019 sem N foi menor com ruziziensis, 4 Mg ha⁻¹ de grãos, seguida de tanzânia com 4,8 Mg ha⁻¹ e sem forrageira, com 5,6 Mg ha⁻¹ (Tabela 6 – material suplementar). Na safra de milho 2020 observou-se que a matéria seca de grãos foi maior com tanzânia, alcançando 4,2 Mg ha⁻¹, isso foi 0,45 e 0,75 Mg ha⁻¹ a mais em comparação com sem forrageira e ruziziensis, respectivamente (Figura 5a). O fornecimento de N ao milho aumentou a massa de matéria seca dos grãos em 0,8 Mg ha⁻¹ em comparação à testemunha sem N (Figura 5b). Nas safras de milho 2019 e 2020 a diferenças entre o manejo com e sem N foram de 0,9 e 0,7 Mg ha⁻¹ na média dos manejos com e sem forrageiras (Tabela 6).

O fornecimento de N aumentou a matéria seca de folha + caule + sabugo. A introdução de ruziziensis e tanzânia correspondem a maior produção de matéria seca, 6,5 Mg ha⁻¹ na média, correspondendo a 10% a mais que sem forrageira fertilizada com N (Figura 5c). No entanto, sem o fornecimento de N o manejo sem forrageira foi responsável pela maior produção de matéria seca de folha + caule + sabugo, com 15 e 7% a mais em comparação a ruziziensis e tanzânia, respectivamente. A parte aérea total do milho apresentou maior acúmulo de matéria seca com N, tanzânia correspondeu a 11,5 Mg ha⁻¹, sendo superior a ruziziensis e sem forrageira (Figura 5d). A matéria seca da parte aérea total também foi maior na safra de milho 2019 em comparação à safra 2020 (Figura 5e). O manejo sem forrageira acumulou 11,6 Mg ha⁻¹ na safra 2019 e o maior acúmulo de matéria seca na safra 2020 foi observado com tanzânia, 10,3 Mg ha⁻¹.

A ruziziensis produziu maior matéria seca de forrageiras nas duas safras de milho, 2,8 e 2,1 Mg ha⁻¹ na safra 2019 e 2020, respectivamente (Figura 5f), e o fornecimento de N também aumentou a matéria seca das forragens (Figura 6g). A matéria seca da palha sem N com tanzânia chegou a 3,7 Mg ha⁻¹, sendo superior aos manejos sem forrageira e ruziziensis (Figura 5h). A safra de milho 2020 correspondeu a uma maior matéria seca de palha (Figura 5i), os tratamentos fertilizados com N na safra de milho 2019 apresentaram, na média dos manejos com forrageiras, 2,1 Mg ha⁻¹ e na safra de 2020 a média foi de 4,2 Mg ha⁻¹. Sem N o milho apresentou nas safras 2019 e 2020, matéria seca da biomassa de palha de 2,1 e 3,7 Mg ha⁻¹, respectivamente (Tabela 6).

A matéria seca de vagem sem forrageira na safra de soja 19-20 foi 7,1 Mg ha⁻¹, sendo maior em comparação aos demais manejos nesta safra (Figura 6a), e também superior na soja 20-21. Menor matéria seca de vagem foi observada na soja 19-20 com a aplicação de N, isso correspondeu a menos 15%, mas na soja 20-21 essa diferença não ocorreu (Figura 6b). O manejo sem forrageira na safra de soja 19-20 apresentou 5,7 Mg ha⁻¹ correspondendo à maior matéria seca de folha + caule em comparação aos demais manejos (Figura 6c). Na soja 20-21, tanzânia resultou em maior matéria seca de folha + caule. Na safra de soja 19-20 e 20-21 a matéria seca de folha + caule foi, em média, de 5,0 e 5,5 Mg ha⁻¹, respectivamente (Tabela 6). A safra de soja 20-21 apresentou maior matéria seca com o fornecimento de N ao sistema, chegando a 6,1 Mg ha⁻¹ (Figura 6d), no entanto na safra de soja 19-20 o N não teve influência na produção de matéria seca de folha + caule.

No manejo sem forrageira e sem N foi observada a maior massa de matéria seca da parte aérea total da soja, na média das duas safras, 12,7 Mg ha⁻¹ (Figura 6e). Na safra 19-20, sem forrageira e sem N a matéria seca da parte aérea total acumulou 12,1 Mg ha⁻¹, ficando acima dos demais manejos nesta safra (Figura 6f). Na safra de soja 20-21 a *ruziziensis* apresentou apenas 11 Mg ha⁻¹ de massa da matéria seca. A massa de matéria seca da parte aérea total sem fornecimento de N na safra 19-20 foi maior em comparação ao manejo com o fornecimento de N (Figura 6g). Isso ocorreu possivelmente pelo fato desse manejo ter uma elevada biomassa na vagem (Figura 6b). No entanto, na safra 20-21 a maior matéria seca de parte aérea total foi observada com o fornecimento de N, chegando a 12 Mg ha⁻¹. Nas safras de soja 19-20 e 20-21 as massas de matéria seca da palha com N foram superiores (Figura 7h, i), e a diferença entre os tratamentos com e sem N na soja 19-20 foi de 3,4 Mg ha⁻¹, enquanto que na soja 20-21 foi de apenas 1,2 Mg ha⁻¹, considerando as médias dos manejos com forrageiras (Tabela 6).

Figura – 5 Matéria seca da biomassa do grão nas safras de milho (a), da parte aérea total (e), das forrageiras (f) e palha (i) afetados pelo sistema de manejo × safras; matéria seca da biomassa do grão (b) afetado pela fertilização com N; matéria seca da biomassa da folha + colmo + sabugo (c), da parte aérea total (d) e palha (h) afetado pelo sistema de manejo × fertilização com N; e matéria seca da biomassa das forrageiras (g) afetadas pelas doses de N. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. SF: Sem forrageira / Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia

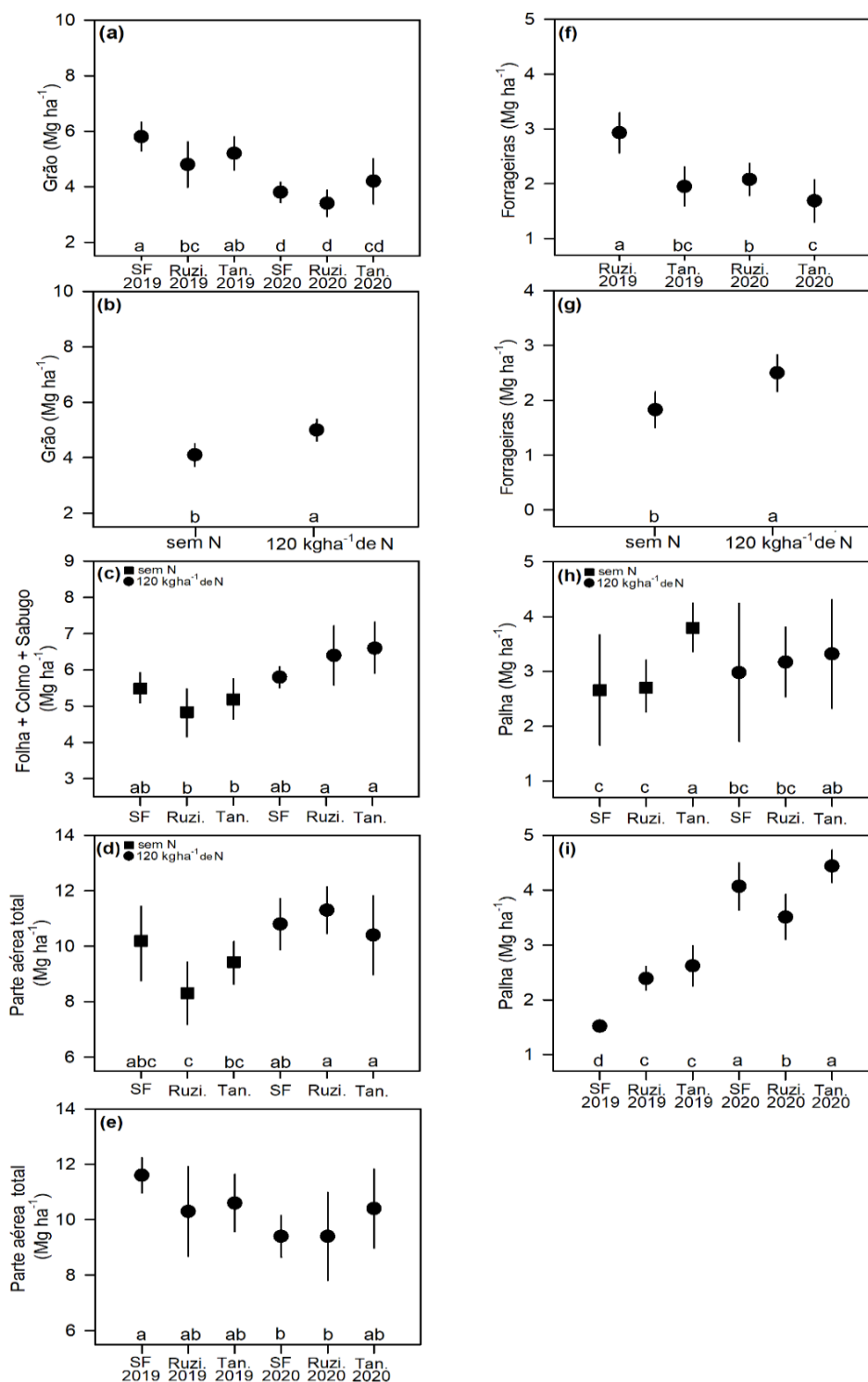
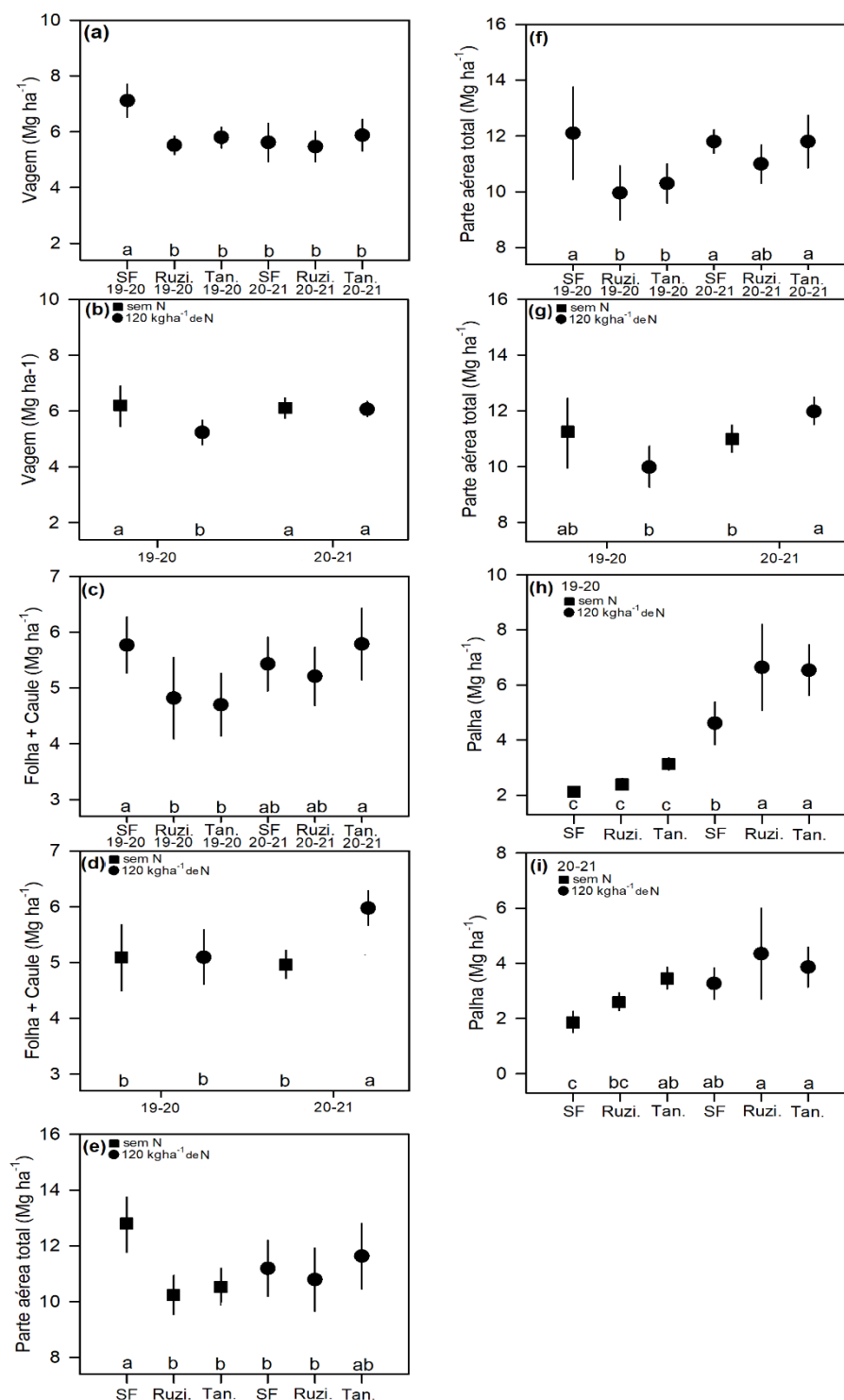


Figura – 6 Matéria seca da biomassa da vagem nas safras de soja (a), da parte aérea total (e) e da palha (h/i) afetados pelos sistemas de manejo × fertilização residual de N; matéria seca da biomassa da vagem (b), folha + caule (d) e parte aérea total (g) afetado pela safra × fertilização residual de N; matéria seca da biomassa da folha + caule (c) e parte aérea total (f) afetado pelo sistema de manejo × fertilização residual de N nas safras de soja. Os símbolos maiores e pretos representam as médias das observações e as barras verticais representam o intervalo de confiança para 95%. Letras iguais não indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. SF: Sem forrageira / Ruzi.: Ruziziensis / Tan.: Tanzânia



2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 N derivado do fertilizante e recuperação de ^{15}N na planta

O consórcio com *ruziziensis* resultou em menor matéria seca da biomassa e menor porcentagem de N acumulado nos grãos de milho. Efeitos deletérios dessa forrageira já foram relatados por Rocha et al. (2019) e Momesso et al. (2019) que observaram menor produtividade do milho quando cultivado em rotação ou em consórcio com *ruziziensis*. Em adição, Echer et al. (2012) observou que o crescimento e a absorção de N pelo algodoeiro foram reduzidos quando cultivado sobre resíduos de raízes da *U. ruziziensis*. Em regiões tropicais, a decomposição da palha sobre a superfície do solo é relativamente rápida quando comparada com regiões de clima temperado (REZENDE et al., 1999), entretanto, a mineralização do C da raiz é mais lenta, e estima-se que o C oriundo da raiz de *ruziziensis* apresente maior recalcitrância do que os resíduos de tanzânia (ABIVEN et al., 2005). Rosolem et al. (2012), separando as raízes de algodão de raízes de *ruziziensis* por meio do fracionamento isotópico C, observaram que as raízes dessa forrageira apresentaram valores elevados de relação C/N e perderam apenas 14% de sua massa inicial ao final do estudo, estimulando a imobilização de N do solo, o que pode ter diminuído a disponibilidade de N ao milho no presente experimento.

Na primeira safra de milho, a quantidade de N derivada do fertilizante e recuperada pela planta inteira encontra-se dentro do intervalo encontrado em estudos prévios, que variaram entre 36-64 kg ha⁻¹ (COELHO et al., 1988; GAVA et al., 2006; LIU et al., 2015; ROCHA et al., 2019). Porém, a menor recuperação de N na parte aérea total na safra de milho 2020 pode ser explicada pela diminuição no acúmulo de matéria seca devido à menor precipitação pluviométrica. Foram registrados 198 mm durante o ciclo do milho 2020, enquanto choveu 535 mm na safra 2019, o que pode ter reduzido a absorção de N pela planta e consequentemente menor recuperação de N pela cultura.

A maior parte do N absorvido pelo milho foi derivado do solo e não do fertilizante, como resultado da mineralização da MOS, em linha com estudos anteriores (GAVA et al., 2006; ROCHA et al., 2019), embora não possa ser descartada a possibilidade de fixação biológica de N pelas forrageiras, decomposição da palha e deposição úmida e seca (ROCHA et al., 2019). As forrageiras apresentam sistema radicular agressivo

e boa tolerância ao estresse hídrico (CALONEGO; ROSOLEM, 2008) e essas se mostraram eficientes na absorção de N derivado do fertilizante, com maior absorção na safra 2020, possivelmente pelo fato da maior disponibilidade de N no sistema, uma vez que N recuperado pelo milho 2020 foi 17% menor em relação à safra anterior. O sistema radicular apresenta potencial para diminuir possíveis perdas de N por lixiviação devido à absorção do N-mineral em camadas mais profundas (ROSOLEM et al., 2017), adicionalmente, culturas de cobertura não leguminosas são eficazes no aumento do N orgânico do solo, através do aumento da produção de biomassa (SAINJU et al., 2000).

O manejo com plantas de cobertura que incluem as forrageiras na entre-safra, possibilitam recuperar o N-fertilizante não absorvido pelo milho, evitando possíveis perdas por lixiviação de NO_3^- . Alguns trabalhos relatam a importância das forrageiras para aumentar a ciclagem do N lixiviado das camadas profundas do solo para a superfície, por meio da absorção do nutriente pela planta e posterior decomposição e mineralização dos tecidos vegetais (COSTA et al., 2021). A quantidade de N liberado pelos resíduos de plantas do ciclo fotossintético C_4 é menor do que resíduos de espécies C_3 , possivelmente pela maior relação C/N e uma ligação mais forte de N nos compostos orgânicos das espécies C_4 (ROSOLEM et al., 2010). Essa maior relação C/N atua na liberação de N no sistema, liberando este de forma mais gradual, suprimindo possivelmente períodos de maior exigência nutricional da planta cultivada em sucessão, diminuindo as possíveis perdas por lixiviação, além de aumentar a proteção do solo pela maior produção de biomassa e maior tempo de permanência sobre o solo.

Rocha et al. (2019) não observaram diferenças para o N não recuperado no milho cultivado sobre a palha de forrageiras, que atingiu valores da ordem de 15% do N aplicado. Similarmente, Almeida et al. (2018) reportaram o N não recuperado de 13% quando o milho foi cultivado em consórcio e de 18% com milho solteiro. Os valores de N não recuperado neste estudo são semelhantes aos valores relatados acima, e bem inferiores ao valor de 43 kg ha^{-1} relatado em uma meta-análise realizada por Gardner e Drinkwater (2009).

Embora o ^{15}N remanescente após a colheita do milho não tenha mostrado diferença entre os manejos, o ^{15}N residual disponível para a soja não se encontra apenas no solo, mas também nos resíduos vegetais deixados no campo, principalmente quando o milho foi consorciado com as forrageiras. Em sistemas de

cultivo com aporte de material vegetal com C orgânico disponível como fonte de energia ocorre maior ciclagem de N comparativamente à sistemas sem fornecimento de resíduos vegetais (CANTARELLA, 2007). Quando o fertilizante nitrogenado é aplicado, uma parte é absorvida pelo sistema radicular e parte aérea, enquanto outra parte permanece no solo, podendo ficar imobilizada, ser perdida no sistema solo-planta ou ser absorvida pela próxima safra (FENILLI et al., 2008).

Uma grande proporção do fertilizante nitrogenado permaneceu no sistema solo-planta após a colheita do milho, e isso possibilitou a absorção do N residual pelas forrageiras e pela soja cultivada em sucessão. Smith e Chalk (2018) observaram, em uma meta análise, recuperação de N residual na ordem de 5,4% para culturas subsequentes. Boaretto et al. (2004) em um manejo de trigo fertilizado com ^{15}N observou recuperação de 2% do N fertilizante no grão de soja. A baixa recuperação do ^{15}N residual na soja mostra que a contribuição da fertilização com N da safra anterior para uma cultura seguinte é limitada, e a maior parte do ^{15}N residual permanece no solo como N orgânico devido à imobilização, sendo liberado lentamente (LIU et al., 2015; SMITH; CHALK, 2018).

Considerando o porcentual de N proveniente do fertilizante encontrado na parte aérea da soja, pode-se inferir que o restante (93,7%) foi derivado de outras fontes, principalmente a FBN, visto que esse processo contribui com 70-240 kg ha⁻¹ de N (HERRIDGE; PEOPLES, 2008), enquanto que a quantidade de N fornecida pelo solo à soja é altamente variável (15-60 kg ha⁻¹) sendo dependente da textura, teor e qualidade da MOS, quantidade e relação C/N da palha vegetal, e do clima regional (HUNGRIA et al. 2006).

Embora o fertilizante nitrogenado desempenhe papel fundamental para elevar a produção agrícola, a entrada excessiva de N reduz a eficiência de uso do nutriente, além de aumentar o risco de poluição ambiental (HICKMAN et al., 2014). O milho apresenta potencial de absorção de até 50% do N fertilizante aplicado (ROCHA et al., 2019), enquanto 32% pode se imobilizado por microrganismos (OTTO et al., 2016). A fração restante está sujeita à mineralização, lixiviação e perdas gasosas de amônia ou óxido nitroso (AUSTIN et al., 2013). No entanto, quando a absorção de N do fertilizante pelo milho é baixa, quantificar o verdadeiro destino do N fertilizante se torna complexo, pois este pode destinar-se a imobilização microbiana ou ser perdido do sistema.

2.4.2 N derivado do fertilizante e recuperação de ^{15}N no solo

A quantidade de ^{15}N recuperado no solo nas safras de milho foi similar ao relatado por Rocha et al. (2019) e Oliveira et al. (2020), que foram de 43% e 42%, respectivamente. O ^{15}N residual no solo apresentou maiores quantidades na camada 0-10 cm, nas duas safras de milho e soja, por se tratar de um solo com alto teor de argila, o NH_4^+ derivado do fertilizante pode ser adsorvido no complexo de cargas dos coloides do solo, como relatado anteriormente (YANG et al., 1998). Devido ao alto grau de intemperização do solo do experimento, a fixação de NH_4^+ em minerais de argila 2:1 pode ser considerada baixa, devido à alta proporção de caulinita, um mineral 1:1 (NIEDER et al., 2011). Em outros estudos realizados em solo com predominância de argila, também foi observado maior acúmulo de ^{15}N na camada superficial do solo (ROCHA et al., 2019; COSTA et al., 2021).

As perdas do N do fertilizante por lixiviação (abaixo de 80 cm), se ocorreram, foram baixas visto que a recuperação de N na camada de 60 a 80 cm foi de apenas 5% na média das safras. Os níveis de N no solo foram muito baixos e a marcação com o traçador ^{15}N foi próxima à natural, indicando baixo deslocamento do N do fertilizante, semelhantes a outros estudos (ALMEIDA et al., 2018). Apesar de alguns estudos mostrarem que a inclusão de camadas mais profundas do solo (abaixo de 1 m) possa aumentar a recuperação do N residual em cerca de 22% na safra (WANG et al., 2016), no Brasil as perdas por lixiviação não são um grande problema (GHIBERTO et al., 2015). A lixiviação de N abaixo de 1,0 m mostrou ser baixa na maioria das regiões brasileiras, geralmente < 5% do N aplicado (GONZÁLES VILLALBA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2018).

2.5 CONCLUSÕES

O solo é o principal destino e reservatório do N oriundo do fertilizante na safra de milho e soja. A introdução de forrageiras no sistema reduz o N fertilizante que permanece no solo na safra de milho, evitando possíveis perdas em relação ao manejo sem forrageira. Assim, a soja cultivada depois do milho aproveita parte do N não absorvido pelo milho, principalmente nos sistemas com forrageiras nos anos quando a produtividade e a absorção de N pelo milho são menores.

Referências

- ABIVEN, Samuel et al. Mineralisation of C and N from root, stem and leaf residues in soil and role of their biochemical quality. **biology and Fertility of Soils**, v. 42, n. 2, p. 119-128, 2005.
- ALMEIDA, Rodrigo Estevam Munhoz de et al. Nitrogen recovery efficiency for corn intercropped with palisade grass. **Bragantia**, v. 77, p. 557-566, 2018.
- ALVARENGA, Ramon Costa et al. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2001.
- AUSTIN, Amy Theresa et al. Latin America's nitrogen challenge. **Science**, v. 340, n. 6129, p. 149-149, 2013.
- BLACK, C. A. Bulk Density in CA Madsion. **Methods of Soil Analysis**, p. 374-390, 1965.
- BOARETTO, Antonio Enedi et al. Fate of ¹⁵N-urea applied to wheat-soybean succession crop. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 265-274, 2004.
- BORGHI, E. et al. Intercropping time of corn and palisadegrass or guineagrass affecting grain yield and forage production. **Crop Science**, v. 53, n. 2, p. 629-636, 2013.
- BURZACO, Juan P.; CIAMPITTI, Ignacio A.; VYN, Tony J. Nitrapyrin impacts on maize yield and nitrogen use efficiency with spring-applied nitrogen: Field studies vs. meta-analysis comparison. **Agronomy Journal**, v. 106, n. 2, p. 753-760, 2014.
- CALONEGO, Juliano Carlos; ROSOLEM, Ciro Antonio. Estabilidade de agregados do solo após manejo com rotações de culturas e escarificação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 4, p. 1399-1407, 2008.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). Fertilidade do solo Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470. Câmara, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações agronômicas**, n. 147, p. 1-9, 2014.
- CHEN, Ping et al. Effects of reduced nitrogen inputs on crop yield and nitrogen use efficiency in a long-term maize-soybean relay strip intercropping system. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0184503, 2017.
- COELHO, A. M. et al. Balanço de nitrogênio (¹⁵N) em um latossolo vermelho-escuro fase cerrado cultivado com milho. 1988.
- COSER, Thais Rodrigues et al. Nitrogen uptake efficiency of maize in monoculture and intercropped with *Brachiaria humidicola* and *Panicum maximum* in a dystrophic Red-Yellow Latosol of the Brazilian Cerrado. **Crop and Pasture Science**, v. 67, n. 1, p. 47-54, 2015.

COSTA, Nidia R. et al. Recovery of ^{15}N fertilizer in intercropped maize, grass and legume and residual effect in black oat under tropical conditions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 310, p. 107226, 2021.

COUTO-VÁZQUEZ, Alejandra; GONZALEZ-PRIETO, Serafin J. Fate of ^{15}N -fertilizers in the soil-plant system of a forage rotation under conservation and plough tillage. **Soil and Tillage Research**, v. 161, p. 10-18, 2016.

CRUSCIOL, Carlos AC et al. Improving soil fertility and crop yield in a tropical region with palisadegrass cover crops. **Agronomy Journal**, v. 107, n. 6, p. 2271-2280, 2015.

CRUSCIOL, Carlos AC et al. Upland rice intercropped with forage grasses in an integrated crop-livestock system: Optimizing nitrogen management and food production. **Field Crops Research**, v. 261, p. 108008, 2021.

ECHER, Fábio Rafael et al. Crescimento inicial e absorção de nutrientes pelo algodoeiro cultivado sobre a palhada de *Brachiaria ruziziensis*. **Planta daninha**, v. 30, p. 783-790, 2012.

FENILLI, Tatiele Anete Bergamo et al. Fertilizer ^{15}N balance in a coffee cropping system: a case study in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1459-1469, 2008.

GALDOS, M. V. et al. *Brachiaria* species influence nitrate transport in soil by modifying soil structure with their root system. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

GALLOWAY, James N. et al. The nitrogen cascade. **Bioscience**, v. 53, n. 4, p. 341-356, 2003.

GARDNER, Jennifer B.; DRINKWATER, Laurie E. The fate of nitrogen in grain cropping systems: a meta-analysis of ^{15}N field experiments. **Ecological applications**, v. 19, n. 8, p. 2167-2184, 2009.

GAVA, Glauber José de Castro et al. Balanço do nitrogênio da uréia (^{15}N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, v. 65, p. 477-486, 2006.

GHIBERTO, Pablo Javier; LIBARDI, Paulo Leonel; TRIVELIN, Paulo Cesar Ocheuze. Nutrient leaching in an Ultisol cultivated with sugarcane. **Agricultural Water Management**, v. 148, p. 141-149, 2015.

GONZÁLES VILLALBA, Hugo Abelardo et al. Fertilizantes nitrogenados: novas tecnologias. **Informações agronômicas**, v. 148, p. 12-20, 2014.

GRASSMANN, Camila S. et al. Effect of tropical grass and nitrogen fertilization on nitrous oxide, methane, and ammonia emissions of maize-based rotation systems. **Atmospheric Environment**, v. 234, p. 117571, 2020.

HERRIDGE, David F.; PEOPLES, Mark B.; BODDEY, Robert M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and soil**, v. 311, n. 1, p. 1-18, 2008.

HICKMAN, Jonathan E. et al. Nitrous oxide (N₂O) emissions in response to increasing fertilizer addition in maize (*Zea mays* L.) agriculture in western Kenya. **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 100, n. 2, p. 177-187, 2014.

HUNGRIA, Mariangela et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006.

KLUTHCOUSKI, João; YOKOYAMA, L. P. Crop–livestock integration options. **Integração lavoura–pecuária**. (Eds J Kluthcouski, LF Stone, H Aidar)(Embrapa Arroz e Feijão: Santo Antônio de Goiás, GO) Available at, 2003.

LIU, Xiao-E. et al. The effect of plastic mulch on the fate of urea-N in rain-fed maize production in a semiarid environment as assessed by ¹⁵N-labeling. **European Journal of Agronomy**, v. 70, p. 71-77, 2015.

LUCE, Mervin St et al. Legumes can reduce economic optimum nitrogen rates and increase yields in a wheat–canola cropping sequence in western Canada. **Field Crops Research**, v. 179, p. 12-25, 2015.

MATEUS, G. P. et al. Corn intercropped with tropical perennial grasses as affected by sidedress nitrogen application rates. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 116, n. 2, p. 223-244, 2020.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species. **Nitric Oxide**, v. 5, p. 5-62, 2001.

MOMESSO, Letusa et al. Impacts of nitrogen management on no-till maize production following forage cover crops. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 2, p. 639-649, 2019.

MULVANEY, Richard L. Nitrogen—inorganic forms. **Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods**, v. 5, p. 1123-1184, 1996.

NIEDER, Rolf; BENBI, Dinesh K.; SCHERER, Heinrich W. Fixation and defixation of ammonium in soils: a review. **Biology and fertility of Soils**, v. 47, n. 1, p. 1-14, 2011.

OLIVEIRA, Patrícia Perondi Anchão; TRIVELIN, Paulo Cesar Ocheuze; OLIVEIRA, Wladecir Salles de. Urea ¹⁵N balance in the fractions of a *Brachiaria brizantha* cv. Marandu pasture under recovery with different liming dates. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 1982-1989, 2007.

OLIVEIRA, Silas Maciel et al. Closing the nitrogen budget of intercropped maize and palisadegrass. **European Journal of Agronomy**, v. 119, p. 126093, 2020.

OTTO, Rafael et al. Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: what is next?. **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1272-1289, 2016.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Campinas, **Instituto Agrônomo**, 285p. 2001.

REZENDE, C. d P. et al. Litter deposition and disappearance in Brachiaria pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. **Nutrient cycling in Agroecosystems**, v. 54, n. 2, p. 99-112, 1999.

RIMSKI-KORSAKOV, H.; RUBIO, G.; LAVADO, R. S. Fate of the nitrogen from fertilizers in field-grown maize. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 93, n. 3, p. 253-263, 2012.

ROCHA, Kassiano F. et al. Fate of ^{15}N fertilizer applied to maize in rotation with tropical forage grasses. **Field Crops Research**, v. 238, p. 35-44, 2019.

ROSOLEM, Ciro A. et al. Enhanced plant rooting and crop system management for improved N use efficiency. **Advances in agronomy**, v. 146, p. 205-239, 2017.

ROSOLEM, Ciro Antonio et al. Nitrogen immobilization by congo grass roots impairs cotton initial growth. **Journal of Agricultural Science**, p. 126-136, 2012.

ROSOLEM, Ciro Antonio; WERLE, Rodrigo; GARCIA, Rodrigo Arroyo. Lavagem do nitrogênio de resíduos de plantas C3 e C4 pela chuva. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 6, p. 1899-1905, 2010.

SAINJU, U. M.; SINGH, B. P.; WHITEHEAD, W. F. Cover crops and nitrogen fertilization effects on soil carbon and nitrogen and tomato yield. **Canadian journal of soil science**, v. 80, n. 3, p. 523-532, 2000.

SCHINDEWOLF, Marcus et al. Effects of contour banks and no-till measures on run-off and sediment yield in Campo Verde Region, Mato Grosso. **Interdisciplinary Analysis and Modeling of Carbon-Optimized Land Management Strategies for Southern Amazonia**, p. 85, 2014.

SMITH, Christopher J.; CHALK, Phillip M. The residual value of fertiliser N in crop sequences: an appraisal of 60 years of research using ^{15}N tracer. **Field Crops Research**, v. 217, p. 66-74, 2018.

STAFF, Soil Survery. Keys to soil taxonomy. **United States Department of Agriculture: Washington, DC, USA**, 2014.

SUBBARAO, G. V. et al. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with Brachiaria humidicola. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1, p. 101-112, 2006.

SUBBARAO, G. V. et al. Biological nitrification inhibition—a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. **Advances in agronomy**, v. 114, p. 249-302, 2012.

TILMAN, David et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

WANG, Shaojie et al. Fate of ^{15}N fertilizer under different nitrogen split applications to plastic mulched maize in semiarid farmland. **Nutrient cycling in agroecosystems**, v. 105, n. 2, p. 129-140, 2016.

YANG, J. E. et al. A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. **Soil Science Society of America Journal**, v. 62, n. 4, p. 1108-1115, 1998.

Material suplementar

Tabela – 2 Valores da probabilidade (*P*) para variáveis de planta e solo afetados pelos sistemas de manejo nas safras de milho (2019 – 2020) e de soja (19/20 – 20/21)

Variável	Sistema de manejo(M)	Safra (S)	M×S
Milho			
Grãos	0,009	<0,001	0,174
FCS	0,877	<0,001	0,839
PAT	0,172	<0,001	0,437
GF	0,453	<0,001	0,217
Palha	0,032	<0,001	0,220
Solo	0,048	0,073	0,470
NR _M	0,293	0,370	0,448
RT	0,091	0,086	0,205
Soja			
Vagem	<0,001	0,042	<0,001
FC	0,018	<0,001	0,001
PAT	<0,001	<0,001	<0,001
Palha	0,037	0,121	0,342
Solo	0,006	<0,001	0,001
NR _S	0,037	<0,001	0,595
NRT _{AS}	<0,001	<0,001	0,008

FCS: folha + colmo + sabugo; PAT: parte aérea total; GF: forrageira; NR_M: não recuperado no milho; RT: remanescente total; FC: folha + caule; NR_S: não recuperado na soja; NRT: não recuperado total no ano safra.

Tabela – 3 Valores da probabilidade (*P*) do solo afetados pelos sistemas de manejo, camada e ano safra para o milho (2019 – 2020) e a soja (19/20 – 20/21)

	Sistema de Manejo (M)	Camada (C)	Ano Safra (S)	M×C	M×S	C×S	M×C×S
Milho	0,045	<0,001	0,082	0,671	0,367	0,033	0,123
Soja	0,038	<0,001	<0,001	0,142	0,001	0,020	0,004

Tabela – 4 Valores de probabilidade (P) afetados pela espécie de manejo, nitrogênio e ano safra para o milho (2019 – 2020) e a soja (19/20 – 20/21)

	Sistema de Manejo (M)	Nitrogênio (N)	Safra (S)	M×N	M×S	N×S	M×N×S
Grão	0,161	<0,001	<0,001	0,205	0,011	0,310	0,128
FCS	0,865	<0,001	0,127	0,025	0,217	0,078	0,824
PAT	0,190	<0,001	<0,001	0,036	0,012	0,357	0,790
GF	<0,001	<0,001	<0,001	0,094	0,007	0,437	0,372
Palha	<0,001	0,351	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	0,478
Vagem	0,006	0,006	0,014	0,001	0,226	0,005	0,244
FC	0,050	0,012	0,008	0,079	0,001	0,001	0,278
PAT	0,001	0,927	0,002	0,001	0,011	<0,001	0,140
Palha	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,028	<0,001	0,010

FCS: folha + colmo + sabugo; PAT: parte aérea total; GF: forrageira; FC: folha + caule.

		Grãos	FCS	PAT	F	Palha	Solo		Palha	NRs
SF	Milho	23,4	13,6	37,0		0,6	44,8		1,7	10,8
Ruzi.	2019	22,7	13,5	36,1	9,4	1,4	37,3	Soja 19–20	4,9	5,9
Tan.		25,1	13,8	38,9	10,7	1,2	32,9		5,0	4,3
SF	Milho	17,2	6,8	24,1		3,6	46,1		2,0	31,7
Ruzi.	2020	12,4	7,6	20,0	14,9	5,0	43,4	Soja 20–21	3,1	22,8
Tan.		14,5	7,3	21,8	14,5	5,1	43,2		3,6	17,8

Tabela – 5 Porcentagem ^{15}N para as safras de milho 2019 e 2020 e porcentagem de ^{15}N para as safras de soja 19–20 e 20–21

SF: sem forrageira; Ruzi: ruziziensis; Tan: Tanzânia; FCS: folha + colmo + sabugo; PAT: parte aérea total; F: forrageiras; NRs: Não recuperado na soja.

Tabela – 6 Matéria seca da biomassa sobre a taxa de aplicação de N, para as safras de milho 2019 e 2020 e para as safras de soja 19–20 e 20–21

Sistemas de manejo	Taxa de N	Grãos	Folha+colmo +sabugo	Parte aérea total	Forrageira	Palha	Vagem	Folha + caule	Parte aérea total	Palha
Milho 2019 (Mg ha ⁻¹)							Soja 19–20 (Mg ha ⁻¹)			
Sem forrageira	Sem N	5,6	5,8	11,3	--	1,6	7,51	6,2	13,7	2,1
Ruziziensis		4,0	4,8	8,8	2,5	2,2	5,31	4,71	10	2,4
Tanzânia		4,8	5,0	9,8	1,6	2,7	5,73	4,37	10	3,1
Sem forrageira	120 kg ha ⁻¹ de N	6,0	5,8	11,8	--	1,6	5,17	5,33	10,5	4,6
Ruziziensis		5,7	6,1	11,8	3,2	2,5	4,99	4,93	9,9	6,6
Tanzânia		5,5	6,1	11,5	2,3	2,2	5,52	5,03	10,5	6,5
Milho 2020 (Mg ha ⁻¹)							Soja 20–21 (Mg ha ⁻¹)			
Sem forrageira	Sem N	3,5	5,3	8,8	--	3,8	6,74	5,07	11,8	1,9
Ruziziensis		3,1	4,7	7,8	1,9	3	5,73	4,73	10,4	2,6
Tanzânia		3,7	5,3	9,0	1,3	4,5	5,86	5,13	10,9	3,5
Sem forrageira	120 kg ha ⁻¹ de N	4,0	5,9	9,9	--	4,4	6,06	5,8	11,8	3,3
Ruziziensis		3,8	7,1	10,9	2,3	3,8	5,98	5,69	11,6	4,4
Tanzânia		4,7	6,9	11,6	2,1	4,4	6,24	6,46	12,8	3,9

CHAPTER 3

¹GREENHOUSE GASES EMISSION AND AMMONIA VOLATILIZATION FROM A SOYBEAN-MAIZE/FORAGE ROTATION UNDER NO-TIL

ABSTRACT

Fertilization with nitrogen (N) is an essential practice to ensure maize productivity, even when grown in rotation with soybeans, and the introduction of forages intercropped with maize has shown a possible biological inhibition of nitrification (BIN), while the rotation with soybean can optimize the use of N in the system. All this has a potential for reducing greenhouse gas (GHG) and ammonia (NH₃) emissions. A field experiment was conducted for three years in southeastern Brazil to evaluate the influence of forages and N fertilization on nitrous oxide (N₂O), carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄) and ammonia (NH₃) emissions from a soybean-maize/forage rotation, where N was applied to maize. Higher N₂O and CO₂ fluxes were observed soon after maize planting in the first year with small peaks during the experiment, while the CH₄ flux did not show great variation during the seasons, even with N fertilization¹. The soil N mineral (NH₄⁺) content was higher under maize without N fertilization, but this was not reflected in higher N₂O emission. The introduction of forages was not effective in decreasing N₂O emission, and NH₃ not affected. Normalized N₂O emission is low in tropical integrated systems, where the main source of N loss occurs through NH₃ volatilization.

Keywords: Nitrogen fertilization; *Urochloa*; *Megathyrus*; Nitrogen losses; *Zea mays* L.

3.1 Introduction

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is the most important oilseed because it is the world's largest source of protein for animal feed. Global soybean production has doubled since 2000 and more than quadrupled since 1980, showing a 160% increase in the harvested area in Brazil in this period (Fao, 2019), where it is the main crop. At the same time, maize (*Zea mays* L.) reached the stage of the cereal most produced in the world, reaching 1 billion tons, surpassing rice and wheat (Contini et al., 2019). In Brazil, a large area is cropped with soybean as the main crop and maize (intercropped or not with forage grasses) is grown as a relay crop. This has been a system both economic and environmentally sound system Grassmann et al. 2020). Soil C and

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Agriculture, Ecosystems & Environment

N accumulation have been shown in these systems in response to soil acidity amelioration (Barcelos et al., 2022) and with N fertilization (Grassmann et al., 2020), but little is known on the effect of the introduction of forages grasses interacting with nitrogen on GHG emission and ammonium volatilization. Most studies on GHG emissions in rotation systems in tropical regions have been carried out in single maize grown in succession to millet (Siqueira Neto et al., 2011), summer maize in rotation with forages (Grassmann et al., 2020) or intercropped (Canisares et al., 2021), or with soybean in succession to integrated crop-livestock system (ICLS) (Salton et al., 2014).

An interesting characteristic of systems with maize intercropped with forage grasses in rotation with soybeans is the opportunity to have active root systems for a longer period, which decreases N loss (Thorup-Kristensen et al., 2012). In addition to the rooting depth, a catch crop, such as forages of the genus *Urochloa*, must show rapid and early root growth ramification. It is also desirable that the crops develop enough vegetative tissue and high N accumulation to act as a good N cyclor. Although mineralization can increase N₂O emission from crop residues after desiccation, there are reports that avoiding excess N in the soil when plants cannot take it up would be a way to reduce it. Therefore, crop management strategies to reduce losses and increasing N use efficiency will also decrease N₂O emission (Snyder et al., 2009). Furthermore, some tropical forage grasses were shown to inhibit biological inhibition of nitrification (Subbarao et al., 2012), and recently this was also shown for maize, however, due to a smaller root system, IBN tends to be lower in maize (Canisares et al., 2021).

The ability of soybean to fix nitrogen (N) biologically (BNF) may be a strategic tool to increase soil N content (Thorup-Kristensen et al., 2003), which is important for C stabilization (Jantalia et al., 2007). However, soybean plant residues are rapidly mineralized due to the low C/N ratio (Rosolem et al., 2016). Conversely, maize residues mineralization is much slower due to its higher C/N ratio. Although maize has a high N requirement, it takes up around half of the applied N fertilizer (Rocha et al., 2019). Therefore, the balance of the N applied remains in the soil profile, and can be lost to the environment through ammonia (NH₃) volatilization and nitrous oxide (N₂O) emission, or can be immobilized in the soil microbial biomass.

The effects of N fixation by legumes or via fertilization can increase the rate of CH₄ oxidation in the soil (Raposo et al., 2020), although reports of reduction or even absence of effect have been observed (Cardoso et al., 2019). No-till associated with cropping systems with high residue production, along with the availability of N by FBN and N fertilizer affect crop residue mineralization, and so the efficiency of C sequestration and the emission of CO₂. It has been reported that high levels of N stimulate the decomposition of fresh plant residues (Cyle et

al., 2016), however, the decomposition is variable and dependent on the residue and soil N contents, the microbial community, availability of other nutrients, temperature and soil moisture (Barcelos et al., 2021). These factors are responsible for interfering with the respiration of microorganisms involved in the waste decomposition process, interfering with the emission of CO₂ (Barcelos et al., 2022).

The hypothesis of this study is that grass forages intercropped with maize can reduce GHG emissions and ammonia loss compared to single maize cultivation. The objectives were to evaluate the effects of (i) the introduction of forages in the mitigation of GHG emissions and ammonia volatilization, (ii) the interference of N fertilizer and a legume in the emission of N₂O and in the absorption of CH₄ by the soil.

3.2 Material and Methods

3.2.1 Local characterization, treatments and statistical design

A no-tilled rainfed field experiment was established in February 2018 in Botucatu (22°49' 50" S, 48°25'37" W; 750 m abs), Southeastern Brazil. The region has dry winters and hot humid summers, with average annual minimum and maximum temperatures of 15.3 and 26.1 °C respectively, and average rainfall of 1,545 mm. Prior to the establishment of the experiment, the vegetation consisted of mixed tropical perennial grasses. The soil is a Rhodic Hapludox (Soil Survey Staff, 2014). At the beginning of the experiment, the soil chemical properties were analyzed down to 80 cm according to Raij et al. (2001), total C and N (organic) were evaluated by dry combustion with a CHN-2000 analyzer (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). The N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ contents were determined by the salicylate-hypochlorite (Mulvaney, 1996) and VCl₃-Griess (Miranda et al., 2001) methods, respectively (Table 1). Rainfall and air temperature were recorded in a meteorological station close to the experiment (Figure 1).

The experiment was set out in split plots in a complete randomized block design with four replications. The forages ruzigrass (*Urochloa ruziziensis*) and Guinea grass (*Megathyrus maximus*, cv. Tanzania) plus a treatment without forage (NF) were assigned to the main plots. The subplots (10 m long x 4.5 m wide) comprised the nitrogen rates of 0 and 120 kg ha⁻¹ of N.

3.2.2 Conducting the experiment

Maize, hybrid 30A37 PW (Morgan), was planted in February 2019 with an estimated population of 65,000 plants ha⁻¹, in rows 0.45 m apart from each other, after the harvest of the previous soybean and application of 2.0 kg ha⁻¹ of glyphosate (792 g kg⁻¹ a.i.). Phosphorus was applied at 35 kg ha⁻¹ and potassium at 75 kg ha⁻¹ as triple superphosphate and potassium chloride, respectively. The forages were sown in the same row as the maize, at a density of 5.0 kg ha⁻¹ of pure live seeds, mixed with the fertilizer. In treatments with N fertilizer (ammonium sulfate) the application was split as follows: 20 kg ha⁻¹ at sowing and 100 kg ha⁻¹ banded 5 cm away from the crop line at the stage V5.

Weed control, pest and diseases were monitored and controlled according to regional recommendations.

Maize was harvested manually in June 2019, at stage R6. Maize residues (leaves, stems and bare cobs), along with the fresh biomass of the forages in the intercropped treatments were left on the soil surface. In June 2019, 1.9 Mg ha⁻¹ of limestone and 0.85 Mg ha⁻¹ of gypsum were surface applied to raise soil pH, over the standing grasses. The forages were chemically desiccated in September 2019 using 4.0 kg ha⁻¹ of glyphosate (792 g kg⁻¹ of a.i.) plus 1 L ha⁻¹ of haloxyfop-p-methyl (108 g L⁻¹ of a.i.). Two weeks after desiccation, soybean, cv. TMG 7062 IPRO, was planted in rows 0.45 cm apart aiming a population of 300,000 plants ha⁻¹. Fertilization consisted of the application of 35 kg ha⁻¹ of P and 83 kg ha⁻¹ of K as triple superphosphate and potassium chloride, respectively. The seeds were inoculated with a solution of *Bradyrhizobium* spp. at 1.2 mL kg⁻¹ of seed.

Soybean diseases, pests and weeds were monitored and controlled according to recommendations for the region.

At the R8 maturation stage (Fehr and Caviness 1977) soybean was harvested (March 2020), and plant residues (leaves, stems and husks) were left on the soil surface. Then maize was planted and grown under the same practices as in the previous year, and harvested in June 2020. In October 2020 soybean was planted again and managed following the same agricultural practices described for the previous crop, and it was harvested in March 2021.

3.2.3 Gas sampling and analysis

The N₂O, CH₄ and CO₂ fluxes were measured from February 2019 to February 2021 using static chambers (Pavelka et al., 2018). A rectangular-shaped galvanized steel base (45 cm wide × 50 cm long × 15 cm high) was inserted approximately 5 cm deep into the soil, occupying the

whole space between the crop rows. The chamber was installed at sowing and remained in the same position until harvest. For greater representativeness of the effect of fertilization, 50% of the N fertilizer corresponding to the sowing line was applied inside the chamber and the rest on the outside, since the base of the chamber was positioned between-rows. An opaque non-vented polypropylene lid (47 cm wide × 52 cm long × 10 cm high) was flange-fitted around the upper edge of the base. Water was added to the flange to create an airtight seal. A rubber septum (0.5 cm in diameter) was placed in the center of the cap. Before sampling, 40 mL of gas was withdrawn with a polypropylene syringe and reinjected into the chamber to mix the air inside. A gas sample (10 mL) was taken 0, 10 and 30 min after closing the chamber, between 9:00 am and 10:00 am, as recommended by Alves et al. (2012), kept in the syringe under refrigeration and analyzed as soon as possible. Gas samples were taken 1, 3, 5, 8, 15 and 30 d after planting and after N banding, and fortnightly throughout the experiment. Samples were analyzed for N₂O, CH₄ and CO₂ within 24 h of sampling with a gas chromatograph (GC-2014, Shimadzu Corp., Japan) equipped with flame ionization detection (FID) for CH₄ and electrons capture detector via ⁶³Ni (ECD) for N₂O. The FID and ECD operated at 250 and 325 °C, respectively, and N₂ (99.999%) was used as carrier gas. Four standards of each GHG were used to plot the calibration curve. In addition to gas sampling, soil temperature and volumetric water content were measured at a depth of 5.5 cm near the chamber using humidity and temperature sensors (Teros 11, Meter Group Inc., Pullman, WA, USA). Soil volumetric water content was converted into water-occupied pore space (WFPS) as follows

$$\text{WFPS} = \text{VWC} / [1 - (\text{SD} / \text{DSP})]$$

where WFPS is the water-filled pore space (%); VWC is the volumetric water content (%); SD is the soil density (g cm³); and DSP is the density of soil particles (g cm³). SD and DSP were evaluated by the volumetric ring and volumetric flask method, respectively (Blake et al., 1986).

3.2.4 Ammonia sampling and Analysis

To determine NH₃ losses from the soil-plant system, an open static chamber was used according to Pacheco et al. (2017). A polyurethane foam (12 cm × 12 cm × 2 cm) was treated with 22 mL of 0.17 M H₃PO₄ in 4% (v/v) glycerol solution and placed in an opaque polystyrene box. The open chamber was fixed to a steel bar and held above the canopy (chamber height was periodically changed) to capture the NH₃ evolved from the soil and foliage. The traps were changed 1, 3, 5 and 10 d after Planting and after N banding in maize. For soybean, the

intensification in changes occurred just after planting. The NH_3 trapped in the acidified foam was extracted with 100 mL of deionized water, and was determined colorimetrically (Mulvaney, 1996). Although emission measured in open chambers may be lower than in closed chambers, they can be used to compare treatments under identical environmental conditions (Mariano et al., 2012).

3.2.5 Dry matter and grain production

To estimate dry matter yield at the R6 stage of maize, four plants were randomly sampled within the plot. In intercropped treatments the forage was also sampled. For soybean, the plants present in 1 m of row were cut at the base of the stem. Maize grain yield (R6 stage) was estimated by harvesting the ears in 12 m of row, and soybean harvest was carried out at the R8 stage using plants present in 8 m of rows. Yield was corrected to 13% moisture (wet basis).

3.2.6 Soil nitrate and ammonium sampling and analysis

To monitor the mineral N content, the soil was sampled using a tubular auger (5 cm diameter) at depths of 0-10 and 10-20 cm. Soil samples were taken at three times: October 2019, January 2020 and October 2020. To extract the mineral N forms, 5 g of wet soil was stirred with 2 M KCl (in a soil: solution ratio of 1:5 - m/v) on an alternative shaker (200 revolutions min^{-1} for 1 h) and filtered using filter paper N°42. Nitrogen as NH_4^+ and NO_3^- were determined using the salicylate-hypochlorite and VCl₃-Griess method, respectively (Mulvaney, 1996; Miranda et al., 2001).

3.2.7 Calculations and statistics

The fluxes of greenhouse gases (N_2O , CH_4 and CO_2) were calculated using the equation:

$$\text{GHG flow} = (\Delta C / \Delta t) \times (V / A) \times m \times [P / (T \times R)] \times n \times 24$$

where the GHG flux is the flux of N- N_2O ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$), C- CO_2 ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$) and C- CH_4 ($\text{mg m}^{-2} \text{d}^{-1}$); $\Delta C / \Delta t$ is the linear coefficient of variation of the gas concentration ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) during the sampling period Δt (h); V and A are the volume (m^3) and area (m^2) of the chamber, respectively; m is the molecular weight (g) of each gas; P is atmospheric pressure (atm); T is

the soil temperature (K); R is the gas constant; n is the ratio between the molecular weight of N in N₂O, C in CO₂ and CH₄; and 24 is the factor to convert hours to days.

The NH₃ (RLNH₃) loss rate was calculated using the following equation:

$$RLNH_3 = NH_3/\Delta t$$

where RLNH₃ is the rate of loss of N in the form of NH₃ (g ha⁻¹ d⁻¹); NH₃ is the emission of N as NH₃ (g ha⁻¹) in each subperiod; and Δt is the time interval (d) between acid trap replacement.

The cumulative GHG emission and NH₃ loss were calculated by trapezoidal integration using SigmaPlot (version 14.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

The normalized emission of N₂O, CO₂ and CH₄ and NH₃ was calculated as follows:

$$NE = E/Y$$

where NE is the normalized emission of N as N₂O (kg Mg⁻¹ grain), of C as CO₂ (kg Mg⁻¹ grain), absorption of C as CH₄ (kg Mg⁻¹ grain) and N as NH₃ (kg Mg⁻¹ grain); E is the cumulative emission of gas in each year (kg ha⁻¹); and Y is the total grain yield (maize + soybean) in each year (Mg ha⁻¹).

The N₂O emission factor was calculated using the following equation:

$$FI = [(N_2O_{fert} - N_2O_{con})/FNR] \times 100$$

where FI is the fertilizer-induced N₂O emission factor (%); N₂O_{fert} and N₂O_{con} are the cumulative emissions of N-N₂O (kg ha⁻¹) in treatments fertilized with N and control, respectively; and FNR is the fertilizer N rate applied to maize (kg ha⁻¹ of N).

Statistical analysis was performed using generalized linear models and SAS GLIMMIX procedure (version 9.4 M3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Blocks were considered random effect in the models. The GHG emission, NH₃ volatilization, grain yields (maize + soybean) and biomass dry matter [(total maize shoot + soybean) + (forage)] were summed to represent the data on an annual basis. Thus, in addition to forage and nitrogen fertilization as fixed effects, the crop was treated as a repeated measure in time, using composite symmetry for the composition of the covariance matrix. Soil mineral N was analyzed in a similar way to the variables above, considering the sampling time as a repeated measure, in addition to forage and

N fertilization factors. LSMEANS procedure with adjustment by simulate. Statistical significance was reported at $P < 0.05$.

3.3 RESULTS

3.3.1 Environmental conditions and soil properties

Rainfall was 1,594 and 1,129 mm in the first and second years, respectively. The minimum air temperature ranged from 3.4 °C to 25.2 °C, while the maximum air temperature ranged from 13.4 °C to 37.2 (Figure 1).

WFPS and soil temperature were similar between treatments, ranging from 6% to 69% during the experimental period, with an average of 40% and 24% for the first and second crop years, respectively (Figure 2a). Soil temperature followed the air temperature pattern, ranging from 15.7 °C to 33.9 °C throughout the experiment (Figure 2b).

3.3.2 Emissions of nitrous oxide, methane, carbon dioxide and ammonia

In general, the average flows of C-CH₄, C-CO₂ and the losses of N-NH₃ in the maize/soybean rotation were similar in the period of two years. During the experimental period, the fluxes of N-N₂O ranged from 0.1 to 4.5 mg N m⁻² d⁻¹ between treatments. Higher flows were observed right after maize planting in 2019 compared with 2020. The average N₂O flow in the first and second crop years were 0.78 and 0.47 mg N m⁻² d⁻¹, respectively, (Figure 3a).

The CH₄ flux ranged from -1.0 to 0.48 mg C m⁻² d⁻¹, and was a consistent dominance of negative CH₄ fluxes, with absorption occurring from February 2019 to March 2021 (Figure 3b). Positive fluxes were observed after planting and N banding to maize in 2020. The average CH₄ fluxes were -0.24 and -0.22 mg C m⁻² d⁻¹ in the first and second crop years, respectively. The CO₂ fluxes ranged from 570 to 6,472 mg C m⁻² d⁻¹, generally with higher fluxes after crop planting (Figure 3c), and averaged 2,103 and 2,728 mg C m⁻² d⁻¹ in the first and second crop years, respectively.

The N-NH₃ loss rates ranged from 1.0 to 337.0 g N ha⁻¹ d⁻¹, and in 2019 peak losses of over 100 g N ha⁻¹ d⁻¹ were observed in maize one day after planting. The average daily losses were 55 and 50 g N ha⁻¹ d⁻¹ in the first and second crop years, respectively (Figure 3d). Greater NH₃ losses were observed after planting and N banding.

Fertilization with N increased the accumulated N_2O emission by 22% compared with the management without N (Figure 4a), and in the first crop year the accumulated N_2O emission was higher (Figure 4b). Maize was responsible for increased N_2O losses in 2019, accumulating, on the average of the forage species, 0.55 and 0.72 kg ha^{-1} of N with and without N, respectively (Table S2). The introduction of ruzigrass and Guinea grass increased CO_2 emission by 30 % in the first crop year compared with single maize (Figure 4c). However, in the second crop year, CO_2 accumulated emission was not changed by forage introduction. Volatilization of NH_3 was not affected by the different managements (Figure 4d).

Grain yield (maize + soybean) responded to N application in the first year, and when Guinea grass was intercropped it was 6% and 10% higher than single maize and ruzigrass, respectively. This higher grain yield was a result of better soybean development on Guinea grass residues, yielding 4.9 Mg ha^{-1} of grains, while without forage and after ruzigrass the yields were 4.2 and 4.1 Mg ha^{-1} , respectively. The average maize grain yield when intercropped was 5.8 Mg ha^{-1} with N fertilization (Table S2). In N fertilizer absence, intercropping with ruzigrass and Guinea grass decreased maize yields by 17 % and 11 %, respectively, compared with single maize (Figure 5a). However, this difference was not observed for the next soybean crop.

Nitrogen application resulted in higher grain yields in the second crop year also. However, single maize showed the highest grain yield, 16% and 11% more than when intercropped with ruzigrass and Guinea grass, respectively (Figure 5b). Soybean grain yield in the second crop year was lower over ruzigrass residues, 0.8 and 0.6 Mg ha^{-1} lower compared with without forage and Guinea grass, respectively.

The biomass dry matter with N application averaged over the two seasons was, respectively, 13% and 15% higher with ruzigrass and Guinea grass compared with no forage (Figure 5c). However, without N, the management single maize showed 11% more biomass than ruzigrass, with no difference from Guinea grass.

The normalized emissions of N_2O and CH_4 on the second year were 20% and 14% lower than in the first year (Figure 6a, b), while the highest normalized CO_2 emission was observed in the second year (Figure 6c). The normalized CO_2 emission was further influenced by N fertilization, which decreased it by 12% (Figure 6d). The introduction of ruzigrass and Guinea grass were responsible for a 25% increase in the normalized CO_2 emissions compared with single maize (Figure 6e). Also, ruzigrass and Guinea grass resulted in the highest normalized NH_3 emission (Figure 6f).

3.3.3 N-mineral content in the soil

Soil N-NH_4^+ increased during the experiment, even in treatments without N fertilizer (Figure 7a, b). In the 0-10 cm layer it was higher with N and no forages, reaching 21 mg kg^{-1} (Figure 7a). In the 10-20 cm layer the highest NH_4^+ content (17 mg kg^{-1}) without forages and in the absence of N fertilization (Figure 7b).

The N-NO_3^- levels remained below 5 mg kg^{-1} in the 0-10 cm layer, and below 3 mg kg^{-1} in the 10-20 cm layer throughout the experiment (Figure 7c, d). However, NO_3^- under single maize ranged from 10 to 13 mg kg^{-1} in October 2019 and 2020 with N fertilization, respectively. In the 10-20 cm layer without forages, the NO_3^- levels were 9 mg kg^{-1} in October 2019 and 5 mg kg^{-1} in October 2020.

The mineral N levels ($\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$) in the 0-10 cm layer in treatments with N fertilizer, in October 2020, were 34, 12 and 12 mg kg^{-1} for treatments without forage, ruzigrass and Guinea grass, respectively. Without N fertilizer, it was found 20, 11 and 19 mg kg^{-1} of mineral N, respectively for no forages, ruzigrass and Guinea grass.

3.4. DISCUSSION

3.4.1 GHG flux and ammonia volatilization

Nitrous oxide is generated through both nitrification and denitrification (Yan et al., 2015), which are influenced by soil moisture and N fertilizer application N_2O (Kreye et al., 2007). With 35% to 60% of the soil pore space occupied by water (WFPS emission of N_2O by nitrification is favored, and it was observed a very high correlation of emissions with soil moisture (Souza et al., 2021). In the present experiment, the volume of pores occupied by water was 36% on average, suggesting that nitrification may have been the dominant process in the synthesis of N_2O . However, WFPS peaks of the order of 60% were observed shortly after maize planting in 2019, corresponding to the highest N_2O fluxes. In this situation denitrification may have been occurred, enhancing N_2O loss (Jantalia et al., 2007). Therefore, in addition to nitrification loss, denitrification may also have affected N_2O formation during short periods.

The negative CH_4 fluxes throughout the experiment show that these cropping systems used in tropical climate tend to absorb more CH_4 than emit, possibly due to the low WFPS. Well aerated soils are recognized as a CH_4 sink while flooded agricultural areas are classified as a source. Excess water in the soil, or hypoxia, results in increased methanogenesis, consequently increasing CH_4 emissions (Mosier et al., 2004).

Similar CO₂ peak emissions were observed between treatments regardless of the type of management. The largest fluxes that occurred soon after planting were caused by soil disturbance. Though this movement is small and localized under no-till, it was enough to raise CO₂ emissions, what has been observed before (Rutkowska et al., 2018). The reason for the loss is the exposure of the labile fraction of SOM, which ends up favoring the oxidation of organic C to CO₂ (Six et al., 1999). Increases in CO₂ emissions occurred after banding N in all managements (including those without N), so this effect cannot be attributed to the applied N fertilizer. The effect of nitrogen fertilizer on CO₂ emissions is still inconclusive (Iqbal et al., 2009).

The higher NH₃ fluxes observed after nitrogen banding in all treatments indicate that the supply of N via fertilizer is not the only factor responsible for higher fluxes. Grassmann et al (2020) have not observed difference in NH₃ losses with and without N, but found peaks of loss after planting and after side-dressing N to maize. Soil disturbance, even if small, may have been responsible for the higher volatilization at planting, as higher losses also occurred in soybean, where no N was applied.

Positioning the collection chambers on the soil surface soon after maize and soybean planting may also explain the NH₃ volatilization peaks in this period, as NH₃ loss from the soil can also occur (Pan et al., 2016). However, although greater losses occur at different times, these are often negligible when using ammonium sulfate applied to acidic soils. This stable form of N fertilizer creates a less favorable environment for NH₃ volatilization (Dominghetti et al., 2016). Santos et al., (2021), in a field experiment with maize, observed that top dressing 150 kg ha⁻¹ of N as ammonium sulfate resulted in less than 1% NH₃ loss. Ammonia fluxes and loss using ammonium sulfate similar to this study were found by Grassmann et al. (2020).

3.4.2 Cumulative emissions

Emissions of N₂O are increased by N fertilization (Grassmann et al., 2020). This occurs because the use of nitrogen fertilizers increases the availability of NH₄⁺ and NO₃⁻, which are the substrates used in the production of N₂O (Butterbach-Bahl et al., 2013). A higher accumulated N₂O emission was observed from a maize-soybean rotation than from soybean monoculture, possibly due to N fertilization in maize, despite the similar soil NH₄⁺ and NO₃⁻ contents (Alvarez et al., 2012). However, in the present experiment, the increase in mineral N levels throughout the experiment is most likely due to soybean cultivation, which brings considerable amounts of atmospheric N₂ into the system, eventually increasing soil mineral N,

even if momentarily (Giller, 2001). The use of legumes as a source of N results in yield gains over time (Mutsamba et al., 2020), but legumes, despite not receiving exogenous N, are considered N₂O emitters due to the decomposition of their residues (Rigon et al., 2021). The addition of N in the cropping system through FBN and the subsequent decomposition of soybean residues can explain the emission of N₂O in the treatments without N.

Inhibition of nitrification was expected to decrease N₂O emission in treatments where maize was intercropped with forage grasses. However, this was not observed in this experiment. There are reports that BIN would not occur, or would be very low in environments rich in N and low soil acidity (Castoldi et al., 2013), which could explain our results. Furthermore, it has been reported that the exudation of isoflavones such as genistein and daidzein by soybean roots are capable of stimulating bacteria of the genus *Nitrosomonas*, thus nullifying a possible effect of BIN by forages (Subbarao et al., 2012; Subbarao et al., 2015).

The higher flow of N₂O at the beginning of the 2019 maize crop is suggested as responsible for increasing the accumulated emission. This high accumulated emission is a reflection of the higher soil moisture, indication that there may have been loss by denitrification, as previously discussed. Despite the high figures observed for maize and the following soybean, the accumulated emission was in the same range as reported in previous studies that evaluated the rotation of legumes and grasses (Jantalia et al., 2008), but still higher to what was found in rotation and/or intercropping of forages with maize (Grassmann et al., 2020). Therefore, it seems that the introduction of a legume is an important source of N₂O emissions as a consequence of soil enrichment in NO₃⁻ (Rigon et al. 2021).

Despite similar CO₂ fluxes in the first year, the higher accumulated CO₂ emission throughout the experiment with the introduction of the intercropped forages resulted in a high production of plant residues in these treatments, what can be an important source of CO₂ during mineralization and increase emission. However, the CO₂ emission in treatments without forages in 2019 seems to be due to soybean, considered to have a low C/N ratio (18/1) and fast mineralization. Thus, the introduction of forage species fostered a stimulus in the residue mineralization by enhancing microbial activity in response to the amount of C and N offered. The emission of CO₂ is largely a biological process and the large supply of organic C in a short period reflects in increases in CO₂ emission through the decomposition of readily labile residues (Gunina and Kuzyakov, 2015).

As previously reported, NH₃ emission peaks coincided with events where there was soil movement. Peaks of NH₃ losses observed in June and July are possibly linked to maize plant senescence and loss through the leaves (Vallis and Keating, 1994). The concentration of NH₃

in leaves increases due to the degradation of proteins and later the formation of NH_4^+ which is the main source for NH_3 (Schjoerring et al., 1998). The volatilized NH_3 can be transformed in the atmosphere into NH_4^+ , or react with S oxides to form ammonium sulfate. There is not a direct effect of NH_3 on global warming (Goo and Beatty, 2011) it can be oxidized to N_2O in the atmosphere (Liu et al., 2020). However, its residence in the atmosphere is very short, ranging from 7 to 15 days (Freedman, 1995).

The N availability (fertilizers and FBN), plus the forage introduction have decreased CH_4 absorption into the soil. Previous research showed that N could affect CH_4 absorption (Yao et al., 2012) and systems with forages are considered as CH_4 sink (Verchot et al., 2000). However, other factors, such as soil temperature and moisture have a direct influence on CH_4 absorption and emission (Mueller et al., 2016). Nonetheless, in this experiment temperature and humidity (WFPS) were similar between treatments, so these abiotic factors did not affect the production and oxidation of CH_4 . Typically, agricultural soils are considered a low strength sink or source of CH_4 (Bronson and Mosier, 1993) due to methanotrophy, where methanotrophic bacteria use CH_4 as an energy source.

3.4.3 Normalized emissions

The development of sustainable agricultural practices should prioritize increases or maintenance of the crop yield, seek to reduce N_2O and CO_2 emissions and aim to increase the absorption of CH_4 in addition to minimizing the losses of NH_3 . Therefore, expressing these emissions in relation to crop productivity (normalized emission) is more appropriate than reporting just emissions to assess the efficiency of a cropping system in relation to GHG emissions (Van Groenigen et al., 2010).

The lower normalized N_2O emission in the second crop year reflected the lower accumulated N_2O emission combined with lower yield. It has been reported a normalized emission of 1.03 kg Mg^{-1} from rainfed maize (Arango and Rice, 2021), which is higher than that found in this work. This is a very important point regarding the sustainability of agricultural production, since N_2O is considered the gas with the greatest effect on global warming.

The accumulated absorption of CH_4 was not affected by the year factor, but the normalized absorption in the first was lower than in the second crop year. Apparently, the higher grain yield in the first year, resulting from greater precipitation, was the cause of this lower normalized absorption. The higher normalized CO_2 emission in the second crop reflected the lower grain yield due water deficit, specifically in the maize cycle. The higher normalized emission was a result of the effect of precipitation on the yield, since the accumulated CO_2 emitted was lower

only when there was no forage in the system. Grain yield was the main factor related to the normalized emission of CO₂. In systems with higher normalized emission, the CO₂ lost through the respiration of microorganisms decreases the amount of C that is fixed in the soil (Guenet et al., 2021).

The role of the introduction of the forages in the system seeks to build a more efficient sink for C, tending to stabilize soil soil organic C (COS) over time (Stewart et al., 2007). Systems with cover crops, agroforestry and crop rotation are options for increasing COS stocks (Chenu et al., 2019). In view of this, despite the highest normalized emissions observed with maize intercropped with forage grasses, these systems tend to become viable in the long term.

Although the greater cumulative loss of NH₃ in the first year, it is important to highlight that the normalized emission of this gas was lower. This lower normalized NH₃ emission is directly linked to the higher WFPS in the first crop year as there were differences in rainfall during the 2019 and 2020 maize crops, directly influencing grain yield. The high NH₃ volatilization increased the normalized emission in the presence of forages when compared with the normalized emissions without forage. However, the figures for the daily loss did not exceed those reported in other experiments (Grassmann et al., 2020; Santos et al. al., 2021).

3.5 Conclusions

The introduction of ruzigrass and guinea grass intercropped with maize was not effective in decreasing N₂O loss, with no effect on CH₄ uptake by the soil and NH₃ loss. Negative responses for CH₄ uptake by increased N availability were not confirmed. The N₂O emission in where maize is cropped in rotation with soybean is low and is not affected by the introduction of intercropped tropical grass forages. The main route of gaseous N loss from the system is NH₃ volatilization.

Acknowledgments

This work was undertaken as part of NUCLEUS, a virtual joint centre to deliver enhanced N-use efficiency via an integrated soil-plant systems approach for the United Kingdom and Brazil. Funded in Brazil by FAPESP-São Paulo Research Foundation (grant number 2015/50305-8). BG supported by scholarship from the FAPESP (grant number 2018/15867-3). BG was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-Brazil (CAPES).

References

- Alves, B. J., Smith, K. A., Flores, R. A., Cardoso, A. S., Oliveira, W. R., Jantalia, C. P., ... & Boddey, R. M. (2012). Selection of the most suitable sampling time for static chambers for the estimation of daily mean N₂O flux from soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.022>.
- Arango, M. A., & Rice, C. W. (2021). Impact of nitrogen management and tillage practices on nitrous oxide emissions from rainfed maize. *Soil Science Society of America Journal*, 85(5), 1425-1436. <https://doi.org/10.1002/saj2.20285>.
- Barcelos, J.P.Q., Mariano, E. Jones, D.L., Rosolem, C.A. Topsoil and subsoil C and N turnover are affected by superficial lime and gypsum application in the short term. *Soil Biology and Biochemistry* 163 (2021) 108456. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2021.108456>
- Barcelos, J.P.Q., Souza, M., Nascimento, C.A.C., Rosolem, C.A. Soil acidity amelioration improves N and C cycles in the short term in a system with soybean followed by maize-Guinea grass intercropping. *Geoderma*, 421 (2022) 115909. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115909>
- Blake, G. R., & Hartge, K. H. (1986). Bulk density. *Methods of soil analysis: Part 1 Physical and mineralogical methods*, 5, 363-375. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c13>.
- Bronson, K. F., & Mosier, A. R. (1993). Nitrous oxide emissions and methane consumption in wheat and maize-cropped systems in northeastern Colorado. *Agricultural ecosystem effects on trace gases and global climate change*, 55, 133-144. <https://doi.org/10.2134/asaspecpub55.c9>.
- Butterbach-Bahl, K., Baggs, E. M., Dannenmann, M., Kiese, R., & Zechmeister-Boltenstern, S. (2013). Nitrous oxide emissions from soils: how well do we understand the processes and their controls?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621), 20130122. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0122>.
- Canisares, L. P., Rosolem, C. A., Momesso, L., Crusciol, C. A. C., Villegas, D. M., Arango, J., ... & Cantarella, H. (2021). Maize-Brachiaria intercropping: A strategy to supply recycled N to maize and reduce soil N₂O emissions?. *Agriculture, ecosystems & environment*, 319, 107491. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107491>.
- Cardoso, A. D. S., Quintana, B. G., Januskiewicz, E. R., de Figueiredo Brito, L., da Silva Morgado, E., Reis, R. A., & Ruggieri, A. C. (2019). How do methane rates vary with soil moisture and compaction, N compound and rate, and dung addition in a tropical soil?. *International journal of biometeorology*, 63(11), 1533-1540. <https://doi.org/10.1007/s00484-018-1641-0>.
- Castoldi, G.; Reis, J.G.; Pivetta, L.A.; Rosolem, C.A. Soil nitrogen dynamics after brachiaria desiccation. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 37:1620-1627, 2013.
- Chenu, C., Angers, D. A., Barré, P., Derrien, D., Arrouays, D., & Balesdent, J. (2019). Increasing organic stocks in agricultural soils: Knowledge gaps and potential innovations. *Soil and Tillage Research*, 188, 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.04.011>.
- Contini, E., Mota, M. M., Marra, R., Borghi, E., MIRANDA, R. D., SILVA, A. D., ... & Mendes, S. M. (2019). Milho: caracterização e desafios tecnológicos. *Brasília: Embrapa.(Desafios do Agronegócio Brasileiro, 2)*.
- Cyle, K. T., Hill, N., Young, K., Jenkins, T., Hancock, D., Schroeder, P. A., & Thompson, A. (2016). Substrate quality influences organic matter accumulation in the soil silt and clay fraction. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.014>.
- Dominghetti, A. W., Guelfi, D. R., Guimarães, R. J., Caputo, A. L. C., Spehar, C. R., & Faquin, V. (2016). Perdas de nitrogênio por volatilização de fertilizantes nitrogenados em cultivo

- de café. *Ciência e Agrotecnologia*, 40(2), 173-183. <https://doi.org/10.1590/1413-70542016402029615>.
- Faostat, F. A. O. (2019). Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistic Division. <https://www.fao.org/faostat/en/#data>.
- Fehr, W. R., Caviness, C. E., & Vorst, J. J. (1977). Response of Indeterminate and Determinate Soybean Cultivars to Defoliation and Half-plant Cut-off 1. *Crop Science*, 17(6), 913-917. <https://doi.org/10.2135/cropsci1977.0011183X001700060024x>.
- Freedman, B. (1995). *Environmental ecology: the ecological effects of pollution, disturbance, and other stresses*. Elsevier.
- Giller, K. E. (2001). *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. Cabi.
- Grassmann, C. S., Mariano, E., Rocha, K. F., Gilli, B. R., & Rosolem, C. A. (2020). Effect of tropical grass and nitrogen fertilization on nitrous oxide, methane, and ammonia emissions of maize-based rotation systems. *Atmospheric Environment*, 234, 117571. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2020.117571>.
- Guenet, B., Gabrielle, B., Chenu, C., Arrouays, D., Balesdent, J., Bernoux, M., ... & Zhou, F. (2021). Can N₂O emissions offset the benefits from soil organic carbon storage?. *Global Change Biology*, 27(2), 237-256. <https://doi.org/10.1111/gcb.15342>.
- Gunina, A., & Kuzyakov, Y. (2015). Sugars in soil and sweets for microorganisms: review of origin, content, composition and fate. *Soil Biology and Biochemistry*, 90, 87-100. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.07.021>.
- Iqbal, J., Hu, R., Lin, S., Hatano, R., Feng, M., Lu, L., ... & Du, L. (2009). CO₂ emission in a subtropical red paddy soil (Ultisol) as affected by straw and N-fertilizer applications: A case study in Southern China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 131(3-4), 292-302. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.02.001>.
- Jantalia, C. P., dos Santos, H. P., Urquiaga, S., Boddey, R. M., & Alves, B. J. (2008). Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and tillage systems in the South of Brazil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 82(2), 161-173. <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9178-y>.
- Jantalia, C. P., Resck, D. V., Alves, B. J., Zotarelli, L., Urquiaga, S., & Boddey, R. M. (2007). Tillage effect on C stocks of a clayey Oxisol under a soybean-based crop rotation in the Brazilian Cerrado region. *Soil and Tillage Research*, 95(1-2), 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.still.2006.11.005>.
- Kreye, C., Dittert, K., Zheng, X., Zhang, X., Lin, S., Tao, H., & Sattelmacher, B. (2007). Fluxes of methane and nitrous oxide in water-saving rice production in north China. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 77(3), 293-304. <https://doi.org/10.1007/s10705-006-9068-0>.
- Liu, L., Zhang, X., Xu, W., Liu, X., Li, Y., Wei, J., ... & Lu, X. (2020). Ammonia volatilization as the major nitrogen loss pathway in dryland agro-ecosystems. *Environmental Pollution*, 265, 114862. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114862>.
- Mariano, E., Trivelin, P. C. O., Vieira, M. X., Leite, J. M., Otto, R., & Franco, H. C. J. (2012). Ammonia losses estimated by an open collector from urea applied to sugarcane straw. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36(2), 411-419. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000200010>.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*, 5(1), 62-71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>.
- Mosier, A., Wassmann, R., Verchot, L., King, J., & Palm, C. (2004). Methane and nitrogen oxide fluxes in tropical agricultural soils: sources, sinks and mechanisms. *Environment, Development and Sustainability*, 6(1), 11-49. <https://doi.org/10.1023/B:ENVI.00000003627.43162.ae>.

- Mueller, P., Hager, R. N., Meschter, J. E., Mozdzer, T. J., Langley, J. A., Jensen, K., & Megonigal, J. P. (2016). Complex invader-ecosystem interactions and seasonality mediate the impact of non-native *Phragmites* on CH₄ emissions. *Biological Invasions*, 18(9), 2635-2647. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1093-6>.
- Mulvaney, R. L. (1996). Nitrogen—inorganic forms. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical methods*, 5, 1123-1184. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c38>.
- Mutsamba, E. F., Nyagumbo, I., & Mupangwa, W. (2020). Forage and maize yields in mixed crop-livestock farming systems: Enhancing forage and maize yields in mixed crop-livestock systems under conservation agriculture in sub-humid Zimbabwe. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 92, 100317. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2019.100317>.
- Pacheco, L. C. P. S., Damin, V., Pelosi, A. P., Ferreira, K. R. S., & Trivelin, P. C. O. (2017). Herbicides increase emission of ammonia by pearl millet and congo grass. *Agronomy Journal*, 109(4), 1232-1239. <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2134/agronj2016.04.0242#>.
- Pan, B., Lam, S. K., Mosier, A., Luo, Y., & Chen, D. (2016). Ammonia volatilization from synthetic fertilizers and its mitigation strategies: a global synthesis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 232, 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.019>.
- Pavelka, M., Acosta, M., Kiese, R., Altimir, N., Brümmer, C., Crill, P., Darenova, E., Fuß, R., Gielen, B., Graf, A., Klemetsson, L., Lohila, A., Longdoz, B., Lindroth, A., Nilsson, M., Jiménez, S.M., Merbold, L., Montagnani, L., Peichl, M., Pihlatie, M., Pumpanen, J., Ortiz, P.S., Silvennoinen, H., Skiba, U., Vestin, P., Weslien, P., Janous, D., Kutsch, W., 2018. Standardisation of chamber technique for CO₂, N₂O and CH₄ fluxes measurements from terrestrial ecosystems. *Int. Agrophysics* 32, 569-587. <https://doi.org/10.1515/intag><https://doi.org/10.1515/intag-2017-0045>2017-0045.
- Raij B. van, J.C. de Andrade, H. Cantarella, J.A. Quaggio. Análise química para avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas (2001), p. 285
- Raposo, E., Brito, L. F., Januszkiewicz, E. R., Oliveira, L. F., Versuti, J., Assumpção, F. M., ... & Ruggieri, A. C. (2020). Greenhouse gases emissions from tropical grasslands affected by nitrogen fertilizer management. *Agronomy Journal*, 112(6), 4666-4680. <https://doi.org/10.1002/agj2.20385>.
- Rigon, J.P.G., Calonego, J.C., Pivetta, L.A., Castoldi, G. Raphael, J.P.A., Rosolem, C.A. Using cover crops to offset greenhouse gas emissions from a tropical soil under no-till. *Experimental Agriculture*, 57:217-231 (2021), 1-15. <https://doi.org/10.1017/S0014479721000156>.
- Rocha, K. F., Mariano, E., Grassmann, C. S., Trivelin, P. C., & Rosolem, C. A. (2019). Fate of 15N fertilizer applied to maize in rotation with tropical forage grasses. *Field Crops Research*, 238, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.04.018>.
- Rosolem, C. A., Li, Y., & Garcia, R. A. (2016). Soil carbon as affected by cover crops under no-till under tropical climate. *Soil Use and Management*, 32(4), 495-503. <https://doi.org/10.1111/sum.12309>.
- Rutkowska, B., Szulc, W., Sosulski, T., Skowrońska, M., & Szczepaniak, J. (2018). Impact of reduced tillage on CO₂ emission from soil under maize cultivation. *Soil and Tillage Research*, 180, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.02.012>.
- Salton, J. C., Mercante, F. M., Tomazi, M., Zanatta, J. A., Concenço, G., Silva, W. M., & Retore, M. (2014). Integrated crop-livestock system in tropical Brazil: Toward a sustainable production system. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 190, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.09.023>.

- Santos, C. F., do Carmo Pinto, S. I., Guelfi, D., Rosa, S. D., da Fonseca, A. B., Fernandes, T. J., ... & e Silva, K. P. (2021). Maize Cropping System And Nitrogen Fertilizers Technologies Affect Ammonia Volatilization In Brazilian Tropical Soils. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1051385/v1>.
- Schjoerring, J. K., Husted, S., & Mattsson, M. (1998). Physiological parameters controlling plant-atmosphere ammonia exchange. *Atmospheric Environment*, 32(3), 491-498.
- Schlesinger, W. H. (Ed.). (2005). *Biogeochemistry* (Vol. 8). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(97\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(97)00006-X).
- Siqueira Neto, M., Piccolo, M. D. C., Costa Junior, C., Cerri, C. C., & Bernoux, M. (2011). Greenhouse gas emission caused by different land-uses in Brazilian Savannah. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35, 63-76. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832011000100006>.
- Six, J., Elliott, E. T., & Paustian, K. (1999). Aggregate and soil organic matter dynamics under conventional and no-tillage systems. *Soil Science Society of America Journal*, 63(5), 1350-1358. <https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6351350x>.
- Snyder, C. S., Bruulsema, T. W., Jensen, T. L., & Fixen, P. E. (2009). Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 133(3-4), 247-266. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.04.021>.
- Soil Survey Staff (2014). Keys to soil taxonomy. *United States Department of Agriculture: Washington, DC, USA*.
- Sousa, T. R. D., Ramos, M. L. G., Figueiredo, C. C. D., & Carvalho, A. M. D. (2021). N₂O emissions from soils under different uses in the Brazilian Cerrado-A review. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 45. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210093>.
- Stewart, C. E., Paustian, K., Conant, R. T., Plante, A. F., & Six, J. (2007). Soil carbon saturation: concept, evidence and evaluation. *Biogeochemistry*, 86(1), 19-31. <https://doi.org/10.1007/s10533-007-9140-0>.
- Subbarao, G. V., Sahrawat, K. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Kishii, M., Rao, I. M., ... & Lata, J. C. (2012). Biological nitrification inhibition—a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. *Advances in agronomy*, 114, 249-302. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394275-3.00001-8>.
- Subbarao, G. V., Yoshihashi, T., Worthington, M., Nakahara, K., Ando, Y., Sahrawat, K. L., ... & Braun, H. J. (2015). Suppression of soil nitrification by plants. *Plant Science*, 233, 155-164. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.01.012>.
- Thorup-Kristensen, K., Dresbøll, D. B., & Kristensen, H. L. (2012). Crop yield, root growth, and nutrient dynamics in a conventional and three organic cropping systems with different levels of external inputs and N re-cycling through fertility building crops. *European Journal of Agronomy*, 37(1), 66-82. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2011.11.004>.
- Thorup-Kristensen, K., Magid, J., & Jensen, LS (2003). Culturas de captura e adubos verdes como ferramentas biológicas no manejo de nitrogênio em zonas temperadas. *Avanços em agronomia*, 227-302. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)79005-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)79005-6).
- Vallis, I., & Keating, B. A. (1997). Uptake and loss of fertilizer and soil nitrogen in sugarcane crops. In *Proc. Aust. Soc. Sugar Cane Tech.*
- Van Groenigen, J. W., Velthof, G. L., Oenema, O., Van Groenigen, K. J., & Van Kessel, C. (2010). Towards an agronomic assessment of N₂O emissions: a case study for arable crops. *European journal of soil science*, 61(6), 903-913. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2009.01217.x>.
- Verchot, L. V., Davidson, E. A., Cattânio, J. H., & Ackerman, I. L. (2000). Land-use change and biogeochemical controls of methane fluxes in soils of eastern Amazonia. *Ecosystems*, 3(1), 41-56. <https://doi.org/10.1007/s100210000009>.

- Yao, Z., Zheng, X., Dong, H., Wang, R., Mei, B., & Zhu, J. (2012). A 3-year record of N₂O and CH₄ emissions from a sandy loam paddy during rice seasons as affected by different nitrogen application rates. *Agriculture, ecosystems & environment*, 152, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2012.02.004>.
- Yan, D., Wang, Q., Mao, L., Ma, T., Li, Y., Ouyang, C., ... & Cao, A. (2015). Interaction between nitrification, denitrification and nitrous oxide production in fumigated soils. *Atmospheric environment*, 103, 82-86. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.09.079>.

Table 1. Selected soil chemical characteristics to the depth of 80 cm.

Characteristic	Unit	Soil Layer (cm)				
		0-10	10-20	20-40	40-60	60-80
pH _{CaCl2}		4.7	4.6	4.7	4.9	5.0
SOM	g dm ⁻³	21	14	11	10	8
P _{resina}	mg dm ⁻³	7	10	6	3	3
H+Al ⁺³		48	48	45	39	37
K ⁺		3	2	1	1	1
Ca ⁺²	mmol _c	22	20	17	19	17
Mg ⁺²	dm ⁻³	15	14	10	9	9
CEC		88	84	73	68	64
BS	%	40	36	28	29	27
N-NH ₄ ⁺	mg kg ⁻¹	10.1	8.5	9.1	8.0	7.8
N-NO ₃ ⁻		4.1	3.2	3.4	2.3	1.6
N Total		1.6	1.4	1.2	1	0.9
C Total	g kg ⁻¹	21	18	15	12	12

SOM: Soil Organic Matter; CEC: Cation Exchange Capacity; BS: Base saturation

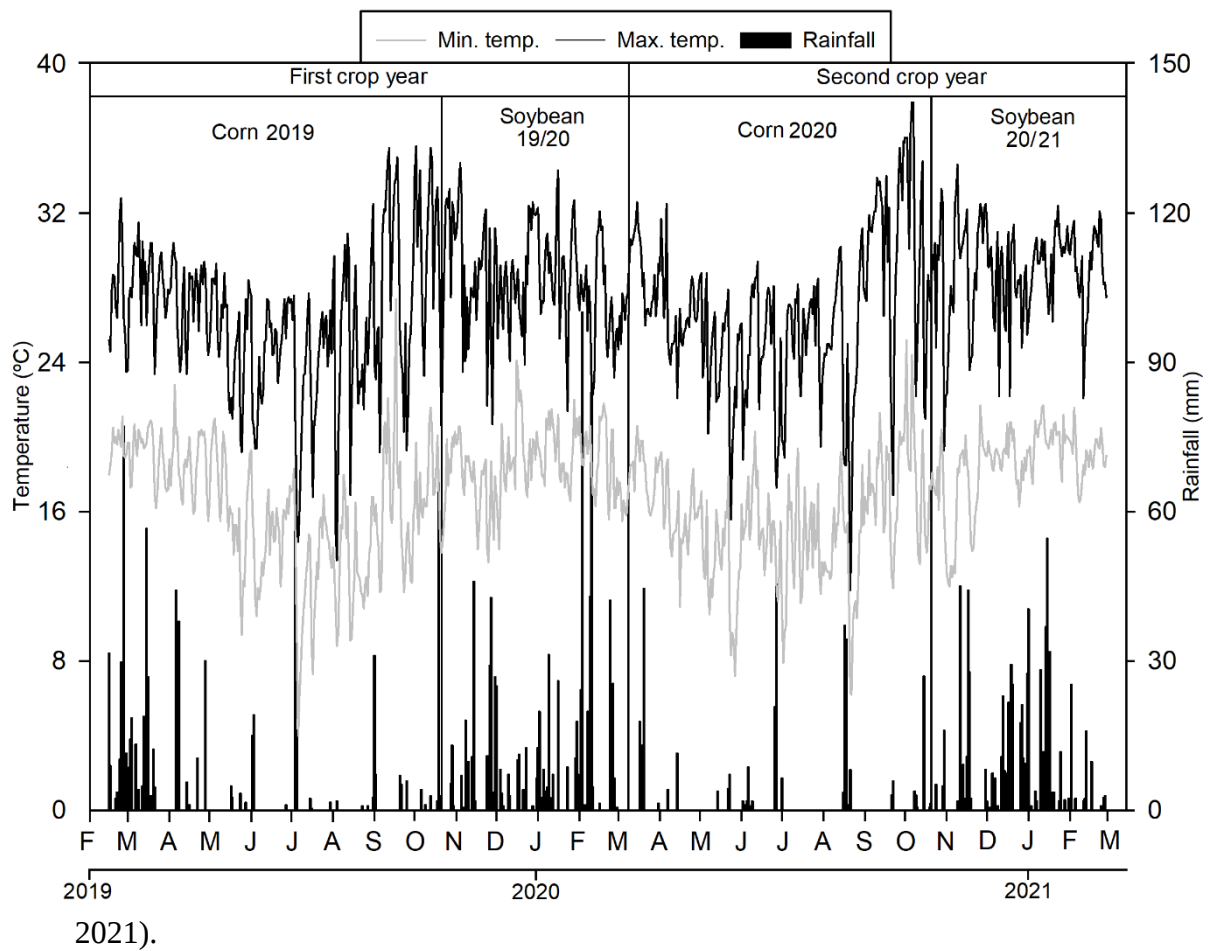
Figure 1 Air temperature and rainfall during the experiment (February 2019 – February

Figure 2. Seasonal variation of water-filled pore space, and soil temperature at 5.5 cm, as affected by forage species and N fertilization. Symbols show the means and bars show the standard error ($n = 4$).

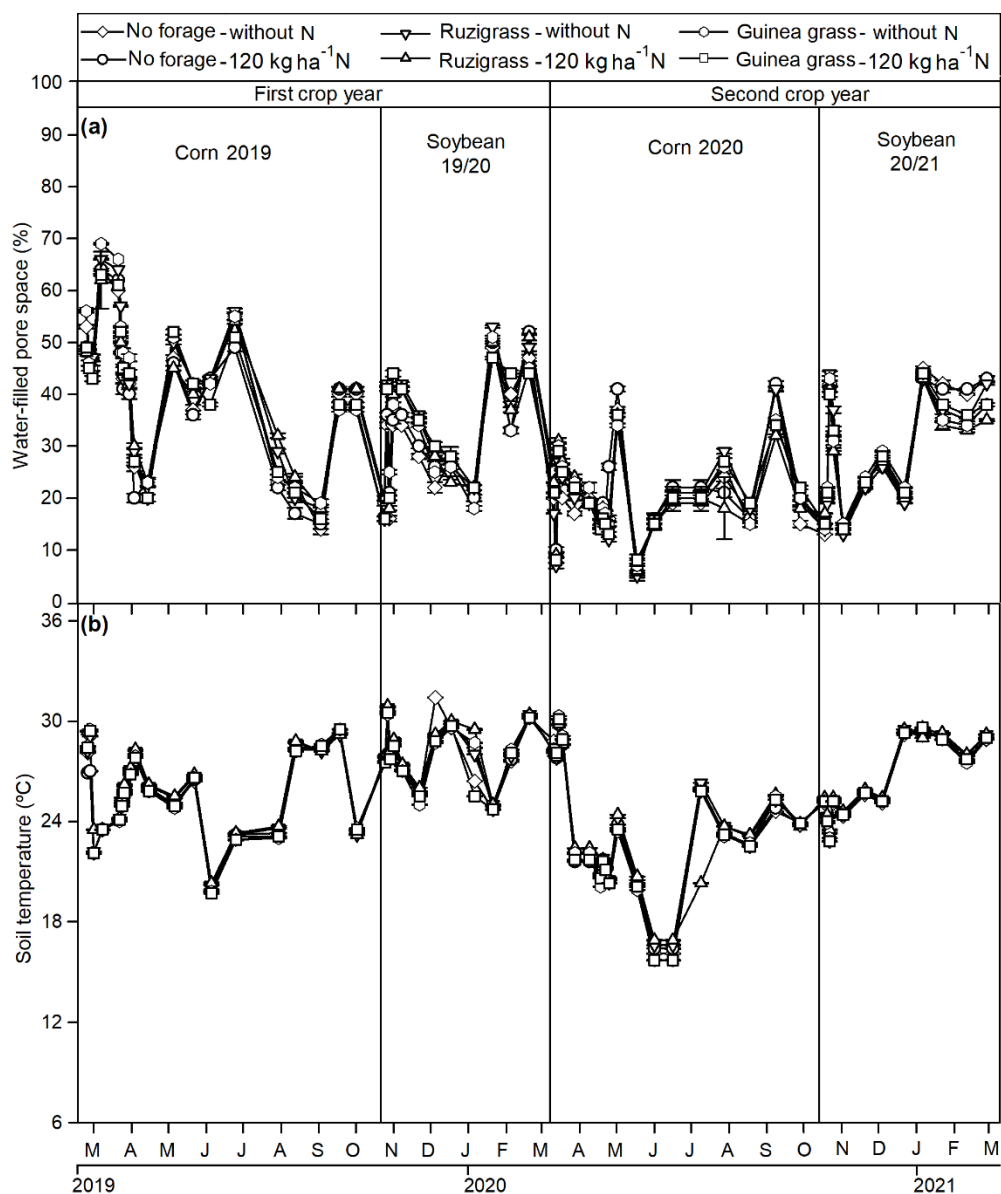


Figure 3. Seasonal variation of the N-N₂O (a), C-CH₄ (b), C-CO₂ (c), and NH₃ (d) fluxes as affected by forage grasses and N fertilization. Symbols show the means and bars show the standard error (*n* = 4).

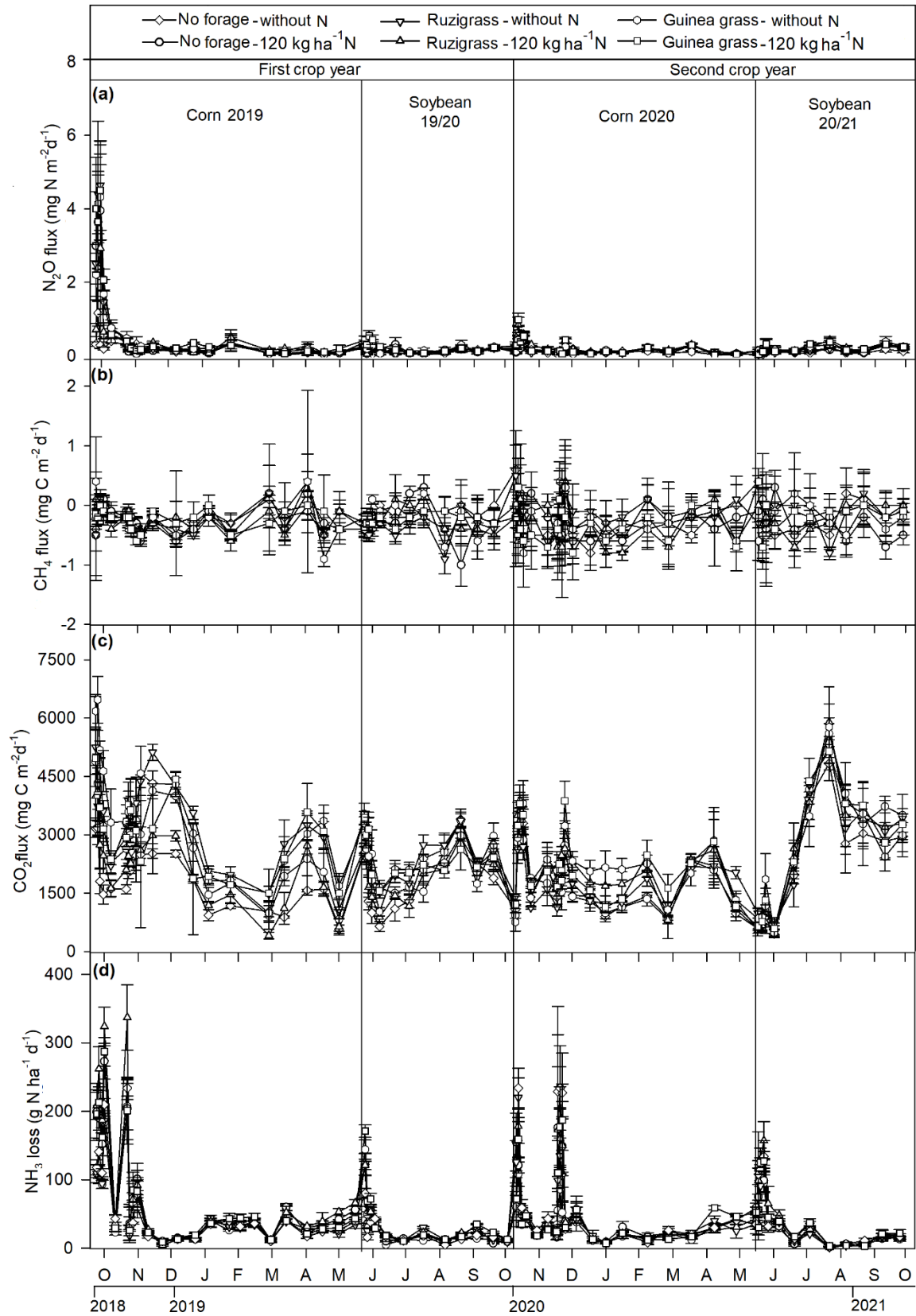


Figure 4. Accumulated emissions of N-N₂O as affected by N fertilization (a), the interaction of the systems with the year (b); accumulated emission of C-CO₂ (c) and NH₃ emission (d) as affected by the interaction of the systems with the year. The symbols show the means and vertical bars show the 95 % confidence interval. Different letters show significant differences (P<0.05). NF – no forage, Ruzi – ruzigrass, Gg – Guinea grass.

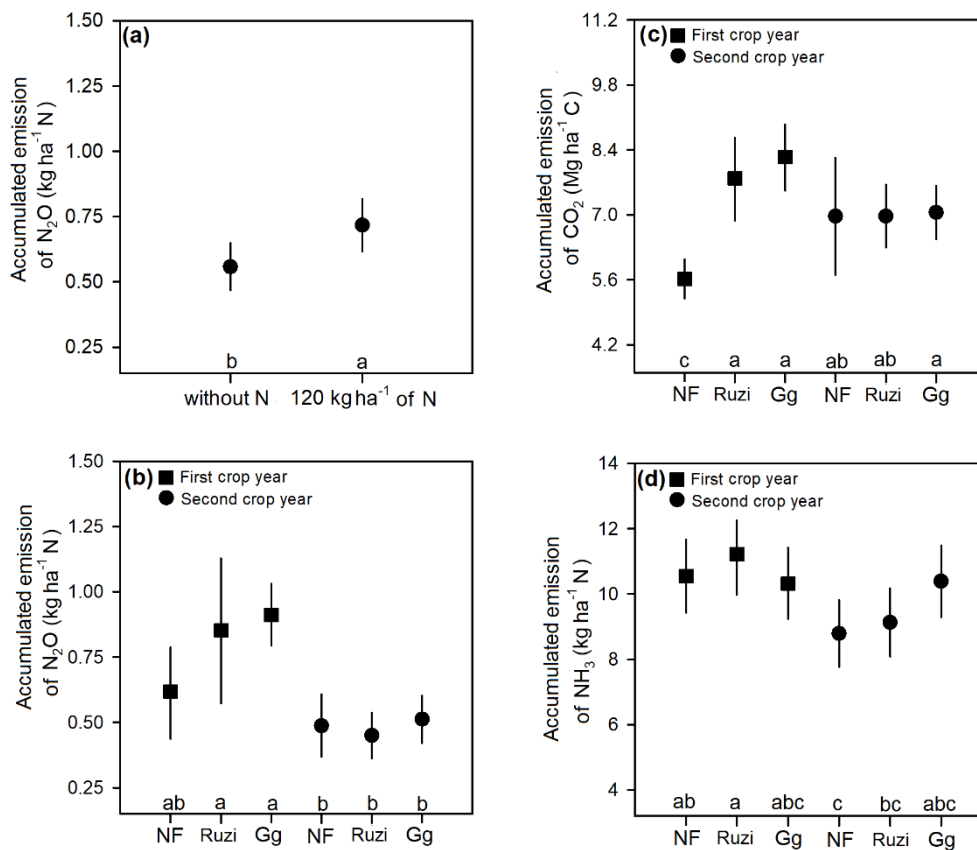


Figure 5. Grain yields (maize + soybean) in the first (a) and second (b) years for the interaction of system x N fertilization x year; Dry matter as affected by the interaction of the systems with N fertilization (c), by the interaction of systems with years (d) and interaction of the N fertilization with years (e). The symbols show the means and vertical bars show the 95 % confidence interval. Different letters show significant differences ($P < 0.05$). NF – no forage, Ruzi – ruzigrass, Gg – Guinea grass

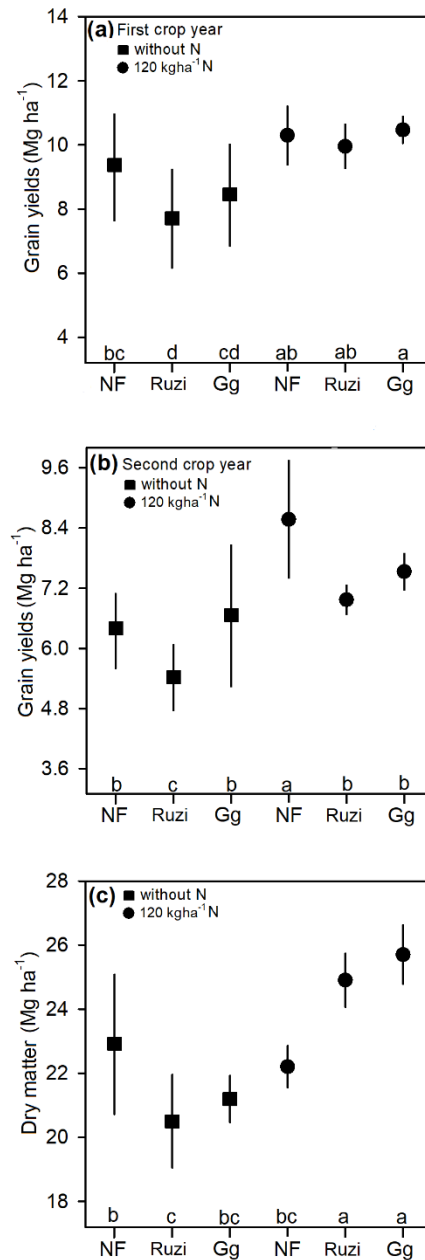


Figure 6. Normalized emissions of N-N₂O (a), C-CH₄ (b) and C-C₂O (c) as affected by years; normalized emission of C-C₂O as affected by N fertilization (d) and by the system (e); normalized emission of NH₃ (f) as affected by the interaction of the system with the year. The symbols show the means and vertical bars show the 95 % confidence interval. Different letters show significant differences (P<0.05). NF – no forage, Ruzi – ruzigrass, Gg – Guinea grass.

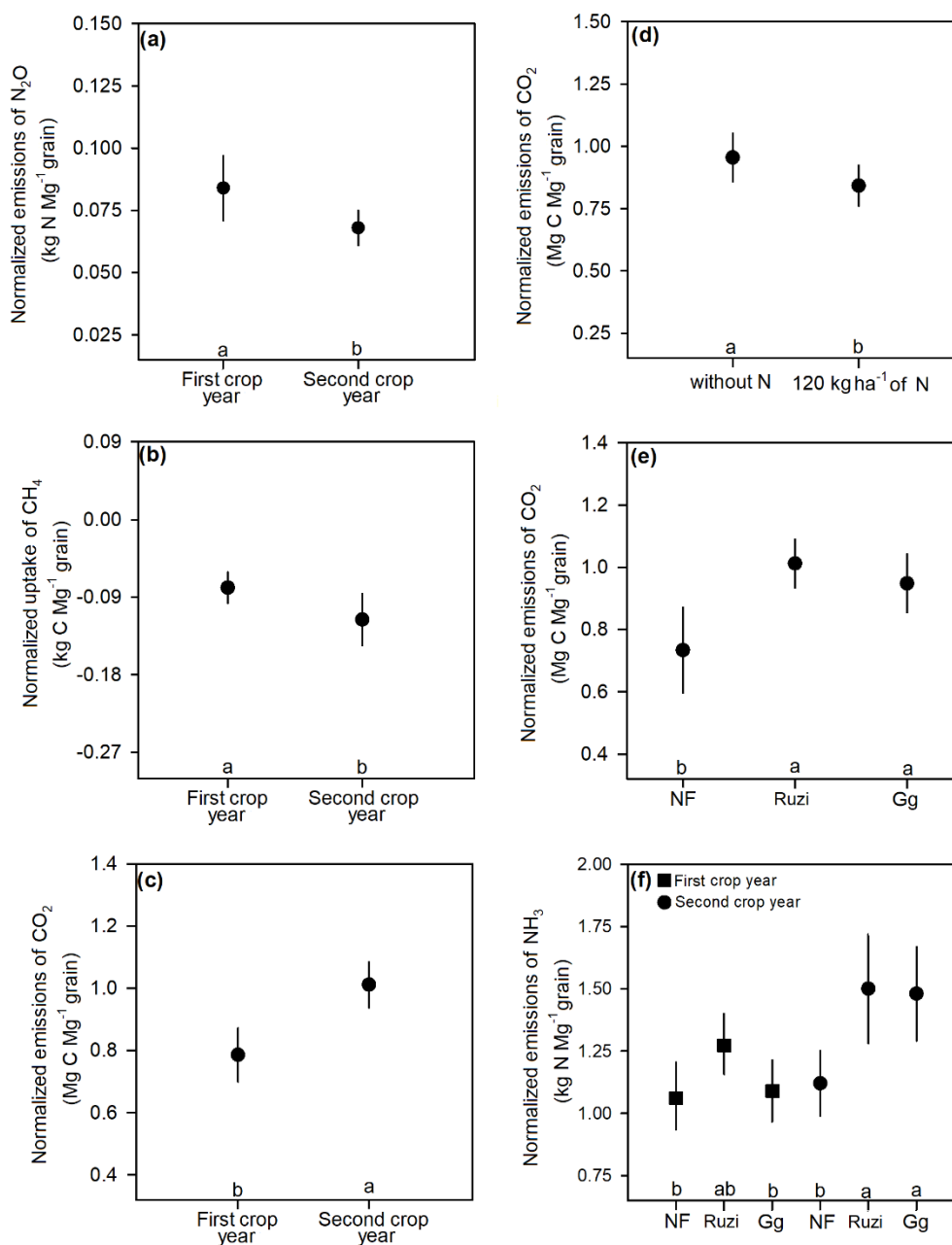
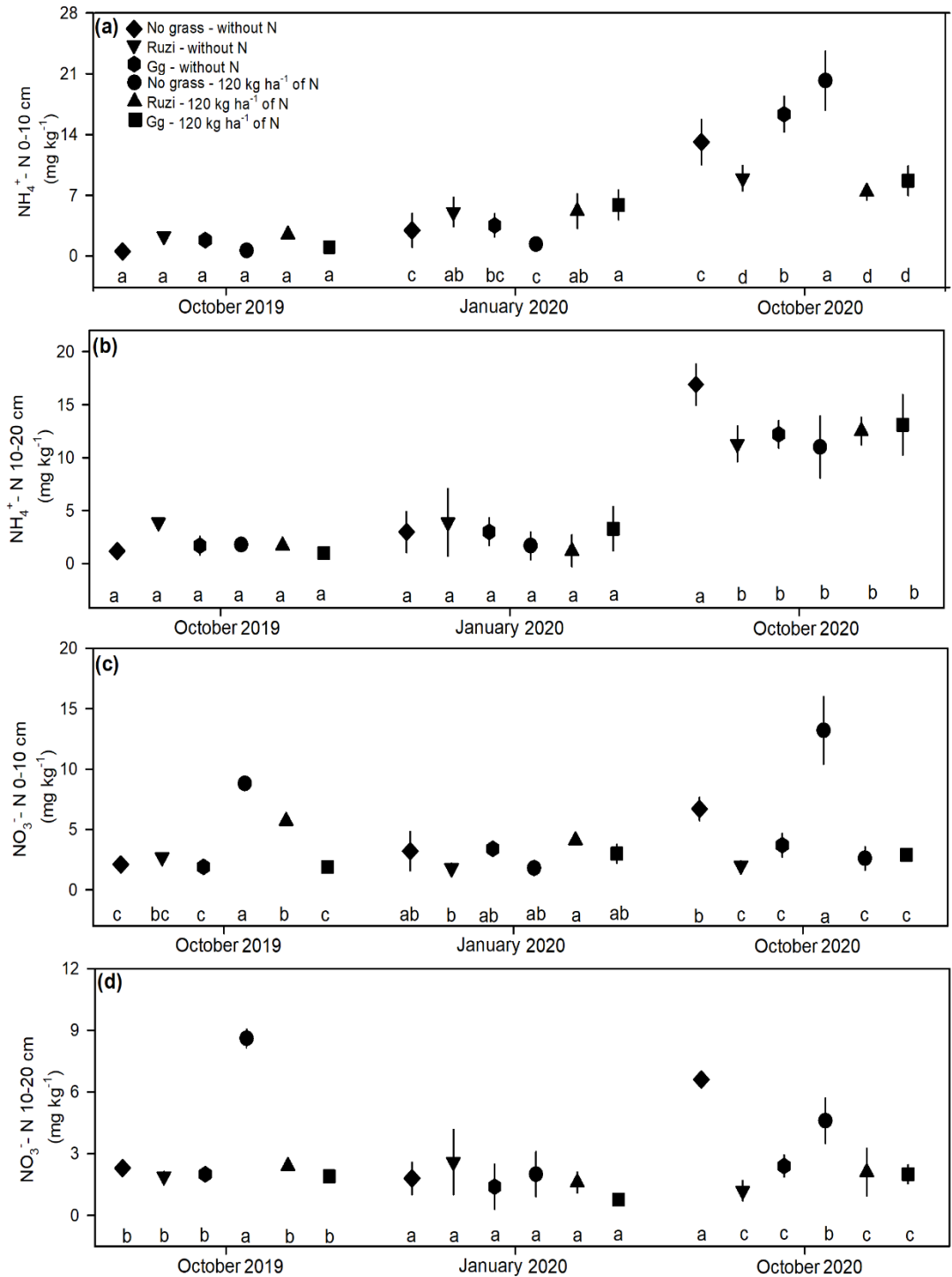


Figure 7. Soil contents of NH_4^+ (a/b) and NO_3^- (c/d) at depths of 0-10 and 10-20 cm as affected by the sampling time. The symbols show the means and vertical bars show the 95 % confidence interval. Different letters show significant differences ($P<0.05$). NF – no forage, Ruzi – ruzigrass, Gg – Guinea grass



Supplementary material

Table S1 Accumulated emissions of N-N₂O, C-CO₂ and NH₃ volatilization for each system with and without N application.

with and without N application:					
Systems	N rate	First crop year		Second crop year	
		Maize 2019	Soybean	Maize 2020	Soybean
Accumulated emission of N-N ₂ O (kg ha ⁻¹)					
No forage	without N	0.37	0.10	0.24	0.12
Ruzigrass		0.57	0.18	0.29	0.17
Guinea grass		0.73	0.14	0.23	0.19
No forage	120 kg ha ⁻¹ of N	0.64	0.12	0.35	0.24
Ruzigrass		0.76	0.18	0.27	0.20
Guinea grass		0.76	0.18	0.31	0.27
Accumulated emission of C-CO ₂ (Mg ha ⁻¹)					
No forage	without N	3.4	2.1	2.9	3.7
Ruzigrass		5.1	2.2	2.9	3.6
Guinea grass		6.3	2.5	3.0	3.7
No forage	120 kg ha ⁻¹ of N	3.9	1.9	3.7	3.7
Ruzigrass		6.1	2.2	3.9	3.6
Guinea grass		5.4	2.2	3.7	3.7
Accumulated N-NH ₃ volatilization (kg ha ⁻¹)					
No forage	without N	7.8	2.0	5.9	2.2
Ruzigrass		7.4	2.6	6.5	2.3
Guinea grass		7.2	2.0	7.7	2.9
No forage	120 kg ha ⁻¹ of N	9.0	2.4	7.4	2.1
Ruzigrass		10.0	2.5	6.4	2.9
Guinea grass		8.6	2.9	7.4	2.8

Table S2. Yields grain and biomass dry matter (DM) for each species with and without N application.

System	N rate	Maize grain 2019	DM maize 2019	DM forage 2019	Soybean grain 19/20	DM soybean 19/20
No forage	without N	5.6	11.3	0.0	3.8	13.8
Ruzigrass		4.0	8.5	2.1	3.6	9.8
Guinea grass		4.8	9.0	1.6	3.6	10.4
No forage	120 kg ha ⁻¹ of N	6.0	11.6	0.0	4.2	11.3
Ruzigrass		5.7	11.8	3.5	4.1	9.6
Guinea grass		5.9	11.4	2.8	4.9	10.7
		Maize grain 2020	DM maize 2020	DM forage 2020	Soybean grain 20/21	DM soybean 20/21
No forage	without N	2.0	8.4	0.0	4.3	11.8
Ruzigrass		2.0	7.9	1.7	3.5	10.5
Guinea grass		2.7	9.1	1.3	4.1	11.0
No forage	120 kg ha ⁻¹ of N	3.8	10.3	0.0	4.8	11.9
Ruzigrass		3.4	10.8	2.3	3.7	11.7
Guinea grass		3.1	12.0	2.1	4.5	12.7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de forrageira consorciada com culturas graníferas em rotação com leguminosa possibilita maior tempo de uso da terra. Saber qual dose adequada de N e a espécie de manejo a se utilizar em consórcio com o milho é de grande importância para se obter sucesso no rendimento de grãos em ambas safras. Esses sistemas se mostram sustentáveis, pois a forrageira apresenta alta aptidão para absorção de N, além da capacidade de explorar camadas profundas do solo, e as leguminosas desempenham papel no fornecimento de N, elevando o teor de N mineral do solo. Outro ponto de grande relevância pelas forrageiras é a possibilidade de imobilizar este nutriente na parte aérea, podendo este ser liberado gradualmente durante a próxima safra. Por essas características esse sistema de manejo é classificado como de grande importância mundial, pois busca a redução sustentável da fome. Com isso se torna essencial estudar sistemas eficazes na produção de alimentos, buscando elevar a eficiência de uso deste nutriente e reduzir perdas, visto que o N é o nutriente mais importe para ambas culturas.

Mesmo quando cultivadas por um período de sete meses as forrageiras não diminuíram a emissão de N_2O na safra seguinte, no entanto, menor taxa de nitrificação, mesmo com aumento na abundância de genes AOB. Quando cultivada em consórcio com milho segunda safra também não foi observado diminuição nas perdas de N_2O , no entanto, as emissões de N_2O nesse sistema de manejo utilizado em clima tropical apresentam baixa taxa de perdas, enquanto a principal via de perdas de N foi através da volatilização de NH_3 . Afirmamos também que o manejo de soja em sucessão ao milho fertilizado com N não diminuiu a absorção de CH_4 pelo sistema. O ^{15}N apresenta o solo como principal destino, no entanto, sistemas de manejo com forrageiras diminuem o N presente no solo na safra de milho, mas essa não possibilita reduzir possíveis perdas em relação a um manejo sem forrageira. A quantidade de ^{15}N absorvido pela soja é baixa, mas ocorre maior aproveitamento do nutriente pela cultura quando semeada sobre a palha das forrageiras em anos de baixas absorções no milho.

REFERÊNCIAS

- AMADO, T. J. C.; SCHLEINDWEIN, J. A.; FIORIN, J. E. Manejo do solo visando à obtenção de elevados rendimentos de soja sob sistema plantio direto. **Soja-Manejo para alta produtividade de grãos. Porto Alegre, UFRGS**, p. 35-97, 2010.
- BALBINO, Luiz Carlos; BARCELLOS, A. de O.; STONE, Luís Fernando. Marco Referencial Integração Lavoura-Pecuária-Floresta/Reference Document for Crop-Livestock-Forestry Integration. **Brasília, DF: Embrapa**, 2011.
- BROCH, Dirceu Luiz; CECCON, Gessi. Produção de milho safrinha com interação lavoura e pecuária. **Embrapa Agropecuária Oeste-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.
- CAIONI, Sheila et al. Efeito residual da adubação nitrogenada e molibídica no milho sobre a soja cultivada em sucessão. **Espacios**, 2017.
- CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações agronômicas**, n. 147, p. 1-9, 2014.
- CAMERON, Keith C.; DI, Hong J.; MOIR, James L. Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. **Annals of applied biology**, v. 162, n. 2, p. 145-173, 2013.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). Fertilidade do solo Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470. Câmara, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações agronômicas**, n. 147, p. 1-9, 2014.
- CECCON, Gessi et al. Legumes and forage species sole or intercropped with corn in soybean-corn succession in midwestern Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p. 204-212, 2013.
- EPSTEIN, Emanuel et al. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 1972.
- FAGERIA, Nand Kumar. **Nitrogen management in crop production**. CRC press, 2014. Fageria, N. K. (2014). *Nitrogen management in crop production*. CRC press.
- FANCELLI, Antônio Luiz; DOURADO NETO, Durval. Produção de milho. 2000.
- HERRIDGE, David F.; PEOPLES, Mark B.; BODDEY, Robert M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and soil**, v. 311, n. 1, p. 1-18, 2008.
- ISHIKAWA, T. et al. Suppression of nitrification and nitrous oxide emission by the tropical grass *Brachiaria humidicola*. In: **Roots: The Dynamic Interface between Plants and the Earth**. Springer, Dordrecht, 2003. p. 413-419.
- KLUTHCOUSKI, J.; AIDAR, H. Implantação, condução e resultados obtidos com o sistema Santa Fé. **Integração lavoura-pecuária. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, p. 407-442, 2003.

KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. Desempenho de culturas anuais sobre palhada de braquiária. **Integração lavoura-pecuária. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão**, p. 499-522, 2003.

MACEDO, Manuel Claudio Motta. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 133-146, 2009.

MORETA, Danilo E. et al. Biological nitrification inhibition (BNI) in Brachiaria pastures: A novel strategy to improve eco-efficiency of crop-livestock systems and to mitigate climate change. 2020.

PERIN, Adriano et al. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2004.

ROCHA, Kassiano F. et al. Fate of 15N fertilizer applied to maize in rotation with tropical forage grasses. **Field Crops Research**, v. 238, p. 35-44, 2019.

ROSOLEM, Ciro A. et al. Nitrate leaching in soybean rotations without nitrogen fertilizer. **Plant and soil**, v. 423, n. 1, p. 27-40, 2018.

ROSOLEM, Ciro A.; PACE, Leandro; CRUSCIOL, Carlos AC. Nitrogen management in maize cover crop rotations. **Plant and Soil**, v. 264, n. 1, p. 261-271, 2004.

ROSOLEM, Ciro Antonio et al. Nitrogen immobilization by congo grass roots impairs cotton initial growth. **Journal of Agricultural Science**, p. 126-136, 2012.

ROSOLEM, Ciro Antonio; FOLONI, José Salvador Simoneti; OLIVEIRA, Rosa Honorato 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.

SILGRAM, Martyn; SHEPHERD, Mark A. The effects of cultivation on soil nitrogen mineralization. **Advances in agronomy**, v. 65, p. 267-311, 1999.

SUBBARAO, G. V. et al. Biological nitrification inhibition—a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. **Advances in agronomy**, v. 114, p. 249-302, 2012.

SUBBARAO, G. V. et al. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 41, p. 17302-17307, 2009.

SUBBARAO, G. V. et al. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems—challenges and opportunities. **Critical reviews in plant sciences**, v. 25, n. 4, p. 303-335, 2006.

SUBBARAO, Guntur V. et al. Potential for biological nitrification inhibition to reduce nitrification and N₂O emissions in pasture crop–livestock systems. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 322-332, 2013.

TRZECIAK, Mário Borges. **Formação de sementes de soja: aspectos físicos, fisiológicos e bioquímicos**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ULEHLOVA, BLANKA; KUNC, FRANTIŠEK; VANCURA, V. Nutrition and energy sources of microbial populations in ecosystems. **Developments in agricultural and managed-forest ecology**, 1988.

UNKOVICH, Murray et al. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), 2008.

VITTI, Godofredo Cesar; HEIRINCHS, Reges. Formas tradicionais e alternativas de obtenção e utilização do nitrogênio e do enxofre: uma visão holística. **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**, 2007.