



**FERTILIDADE DO SOLO APÓS CINCO ANOS DE  
PASTAGEM TEMPORÁRIA E DE MONOCULTURA DE  
MILHO**

**PELTIER ROSSI LINO DE AGUIAR**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE  
BRAGANÇA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGROECOLOGIA

**ORIENTADOR:**

PROFESSOR DOUTOR MANUEL ÂNGELO ROSA RODRIGUES

**CO-ORIENTADORA:**

PROFESSORA DOUTORA MARGARIDA ARROBAS RODRIGUES

**BRAGANÇA**

**2014**

## **Agradecimentos**

Agradeço a DEUS todo-poderoso, pela consciência cósmica a grande inteligência.

Findo este trabalho, não quero deixar de manifestar a minha elevada gratidão ao meu orientador Professor Doutor Manuel Ângelo Rosa Rodrigues, pelo seu profissionalismo e interesse em apoiar o meu trabalho, para além de todo o apoio pessoal ao longo desta caminhada.

À minha co-orientadora, Margarida Maria Pereira Arrobas Rodrigues, responsável pelo Laboratório de Solos da Escola Superior Agrária de Bragança, pela amizade, apoio e dedicação prestada na revisão do trabalho, na organização dos resultados das análises laboratoriais.

As senhoras Rita Diniz e Ana Pinto, técnicas do Laboratório de Análises de Solos e Plantas, da Escola Superior Agrária de Bragança, pela amizade, ajuda e dedicação prestadas na realização das análises laboratoriais.

Aos meus pais que sempre me deram força e coragem e, apoiaram-me no que fosse necessário, aos meus irmãos e parentes que com seus apoios e incentivos ajudaram-me a seguir o caminho inerente à inteligência.

Às bolsistas de investigação Isabel Ferreira e Sara Freitas, pela amizade, ajuda e disponibilidade dispensadas no fornecimento de informações ao longo da realização das análises laboratoriais.

Aos meus colegas de curso Henda Lopes, Paulo Dimande e Ricardo Faria, pela amizade, apoios prestados ao longo dos anos de formação.

Aos professores, amigos e colegas e funcionários desta Instituição, que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento académico. Deixo-vos os meus votos de agradecimentos.

## **Dedicatórias**

*Por esta concretização científica, académica e profissional dedico este feito ao Instituto Superior Politécnico (I.S.P), Kuanza-Sul, (Angola) especialmente à sua Direção, através do seu Diretor Geral Eng.º Manuel Octávio Isaac Spínola, ao Instituto Politécnico de Bragança (I.P.B), (Portugal), na pessoa do seu Presidente, Professor Doutor João Alberto Sobrinho Teixeira e ao Senhor Professor Doutor António Albino Bento, Diretor da Escola Superior Agrária (E.S.A).*

*À toda a minha família pela ternura e apoio que sempre me dedicaram.*

*À ti meu amor.*

## Índice geral

Índice de figuras .....	vi
Índice de quadros .....	vii
Abreviaturas .....	viii
Resumo .....	ix
Abstract .....	x
Introdução .....	1

### Parte I - Revisão Bibliográfica

<b>1- Rotação de culturas</b> .....	2
1.1- Vantagens de rotação de culturas .....	2
1.2- Problemas da monocultura .....	3
1.3- As pastagens temporárias na rotação .....	4
1.4 - As leguminosas na rotação .....	5
<b>2 - Matéria Orgânica</b> .....	7
2.1- Mineralização e imobilização do azoto .....	8
2.2- Humificação .....	10
<b>3 - Avaliação da fertilidade do solo</b> .....	11
3.1- Escolha de um método analítico .....	11
3.2- Avaliação da disponibilidade de azoto no solo .....	12
3.2.1- Métodos biológicos .....	12
3.2.2- Métodos químicos de avaliação da disponibilidade de azoto no solo .....	13
3.2.2.1- Matéria orgânica e carbono orgânico .....	13
3.2.2.2- Determinação do azoto total .....	14
3.2.2.3- Soluções salinas de cloreto de potássio .....	14
3.2.2.4- Métodos que utilizam membranas de troca iônica .....	15
<b>4 - Avaliação do estado nutritivo das plantas</b> .....	16
4.1- Fatores que afetam a composição mineral das plantas .....	16
4.1.1- Estado fenológico das plantas e idade dos tecidos .....	17
4.1.2- Escolha do tecido e sua posição na planta .....	17
4.1.3- Fatores genéticos .....	18
4.2- Indicadores do estado nutritivo .....	19

<b>5 - Interpretação dos resultados</b> .....	20
5.1- Análises de solos.....	20
5.2- Análise de plantas.....	20
Parte II - Trabalho Experimental	
<b>6 - Material e métodos</b> .....	22
6.1- Caracterização climática do local do solo da parcela.....	22
6.2 - Descrição da rotação da parcela e do delineamento experimental.....	23
6.3 - Instalação e condução do ensaio de campo na cultura de milho.....	24
6.4- Ensaio em vasos.....	25
6.5 - Determinações laboratoriais.....	26
6.5.1 - Análises de solos.....	26
6.5.2 - Análise de plantas.....	30
6.6 - Avaliação do teor de clorofila SPAD – 502 .....	30
6.7 - Análise estatística dos resultados .....	31
<b>7- Resultados e discussão</b> .....	32
7.1- Parâmetros químicos nas amostras de solos.....	32
7.2- Carbono orgânico e azoto total.....	35
7.3- Indicadores laboratoriais da disponibilidade de azoto.....	37
7.4- Indicadores biológicos da disponibilidade de azoto .....	38
7.5- Membranas de troca aniônica.....	42
7.6- Indicadores do estado nutritivo da planta de milho.....	43
7.7- Produção da matéria seca e azoto recuperado pela cultura de milho.....	44
7.8- Exportação de outros nutrientes na cultura de milho.....	45
<b>8- Conclusões</b> .....	47
<b>9 - Referências bibliográficas</b> .....	48

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> - Precipitação e temperatura média mensal em Bragança (1971-2000) .....	22
<b>Figura 2</b> - Esquema das duas folhas da rotação cultivadas com milho (M) e pastagem (P) durante cinco anos.....	24

## Índice de quadros

<b>Quadro 1</b> - Algumas características químicas do solo no início do ensaio em amostras provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	33
<b>Quadro 2</b> - Bases de troca, acidez de troca e capacidade de troca catiónica em amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	34
<b>Quadro 3</b> - Micronutrientes em amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	35
<b>Quadro 4</b> - Carbono orgânico determinado pelos métodos Walkley-Black e incineração e azoto total (Kjeldahl) em amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 e 10-20 cm de folhas cultivadas com monocultura de milho e pastagem durante cinco anos.....	36
<b>Quadro 5</b> - Azoto inorgânico libertado por vários métodos químicos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	38
<b>Quadro 6</b> - Produção de matéria seca (PMS), concentração de azoto na planta (CNT) e azoto recuperado na biomassa aérea (N Rec) em nabiça e centeio cultivados em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos (F=Frio; Q=Quente).....	39
<b>Quadro 7</b> - Macronutrientes recuperados na cultura de centeio cultivado em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas	

previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	40
<b>Quadro 8</b> - Micronutrientes recuperados na cultura de centeio cultivado em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	40
<b>Quadro 9</b> - Macronutrientes recuperados na cultura de nabiça cultivada em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	41
<b>Quadro 10</b> - Micronutrientes recuperados na cultura de nabiça cultivada em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.....	41
<b>Quadro 11</b> - Concentração de fosfatos e nitratos nos extratos obtidos com membranas de troca aniônica inseridas em vasos com terras provenientes da profundidade 0-10 cm e 10-20 cm de parcelas cultivadas com pastagem e monocultura de milho durante cinco anos.....	42
<b>Quadro 12</b> - Valores SPAD e concentrações de azoto nas folhas (CNF) em milho cultivado após cinco (2012) e seis (2013) anos de monocultura de milho e no primeiro (2012) e segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem temporária.....	43
<b>Quadro 13</b> - Produção de matéria seca (PMS), concentração de azoto nos tecidos (CNT) e azoto recuperado na biomassa aérea (NRec) em milho cultivado após cinco (2012) e seis (2013) anos de monocultura de milho e no primeiro (2012) e segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem.....	44
<b>Quadro 14</b> - Exportação de macronutrientes na matéria seca de milho cultivado após seis (2013) anos de monocultura de milho e no segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem temporária.....	46
<b>Quadro 15</b> - Exportação de micronutrientes na matéria seca de milho cultivado após seis (2013) anos de monocultura de milho e no segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem temporária.....	46

## **Abreviaturas**

ANOVA - Analyse of Variance

BBCH - Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt and Chemical

C - Carbono

CNF - Concentração de Azoto Foliar

CNT - Concentração de Azoto nos Tecidos

CTC - Capacidade de Troca Catiónica

K - Potássio

Monoc - Monocultura

MO - Matéria Orgânica

MS - Matéria Seca

MTA - Membrana de Troca Aniónica

N - Azoto

N Rec - Azoto Recuperado

NE - Nordeste

NW - Noroeste

P - Fósforo

Past - Pastagem

PMS - Produção de Matéria Seca

Prof - Profundidade

SE - Sudeste

SW – Sudoeste

## Resumo

A rotação de culturas é um aspeto central na sustentabilidade da atividade agrícola. Permite diminuir os problemas fitossanitários e incrementar a fertilidade do solo, com redução de custos e impactes ambientais associados ao uso de pesticidas e fertilizantes. A introdução de pastagens na rotação potencia efeitos ecológicos positivos, sobretudo quando estas contemplam leguminosas. A utilização de leguminosas na rotação é a forma mais natural de promover a fertilidade do solo devido à fixação biológica de azoto. Este trabalho teve por objetivo avaliar a fertilidade do solo em duas folhas sujeitas a culturas diferentes na sequência de uma rotação. Uma das folhas teve uma pastagem durante cinco anos e a outra monocultura de milho. A experiência teve início no ano de mudança da rotação, isto é, quando a pastagem passou para a folha que vinha sendo cultivada com milho e vice-versa. A fertilidade do solo foi determinada a partir de um ensaio de campo em que se cultivou milho, em talhões envolvendo as duas folhas previamente cultivadas com pastagem e com milho em monocultura, um ensaio em vasos com cultivo de nabiça e centeio em solo proveniente das duas situações, colhido a duas profundidades, e através de diversas análises laboratoriais.

No primeiro ano de ensaio (2012) a produção de matéria seca de milho foi significativamente mais elevada na folha que tinha tido pastagem ( $15,3 \text{ t ha}^{-1}$ ) comparativamente com a folha que vinha sendo cultivado com monocultura de milho ( $8,8 \text{ t ha}^{-1}$ ). No ensaio em vasos, a produção de matéria seca de nabiça variou entre 1,72 e 4,27 g/vaso e a produção de matéria seca de centeio variou entre 2,63 e 4,82 g/vaso, sendo, em ambos os casos, os valores mais elevados obtidos nos solos provenientes da pastagem e da profundidade 0-10 cm. As diversas análises laboratoriais efetuadas confirmaram maior disponibilidade de azoto no solo nas amostras provenientes da pastagem em comparação com as amostras provenientes da folha de milho. O estudo demonstrou que, a introdução de uma pastagem temporária numa rotação incrementa a fertilidade de solo.

**Palavras-chaves:** rotação de culturas; pastagem temporária; ley-farming; fertilidade de solo; leguminosas; milho.

## **Abstract**

Crop rotation is a central aspect in the sustainability of the agricultural activity. It allows to decrease phytosanitary problems and increase soil fertility, reducing costs and environmental impacts associated with the use of pesticides and fertilizers. The introduction of a pasture in a crop rotation brings ecological benefits, especially when it includes legume species. The use of legumes in the rotation is the most natural way to promote soil fertility due to biological fixation of nitrogen. This study aimed to evaluate soil fertility in two plots subject to different crops in the course of a crop rotation. One of the plots had a pasture for five years and the other maize in monoculture. The experience began in the year of crop change in the rotation, that is, when the grassland passed to the plot that had been cultivated with corn and vice-versa. Soil fertility was determined from a field experiment in which maize was cultivated in plots involving the two leaves previously cultivated with pasture and maize monoculture, an essay in pots with cultivated of turnip and rye in soil from both of situations harvested two depths, and through several laboratory determinations.

In the first year of the trial (2012) maize dry matter yield was significantly higher in the plot previously occupied with the pasture (15.3 t ha<sup>-1</sup>) compared with the plot that had been cultivated with maize monoculture (8.8 t ha<sup>-1</sup>). In pots experiments, dry matter yield of rye was between 1.72 and 4.27 g/pot and dry matter yield of turnip ranged between 2.63 and 4.82 g/pot, being in both cases the highest values obtained in soils from pasture and from the 0-10 cm soil layer. The laboratory analyses confirmed the higher availability of nitrogen in the soil samples from the pasture plot compared with the samples from corn maize monoculture plot. The study demonstrated that the introduction of a temporary pasture in a crop rotation increases soil fertility.

**Keywords:** crop rotation; temporary pasture; ley-farming; soil fertility; legumes; maize.

## **Introdução**

O aumento contínuo da população mundial e a necessidade de alimentar vai criar cada vez mais pressão nos ecossistemas agrários, aumentando o risco da sua sobre-exploração. A continuidade das pesquisas em todas as fases da produção agrícola é fundamental para desenvolver conhecimento que permita uma melhor intervenção nos agrossistemas. A rotação de culturas e a gestão da fertilidade do solo são aspectos que têm merecido e continuarão, por certo, a merecer a atenção da comunidade científica internacional, devido à sua relação com a sustentabilidade das produções. Esta tese versa o tópico referido, procurando demonstrar o efeito favorável da inclusão de pastagens temporárias na rotação como forma de promover a fertilidade do solo e a sustentabilidade da produção.

A revisão bibliográfica da tese está organizada em cinco capítulos que suportam a parte experimental, designadamente dedicados à rotação de culturas, à matéria orgânica do solo, à avaliação da fertilidade do solo, à avaliação do estado nutricional das plantas e à interpretação de resultados. Segue-se o capítulo de material e métodos, onde se descreve toda a parte experimental da tese. Os resultados e a sua discussão surgem em capítulo único ao qual se seguem breves conclusões.

## Parte I- Revisão Bibliográfica

### **1-Rotação de culturas**

Por *rotação* entende-se a sucessão de culturas ordenadas no tempo num dado terreno, de modo a que ao fim de determinado número de anos se reinicie da mesma forma (Diehl, 1989). A rotação de culturas pressupõe o afolhamento, que consiste na divisão da área da exploração em folhas idênticas de forma a manter a estrutura produtiva da empresa. Assim, o número de folhas deve ser igual ao número de anos da rotação (Ferreira, 2009).

#### **1.1-Vantagens da rotação de culturas**

A rotação de culturas é normalmente vista como o elemento central em agroecologia. Efeitos benéficos da rotação de culturas são conhecidos desde as civilizações Grega, Egípcia e Romana (Power, 1990), embora a sedimentação do conhecimento e a demonstração das vantagens só tenha ocorrido a partir do século XIX, com o desenvolvimento da rotação de Norfolk (Knox *et al.*, 2011). A rotação de Norfolk consiste em quatro culturas produtivas: uma cultura sachada (nabo); seguida de um cereal (cevada de primavera); uma leguminosa (trevo violeta); e, novamente, um cereal (trigo).

As rotações, quando bem estabelecidas, permitem reduzir a incidência de pragas, doenças e infestantes, com incremento de produtividade, redução de custos e/ou impactes ambientais associados à aplicação de pesticidas (Taimo e Calegari, 2007; Quitembo e Aguiar, 2010).

O papel benéfico das rotações foi grandemente enfatizado com a descoberta da capacidade das leguminosas acederem ao azoto atmosférico a partir do estabelecimento de relações simbióticas com microrganismos com capacidade de fixação de azoto. Contudo, no período que se seguiu à II Guerra Mundial, com a generalização dos adubos de síntese industrial, prestou-se pouca atenção às leguminosas (Castro *et al.*, 2009). No presente, o interesse pelo papel das leguminosas nos sistemas agrícolas é significativo. As leguminosas adquiriram de novo papel determinante nas rotações, sendo habitualmente classificadas como culturas melhoradoras, pelo fato de poderem

satisfazer as suas próprias necessidades em azoto e fornecerem azoto a outras culturas que se seguem na rotação (Gonzaga, 2009; Trabelsi *et al.*, 2012; Zotarelli *et al.*, 2012; Monday *et al.*, 2013). Consideram-se, por isso, plantas que melhoram a fertilidade do solo. Para além da fixação de azoto, aumentam o teor de matéria orgânica no solo, já que favorecem a produção de biomassa em sistemas com limitação de azoto no solo.

A rotação de culturas pode apresentar inúmeras vantagens, como por exemplo a eliminação da alelopatia provocada por resíduos de culturas anteriores e a diminuição do risco de problemas ambientais ou de mercado comparativamente com situações em que se trabalhe com uma só cultura (Castro *et al.*, 2009). A rotação de culturas, quando bem estabelecida, permite ainda uma maior economia de fertilizantes sobretudo de azoto (Quitembo e Aguiar, 2010).

Havlin *et al.* (2005) apresentaram algumas vantagens específicas atribuídas à rotação de culturas, resumidas da seguinte forma e que sintetizam as considerações apresentadas anteriormente:

- as raízes profundas das leguminosas que integram rotações melhoram a estrutura do solo, a infiltração da água e a redistribuição de nutrientes no perfil do solo;
- o solo mantém-se coberto de forma mais uniforme o que contribui para menor perda de água e para menor erosão;
- o controlo de insectos, infestantes e doenças é favorecido e a alteração no tipo de resíduos promove a competição em organismos do solo e pode ajudar na redução de agentes patogénicos;
- o rendimento do agricultor é mais diversificado.

## **1.2-Problemas da monocultura**

A opção pela monocultura poderá apresentar algumas vantagens associadas e fatores edafoclimáticas que podem favorecer uma determinada cultura (Havlin *et al.*, 2005). No entanto, a monocultura está na base das preocupações ambientais ligadas à agricultura. A monocultura é vista como a antítese do desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável e que forneça melhor qualidade de vida ao homem.

A nível da exploração, a monocultura é justificada pelo fato de, em cada conjuntura socioeconómica, haver sempre uma cultura que, se analisada isoladamente, origina

maior receita que as restantes numa perspetiva de curto prazo, sendo, por isso, atrativa para o agricultor.

Contudo, esta prática origina problemas a prazo, designadamente decorrentes do aumento da incidência de pragas, doenças e infestantes e da necessidade de se aplicar cada vez maior quantidade de produtos pesticidas (Havlin *et al.*, 2005). Diversa bibliografia da especialidade destaca estes e outros problemas decorrentes da manutenção de sistemas de cultivo em monocultura por períodos de tempo muito longos (Diehl, 1989; Castro *et al.*, 2008; Taimo e Calegari, 2007; Salgueiro, 2008; Santos, 2011). Além disso, os agricultores ficam menos protegidos do ponto de vista económico, no que respeita a acidentes que possam ocorrer no decurso do ciclo vegetativo.

### **1.3-As pastagens temporárias na rotação**

As pastagens constituem a base da alimentação dos ruminantes em grande parte dos sistemas de produção agropecuários de várias regiões do globo. Em Portugal, as pastagens ocupam 38% da superfície agrícola útil (Moreira, 2002). Entre os recenseamentos gerais agrícolas de 1989 e 1999, a superfície agrícola destinada à pecuária (pousios, prados temporários, pastagens permanentes e culturas forrageiras) aumentaram 11%, situando-se em 1999 em 2,6 milhões de hectares (Salgueiro, 2008).

Segundo Moreira (2002) as pastagens podem ser classificadas como *permanentes* ou *temporárias*. São permanentes quando têm uma longa duração e não estão inseridas numa sequência rotacional com outras culturas. São classificadas como temporárias quando estão inseridas em rotação de culturas arvenses.

Quando o sistema de cultura inclui uma pastagem temporária à qual se segue na rotação a cultura de cereais é normalmente designado de *ley-farming*. A adoção de sistemas de *ley-farming*, com introdução de culturas permanentes na rotação, potencia os benefícios ecológicos da rotação, sobretudo quando a pastagem contempla uma boa componente de leguminosas (Arrobas *et al.*, 2013). Os sistemas de *ley-farming* permitem reduzir significativamente o uso de energia, controlam de forma eficiente as infestantes e outros problemas fitossanitários e mantêm a fertilidade do solo em níveis adequados.

As enormes vantagens da introdução de pastagens temporárias na rotação foram sendo reconhecidas pela ciência ao longo dos anos (Moreira, 2002). Para além das vantagens da introdução de azoto no solo têm outras vantagens importantes como a melhoria da estrutura físico-químico do solo (Santos *et al.*, 2001; Moreira, 2002).

#### **1.4-As leguminosas na rotação**

O azoto é dos principais fatores limitantes ao crescimento da vegetação em ecossistemas naturais e agrícolas. Contudo, o azoto é o gás mais abundante da atmosfera, representado aproximadamente 78% de todos os gases em volume. No entanto, este nutriente não está disponível para as plantas nem para a maioria dos organismos vivos.

As leguminosas têm acesso ao azoto atmosférico devido ao estabelecimento de uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de azoto (Russelle, 2008). Desta forma, as leguminosas podem obter azoto suficiente para o seu próprio crescimento, podendo beneficiar também culturas não leguminosas estabelecidas em consociação (Hardarson e Atkins, 2003; Pirhofer-Walzl *et al.*, 2012) e as que se seguem na rotação (Zotarelli *et al.*, 2012; Monday *et al.*, 2013). Outra consequência direta da fixação biológica de azoto é a redução de custos com fertilizantes.

De acordo com Russelle (2008), nos ecossistemas terrestres podem distinguir-se três sistemas bióticos fixadores:

a) organismos livres – são organismos heterotróficos que vivem no solo, não têm relação de especificidade com hospedeiros, sendo a capacidade de fixação limitada e dependente da presença de substratos orgânicos no solo;

b) endofíticos facultativos – são organismos que vivem no solo ou no interior das plantas com nenhuma ou reduzida especificidade com o hospedeiro;

c) endofíticos obrigatórios – vivem em simbiose mais ou menos perfeita com plantas superiores. Apesar de haver inúmeras espécies de microrganismos e diversas famílias de plantas envolvidas, o grupo mais estudado e a que se tem dado maior destaque nos agrossistemas são os microrganismos da família das rizobiáceas que originam a formação de nódulos nos sistemas radiculares das leguminosas.

Atendendo à capacidade de fixação de azoto das leguminosas, a concentração deste nutriente nos seus tecidos é maior relativamente a espécies não leguminosas (Perdigão *et al.*, 2011). Comparando leguminosas pratenses e leguminosas cultivadas para grão, as primeiras deixam um resíduo no solo mais rico em azoto, normalmente porque têm sistemas radiculares mais extensos e sobretudo porque, nas segundas, grande parte do azoto fixado é transladado para o grão, sendo exportado na colheita (Castro *et al.*, 2009).

As leguminosas diferem entre si na capacidade de fixação de azoto (Perdigão *et al.*, 2011), podendo, em determinadas condições, este critério ser usado na escolha das espécies a introduzir nas pastagens. A título de exemplo, a ervilhaca pode fixar mais de 100 kg/ha/ano e a luzerna pode ultrapassar os 200 kg /ha/ano (Ferreira, 2009).

Com as leguminosas aumenta o potencial de produção de biomassa dos agrossistemas em condições de limitação natural de azoto. Uma das vantagens colaterais da inclusão de leguminosas nas pastagens e outros agrossistemas é o aumento do teor de matéria orgânica do solo, devido ao incremento dos resíduos depositados a partir dos sistemas radiculares e deposição da parte aérea das plantas (Rodrigues *et al.*, 2010).

## 2-Matéria orgânica do solo

A matéria orgânica do solo é composta pelos resíduos das plantas e animais em vários graus de decomposição, incluindo também os organismos vivos do solo (Costa, 1995; Varennes, 2003; Favoretto, 2007). A matéria orgânica apresenta características marcadamente diferentes consoante o grau de decomposição em que se encontra (Santos, 2012), sendo um componente essencial para a qualidade e produtividade dos solos agrícolas (Favoretto *et al.*, 2008). A matéria orgânica do solo representa também a maior *pool* de carbono a nível terrestre, sendo um fator regulador do efeito de estufa estabelecido pela atmosfera (Favoretto, 2007).

Segundo Varennes (2003) a matéria orgânica representa normalmente 1 a 6 % da massa total da camada arável de um solo agrícola, sendo um importante fator da sua resiliência.

Segundo Santos (2012) a influência benéfica na matéria orgânica na fertilidade do solo manifesta-se sobre diversos aspetos, dos quais se destacam os seguintes:

- Permitindo a aglomeração de partículas minerais, vai contribuir para que o solo apresente melhor estrutura, com reflexos favoráveis nos movimentos da água, do ar e das raízes das plantas;
- O facto de conferir aos solos uma cor mais escura, que permite uma maior absorção de radiações caloríficas, aliado ao maior conteúdo do teor de água no solo, pode aumentar e regularizar a temperatura;
- Elevada capacidade de hidratação e de troca iónica, contribuindo para o aumento da retenção da água e de iões nutrientes aplicados através de fertilizantes;
- Aumento do poder tampão do solo, isto é, cria condições para que não ocorram flutuações rápidas de pH;
- A sua ação complexante em relação a alguns micronutrientes, o alumínio em particular, reduz o risco de estes se tornarem tóxicos para as plantas e, simultaneamente, aumenta a disponibilidade de fósforo;
- Durante a sua decomposição liberta hormonas, vitaminas e outras substâncias de interesse para as plantas e para outros seres vivos;
- Constitui o principal suporte energético e nutritivo dos microrganismos, razão por que se diz que dá *vida aos solos*.

O aumento da matéria orgânica do solo está diretamente relacionada com a adição de carbono e/ou redução da taxa de decomposição dos materiais orgânicos frescos e húmus. Uma forma de adicionar carbono ao longo dos anos é através da vegetação espontânea (infestantes), pelo cultivo de espécies pratenses ou através da prática ordenada de sucessões, rotações e/ou consociação de culturas (Taimo e Calegari, 2007).

O solo é o habitat de uma enorme variedade de organismos compreendendo bactérias, fungos, algas, protozoários e diversa macrofauna (Varenes, 2003). A atividade dos diversos grupos de organismos do solo está interligada entre si e depende das condições ambientais prevalentes, designadamente temperatura, arejamento, humidade, substrato disponível e teor de nutrientes no solo (Costa, 1995). Entre os microrganismos do solo estabelecem-se fortes relações de competição e antagonismo. A microflora inclui organismos autotróficos e heterotróficos. Estes últimos desempenham um papel fundamental na decomposição dos resíduos orgânicos. As raízes e restos de vegetais deixados na parcela são atacados pelos microrganismos, ocorrendo simultaneamente dois processos, mineralização e humificação (Varenes, 2003).

### **2.1-Mineralização e imobilização de azoto**

Os substratos orgânicos são fundamentalmente constituído por carbono (C), oxigénio (O) e hidrogénio (H), contendo ainda em maior ou menor proporção enxofre, fósforo, azoto e outros elementos. Em meio aeróbio a base orgânica composta por C, O e H é predominantemente mineralizada em dióxido de carbono e água (Costa, 1995).

De acordo com Rodrigues (2000), a mineralização consiste no processo biológico através do qual as substâncias orgânicas complexas são convertidas nas formas minerais  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ . Favoretto (2007) refere que a mineralização é de grande interesse para a fertilidade do solo e para a nutrição vegetal, pois é um processo que converte elementos presentes na matéria orgânica em compostos inorgânicos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ). O autor refere que os elementos minerais do solo constituem a principal fonte de nutrientes para as plantas, estando a sua libertação relacionada com a decomposição e a mineralização da matéria orgânica do solo. Alguns autores (Èliard, 1979; Favoretto, 2007) distinguem entre mineralização primária e secundária. A mineralização primária consiste na conversão da matéria orgânica fresca em compostos inorgânicos e húmus, um composto orgânico homogéneo e estável. A mineralização

secundária refere-se ao lento processo de degradação das substâncias húmicas estáveis, pelos microrganismos. A taxa de degradação destas substâncias estáveis varia com o tipo de solo e com o seu regime hídrico (Ferreira, 2009).

No processo de mineralização os autores Rodrigues (2000) e Favoretto (2007) distinguem duas etapas principais: *aminização*, que consiste na decomposição de materiais orgânicos complexos em materiais mais simples, como aminoácidos e aminas, pela ação de enzimas extracelulares produzidas por microrganismos heterotróficos do solo; e *amonificação*, que consiste na oxidação destes compostos por enzimas intracelulares de outros grupos de microrganismos heterotróficos com a libertação de  $\text{NH}_4^+$ . Por vezes inclui-se ainda a *nitrificação* no processo de mineralização. A nitrificação consiste na oxidação biológica do  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  por bactérias autotróficas do solo, designadamente dos géneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. Em rigor, a nitrificação já não deve ser incluída no processo de mineralização uma vez que se trata da conversão entre duas formas minerais de azoto (Rodrigues, 2000).

No processo de decomposição dos materiais orgânicos só surge  $\text{NH}_4^+$ , como produto da reação, se o azoto no substrato a decompor estiver presente em quantidades globalmente superiores às necessidades dos microrganismos. Se o substrato orgânico tiver pouco azoto, os microrganismos podem mesmo utilizar azoto inorgânico do solo. O ião  $\text{NH}_4^+$  é a forma mineral preferida pelos microrganismos, embora também possam utilizar  $\text{NO}_3^-$  (Rodrigues, 2000). Segundo Èliard (1979) a mineralização, que liberta azoto mineral utilizável pelas plantas, é mais intensa nos períodos do ano mais favoráveis à atividade microbiana. Também Favoretto (2007) refere que a disponibilidade de azoto depende de fatores ambientais como temperatura, arejamento, humidade, quantidade e natureza do material orgânico presente.

A imobilização consiste na conversão de elementos minerais em formas orgânicas, sendo realizada pelas plantas e pelos organismos do solo (Varenes, 2003). Para Rodrigues (2000) a imobilização de azoto é um fenómeno temporário, que ocorre com o aumento da biomassa microbiana do solo associada à decomposição de resíduos. Com exaustão ou redução do substrato, a população microbiana começa a decrescer pela morte dos microrganismos. Com a decomposição dos seus corpos surge de novo azoto mineral que pode ficar disponível para as plantas.

Quando se adiciona um resíduo orgânico fresco ao solo, o ritmo de decomposição e a expectativa de libertação de azoto mineral no curto prazo depende da sua razão C/N. Se a razão C/N do substrato orgânico for baixa é expectável que ocorra mineralização líquida. Se o resíduo tiver razão C/N elevada é expectável que ocorra imobilização biológica (Rodrigues, 2000; Varennes, 2003). Os tecidos herbáceos frescos, sobretudo das leguminosas, apresentam baixa razão C/N, enquanto os materiais mais lenhosos, como as palhas dos cereais e ramas de espécies arbóreas, apresentam razão C/N mais elevada. Havlin *et al.* (2005) apresentam valor de C/N de cerca de 20:1 como o valor que separa a imobilização da mineralização.

## **2.2-Humificação**

Humificação é o processo de síntese de novas moléculas orgânicas ou da alteração estrutural das existentes (Varennes, 2003). A humificação compreende a transformação de compostos com morfologia conhecida e identificável em compostos húmicos amorfos (substâncias húmicas) de elevado peso molecular e alta estabilidade (Fontona, 2009).

O interesse pelos estudos das substâncias húmicas remonta ao século XVIII e vem acompanhando a evolução da ciência do solo e de outras ciências, passando por adequações no que se refere aos métodos de pesquisas, assim como a interpretação dos padrões pelos diversos ecossistemas, a partir do seu isolamento e da tentativa de estabelecer modelos para estas moléculas complexas (Fontona, 2009). De acordo com Costa (1995) o processo de formação das substâncias húmicas motivou a atenção dos investigadores logo no período inicial dos estudos sobre a matéria orgânica do solo.

Em geral, as substâncias húmicas são os componentes mais estáveis da matéria orgânica, constituídos por ácidos húmicos, fúlvicos e humina e representam até 80% do carbono presente no solo. A sua natureza complexa resulta na sua permanência do solo durante varias centenas de anos (Varennes, 2003) e são estas substâncias estáveis as responsáveis pelas características físicas e químicas dos solos mais favoráveis ao crescimento das plantas, referidas no ponto 2. A quantidade de matéria orgânica que dá origem a substâncias húmicas parece ser influenciada, pelo material de origem, pH, vegetação presente e pelo sistema de gestão do solo (Favoretto, 2007).

### **3-Avaliação da fertilidade do solo**

Ao longo do tempo têm sido numerosas as tentativas de se definir fertilidade do solo. Numa fase inicial existiu a tendência de se expressar a fertilidade do solo em termos de produtividade, ou seja, de se utilizar, indistintamente, os termos fertilidade e produtividade (produção por unidade de área) como sinónimos. Com o aparecimento das técnicas analíticas, os termos ganharam significados distintos. O “Glossary of Soil Science Terms” (SSSA, 2008) define *fertilidade do solo* como a qualidade do solo que lhe permite fornecer nutrientes essenciais em quantidades adequadas às plantas durante a estação de crescimento. *Fertilidade do Solo* é então um termo frequentemente utilizado para significar a quantidade de nutrientes passíveis de serem absorvidos pelas plantas (Ronquim, 2010). Um solo fértil também não deve conter elementos tóxicos ou possuir propriedades físicas e biológicas que limitem o desenvolvimento dos vegetais.

#### **3.1-A escolha de um método analítico**

Para qualquer processo analítico e para cada determinação há, normalmente, sempre mais que um método aconselhado. Os métodos são desenvolvidos para condições particulares e podem estar relacionados com o material a analisar, os meios laboratoriais e o tempo disponível para a sua execução (Arrobas, 2000). Os métodos analíticos usados devem obedecer aos seguintes critérios:

- Devem extrair uma quantidade do ião nutriente efetivamente disponível para as plantas. Este critério nem sempre é fácil de observar uma vez que uma solução extrativa pode ter comportamentos diferentes em solos com valores diferentes de pH, teor de água, atividade microbiana, passado de fertilização;
- Devem ser baratos, reproduzíveis em diferentes laboratórios e facilmente adaptados a procedimentos de rotina.

Estes atributos devem permitir a realização frequente de análises, a obtenção de resultados que permitem a tomada de decisão em tempo útil e a possibilidade de comparar resultados (Jones, 2001). Assim, a opção por um método analítico tem em conta vários fatores que podem ser resumidos em três palavras: *precisão, rapidez, e custo*.

### **3.2-Avaliação da disponibilidade de azoto no solo**

Rodrigues (2000) apresenta uma revisão sobre as diferentes metodologias ou aproximações de avaliar a disponibilidade de azoto no solo. Estes métodos podem dividir-se em biológicos e químicos, respetivamente se incluem organismos vivos ou se utilizam soluções extrativas em laboratório.

#### **3.2.1-Métodos biológicos**

O crescimento das plantas observado em condições bem determinadas pode utilizar-se como meio de avaliar o teor de nutrientes no solo em formas absorvíveis pelas plantas. Atendendo ao realismo destes métodos, eles são importantes na determinação da quantidade de fertilizantes a aplicar (Santos, 2012). Pelo método de Mitscherlich, isto é, usando doses crescentes de nutriente pode observar-se a curva de resposta de um vegetal e inferir sobre a quantidade de fertilizante a aplicar (Black, 1992).

Os métodos biológicos podem ainda envolver a incubação dos solos em condições controladas durante períodos de tempo variáveis (Rodrigues, 2000). Com as incubações biológicas pretende-se extrair da matéria orgânica o azoto facilmente mineralizável com o mesmo tipo de agentes microbiológicos que atuam nas condições de campo. Os solos podem ser incubados em condições aeróbias ou anaeróbias por períodos de tempo e temperaturas muito variadas.

A maior parte dos métodos de incubação aeróbia propõem a incubação do solo em condições próximas das ideais para a atividade dos microrganismos que mineralizam a matéria orgânica. Têm sido testadas numerosas variantes, sendo que as principais diferenças estão relacionadas com a duração (desde 7 dias a mais de 40 semanas) e a temperatura de incubação (normalmente entre 15 e 37 °C) (Rodrigues, 2000).

As incubações anaeróbias consistem em incubar terra em excesso de água seguida da destilação do  $\text{NH}_4^+$  formado. Com as incubações anaeróbias reduz-se o efeito da variação do teor de humidade e do arejamento durante a incubação, fatores que são difíceis de gerir nas incubações aeróbias. As variantes de incubação anaeróbias são mínimas se comparadas com as incubações aeróbias. O método mais generalizado

consiste em colocar terra a incubar em condições de anaerobiose (excesso de água) durante 7 dias a 40 °C, medindo-se o  $\text{NH}_4^+$  libertado.

### **3.2.2-Métodos químicos de avaliação da disponibilidade de azoto no solo**

Nas últimas décadas, em praticamente todas as revisões sobre a avaliação da disponibilidade biológica de azoto no solo, considerou-se urgente desenvolver um método de extração química simples e rápido que possa ser utilizado em rotina nos laboratórios, à semelhança do que acontece para os restantes nutrientes menos móveis (Rodrigues, 2000). Rodrigues (2000) salienta que a maior dificuldade resulta do fato das transformações do azoto serem dominadas por reações biológicas complexas, fortemente dependente das condições ambientais e culturais, sendo difícil estabelecer uma boa relação entre o resultado do método de extração e a absorção de nutrientes pelas plantas.

Os métodos químicos são importantes por serem rápidos e poucos sensíveis aos pré-tratamentos das amostras. Os laboratórios necessitam de métodos químicos para as análises de rotina.

#### **3.2.2.1-Matéria orgânica e carbono orgânico**

O carbono ocorre no solo nas formas orgânicas e minerais. Em regiões de clima temperado, onde os perfis são submetidos a intensa lixiviação das bases de troca, o carbono aparece predominantemente na forma orgânica. O teor de matéria orgânica do solo é determinado sobretudo por métodos indiretos, usando combustão por via húmida ou por via seca, medindo-se a subsequente evolução do gás carbónico (Camargo *et al.*, 2009). A matéria orgânica é frequentemente usada como indicador da disponibilidade de azoto no solo, uma vez que o teor de azoto na matéria orgânica que se encontra na fracção *terra fina* é mais ou menos constante ( $\approx 5\%$ ) (Rodrigues, 2000). Assim, em vez do azoto total estima-se o teor de matéria orgânica por via húmida, ou seja, determina-se o carbono facilmente oxidável pelo dicromato de potássio em meio ácido (método Walkley-Black) e multiplica-se o teor em carbono pelo fator 1,724 para se obter o teor em matéria orgânica do solo (Jones, 2001). O método é barato e mais adequado para a rotina, uma vez que não requer equipamento dispendioso.

### 3.2.2.2-Determinação do azoto total

A maior parte do azoto no solo encontra-se associada à matéria orgânica (Camargo *et al.*, 2009). O azoto orgânico representa 95 a 98 % do azoto total no solo (Rodrigues, 2000). Assim, as mudanças produzidas na matéria orgânica afetam de forma semelhante o azoto orgânico. A relação carbono/azoto da matéria orgânica é um indicador importante da sua natureza e grau de decomposição e informa sobre a atividade biológica do solo e sobre a disponibilidade potencial de azoto para as plantas. Na determinação do azoto total do solo são utilizados sobretudo dois métodos: i) Método Kjeldahl e ii) Método de Dumas. *O método kjeldahl* consiste na digestão de uma amostra de solo com ácido sulfúrico concentrado em presença de um catalisador e por ação do calor. Neste processo o azoto orgânico é convertido a  $\text{NH}_4^+$  que é quantificado por titulação com um ácido, após destilação alcalina, numa solução receptora de ácido bórico. O processo pode ser todo automatizado. *O método de Dumas* consiste numa oxidação por via seca, ou seja, a amostra é incinerada na presença de oxigénio e é libertado  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ . Este N passa por um detetor onde é quantificado (Jones, 2001). Ambos os métodos requerem equipamento dispendioso.

Rodrigues (2000) considera que, do ponto de vista teórico, é pouco provável que o azoto total se constitua como um bom indicador de disponibilidade de azoto para as plantas, dada a natureza pouco uniforme do substrato. As diferentes frações de azoto orgânico no solo têm taxas de mineralização diferentes o que torna difícil prever qual a quantidade de azoto que se liberta anualmente para as plantas.

### 3.2.2.3-Soluções salinas de cloreto de potássio

Os métodos que utilizam cloreto de potássio (KCl) como solução extratante têm sido muito testados nos últimos anos, dado o sucesso obtido na maior parte das experiências. Os procedimentos analíticos ensaiados variam na concentração da solução, na temperatura e tempo de extração (Rodrigues, 2000).

Uma das versões bastante experimentadas foi desenvolvida por Gianello e Bremner (1986). Estes autores propuseram a digestão num bloco, à temperatura de 100 °C durante 4 horas, de uma mistura de solo com uma solução de KCl 2M. O  $\text{NH}_4^+$  hidrolisado foi determinado pela destilação direita da mistura. Os autores subtraíram a esse valor o  $\text{NH}_4^+$  hidrolisado num procedimento de referência, que consistiu no

tratamento das amostras com KCl a frio. Num estudo feito em 33 solos no Brasil, Gianello e Bremner (1986) verificaram que os resultados do método estavam altamente correlacionados com os resultados de incubações aeróbias e anaeróbias. Este método tem a vantagem de ser rápido e preciso e de os resultados serem pouco afectados pelos pré-tratamentos das amostras, aspeto importante num método que se pretende utilizar em análises de rotina.

#### **3.2.2.4-Métodos que utilizam membranas de troca iónica**

As membranas de troca são polímeros orgânicos sólidos que possuem carga electrostática que é neutralizada por iões de carga oposta (Pereira *et al.*, 2009; Rodrigues, 2000). Elas têm sido utilizadas porque podem simular a absorção de nutrientes pelas raízes e a avaliação dessa quantidade de nutrientes que podem ser absorvidos não depende da dissolução de componentes do solo nem de produtos de reacção (Qian *et al.*, 1992). Foram desenvolvidas membranas de troca catiónica e aniónica consoante apresentam carga negativa ou positiva, respetivamente.

As membranas de troca evoluíram a partir de resinas de troca na forma de pérolas. A utilização destas resinas foi inicialmente proposta para extrair potássio, tido posteriormente grande desenvolvimento na extração de fósforo (Arrobas, 2000).

No caso do azoto são utilizados membranas de troca aniónica que extraem o ião nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Antes de serem usadas são saturadas por um anião ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) e colocados em contacto com o solo. Na presença de  $\text{NO}_3^-$  do solo, o anião adsorvido nas membranas é trocado de forma estequiométrica (Rodrigues, 2000; Pereira *et al.*, 2009). A membrana é depois colocada numa solução diluída de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, e o ião  $\text{NO}_3^-$  é eluído e posteriormente determinado por métodos apropriados (Rodrigues, 2000). A principal limitação deste método relativamente aos métodos rotineiros de laboratório é o tempo necessário para se obterem os resultados. Nunca será inferior a 24 horas se as membranas ficarem em contacto com o solo no laboratório (Arrobas, 2000) ou pode demorar vários dias se forem colocadas diretamente em vasos ou no campo (Rodrigues e Arrobas, 2010).

## **4-Avaliação do estado nutritivo das plantas**

As plantas, como seres vivos que são, para produzirem necessitam de crescer e para crescer necessitam de se alimentar. Logo a nutrição vegetal desempenha, necessariamente, um papel fundamental na extensão em que as plantas irão manifestar o seu potencial genético da produção (Santos, 2012). O produtor pode ficar a saber se as suas culturas estão bem nutridas procedendo à avaliação do seu estado nutricional.

As metodologias associadas à análise de plantas começaram a ser desenvolvidas ainda no século XIX. Os primeiros investigadores procuravam uma alternativa à análise de terras como técnicas de diagnóstico da fertilidade dos solos e que fornecesse também informação sobre o estado nutritivo das plantas (Rodrigues, 1997). Inicialmente existiu alguma controvérsia sobre a importância de cada uma das metodologias, mas rapidamente os investigadores reconheceram que análise de terras e análise de plantas não deviam ser entendidas como alternativas, mas sim como complementares.

A análise de plantas tem sido usada com alguns dos seguintes objetivos: (i) avaliar a adequação dos programas de fertilização; (ii) confirmar sintomas visíveis de deficiência e/ou toxicidade; (iii) detectar carências dissimuladas, permitindo efectuar correções atempadas antes da ocorrência de perdas importantes de produção; (iv) contribuir para o esclarecimento da complexidade da nutrição das plantas, destacando o efeito dos fertilizantes; e (v) como base da recomendação da fertilização (Rodrigues, 1997).

De acordo Rodrigues (2000) a análise de plantas como base da recomendação de fertilização tem-se generalizado em culturas perenes como pomares e vinhas. Em culturas anuais, de crescimento mais rápido, têm tido utilidade mais limitada uma vez que os resultados podem não ser fornecidos a tempo de uma intervenção técnica, ainda no ciclo vegetativo que se encontra a decorrer.

### **4.1-Fatores que afetam a composição mineral das plantas**

Até meados do século XX uma grande parte dos investigadores destas matérias sentiam-se impotentes e desmotivados para lidar com a variabilidade do teor de nutrientes nos tecidos das plantas (Rodrigues, 2000). Contudo a persistência de alguns

investigadores, que sempre encontravam utilidade dos resultados obtidos, foi permitindo o progresso destas pesquisas.

A subsequente escolha dos melhores tecidos da planta para amostrar, das melhores datas de amostragem e, pelo geral, do aumento do conhecimento como esses fatores influenciavam a composição mineral das plantas, permitiu progressos na interpretação dos resultados e validou esta importante técnica de diagnóstico (Jones *et al.* 1990; Rodrigues, 1997; 2000).

#### **4.1.1-Estado fenológico das plantas e idade dos tecidos**

A composição química de um tecido vegetal é um processo dinâmico que está sujeito a mudanças durante a estação de crescimento (Jones *et al.*,1990). A seguir ao efeito da aplicação de nutrientes, a idade fisiológica da planta é o fator que mais afeta a sua composição química, e conseqüentemente, mais interfere com a interpretação dos resultados da análise de plantas.

Rodrigues (1997) refere estudos que demonstram que, para as culturas anuais, a concentração de uma parte importante dos elementos nutrientes decresce e a de outros permanece mais ou menos constante, podendo mesmo aumentar com a idade. Relativamente aos macronutrientes primários (N, P e K), as plantas jovens apresentam níveis mais elevados nos seus tecidos que as plantas mais velhas. Alguns macronutrientes secundários (Ca, Mg) são exemplos de elementos nutrientes cuja concentração normalmente não decresce com a idade.

No caso dos elementos móveis, o azoto, em que a sua concentração decresce com a idade da planta, o fenómeno é explicado, em parte, pelo fato de nas fases iniciais as plantas absorvem mais azoto que as suas necessidades, acumulando-se os nutrientes nos seus tecidos (Rodrigues, 2000). O autor acrescenta que, nas fases posteriores, a acumulação dos produtos fotossintéticos é mais rápida que absorção dos nutrientes, levando à sua diluição.

#### **4.1.2-Escolha do tecido e sua posição na planta**

Para um determinado estado fenológico, está bem documentada a variação na composição mineral das plantas entre as diferentes partes, órgãos ou tecidos (Rodrigues,

1997; 2000). As folhas são consideradas o laboratório químico das plantas, onde grande parte dos nutrientes se encontra, sendo por isso o principal órgão que se analisa.

Em algumas plantas perenes, como é o caso de oliveiras, laranjeiras, etc., têm-se verificado alterações na composição das folhas em função da sua posição na copa. É também frequente ocorrerem variações entre as partes interiores e as exteriores, entre as partes mais altas e as mais baixas e mesmo em função da sua orientação (Rodrigues, 1997). Para as culturas anuais, a posição física dos tecidos na planta é difícil de dissociar o efeito idade fisiológica. Por exemplo, na planta de milho a última folha expandida é aquela que assume uma posição mais alta da canópia, mas também é a folha mais jovem (Rodrigues, 1997). Por vezes, recomenda-se, na mesma planta, a utilização de tecidos diferentes de acordo com o nutriente a analisar (Rodrigues, 2000). Segundo o autor, nos crisântemos, por exemplo, usam-se as folhas superiores dos ramos para avaliar azoto, cálcio, enxofre, ferro e boro, as folhas inferiores para o potássio, magnésio e zinco, e as médias para avaliar o cobre. No caso do milho recomenda-se que para plantas com menos de 30 cm de altura se proceda à colheita da planta inteira, na fase anterior ao embandeiramento se colham as folhas expandidas mais jovens e até ao aparecimento das barbas da espiga de milho se proceda à colheita da folha abaixo e oposta à espiga mais velha (LQARS, 2006).

#### **4.1.3-Fatores genéticos**

Vários aspetos da nutrição das plantas, como absorção, translocação, utilização e armazenamento de nutrientes são controlados geneticamente. Por isso, diferentes *taxa*, desde classes, famílias, géneros, espécies e genótipos dentro da mesma espécie apresentam certas semelhanças entre si (Rodrigues, 1997; 2000). Por exemplo, as espécies da família das fabáceas normalmente possuem teores elevados de azoto nos seus tecidos, enquanto algumas brássicas tendem a absorver enxofre em quantidades relativamente elevadas.

As características similares aumentam dos níveis hierárquicos superiores para os inferiores, na medida em que se reduz a variabilidade genética. Facilmente se aceita que, para as diferentes espécies cultivadas, sejam necessárias normas de interpretação de resultados específicas.

Rodrigues (2000) faz uma revisão sobre a investigação desenvolvida sobre o tópico, onde se questiona até que ponto as diferenças entre híbridos de milho e variedades de soja afetam a interpretação dos resultados. Isto é, se diferentes híbridos ou cultivares necessitam de normas de interpretação individuais. As maiores diferenças foram observadas para as cultivares de soja. O uso das folhas mais jovens com o limbo completamente expandido ajuda a ultrapassar este problema.

#### **4.2-Indicadores do estado nutritivo**

A concentração dos nutrientes na matéria seca é o indicador de referência para avaliar o estado nutritivo das plantas. Os resultados são expressos em percentagem ou em  $\text{g kg}^{-1}$  para os macronutrientes e em  $\text{mg kg}^{-1}$  para os micronutrientes (Rodrigues, 2000; LQARS, 2006).

A utilização da fração solúvel dos nutrientes (ou a fração que se dissolve em ácidos ou agentes quelatizantes), bem como certos compostos intermédios do metabolismo, (aminoácidos e aminas), a atividade de certas enzimas e o teor de clorofila, também têm sido utilizados com algum sucesso como indicadores do estado nutritivo das plantas (Rodrigues, 1997; 2000).

O azoto é um elemento para o qual frequentemente se utiliza uma fração solúvel como indicador do estado nutritivo. A avaliação do teor dos nitratos generalizou-se por ser fácil de determinar em testes rápidos (Rodrigues, 1997) e por ser uma forma não metabolizada e imóvel no floema. O autor, salienta que um bom indicador define-se pela qualidade da correlação dos seus valores com o resultado biológico e/ou económico da cultura.

## **5-Interpretação dos resultados**

### **5.1-Análises de solos**

A escolha de um método analítico que se vai adotar num laboratório implica uma fase prévia de *correlação*, onde se avalia a existência de uma relação causal entre a quantidade de nutriente extraível pelos métodos em estudo e a absorção desse nutriente pela planta (Melsted e Peck, 1973). A comparação dos valores de  $R^2$  obtidos a partir da aplicação de ferramentas estatísticas ajuda na decisão. A esta fase segue-se uma fase de *calibração*, onde se avalia o grau de limitação na produção de uma cultura provocado pelo valor do nutriente extraível. As análises de terra, por si só, fornecem apenas um índice do nível dos nutrientes que não tem significado se não for calibrado através de ensaios de resposta da cultura à adubação em condições de campo (Varenes, 2003). A calibração permite fazer uma *interpretação* dos resultados das análises de terra que será seguida de uma recomendação de fertilização. Na calibração e interpretação dos resultados das análises de terras podem estar presentes os seguintes princípios:

- O princípio da suficiência;
- O princípio do enriquecimento ou manutenção da fertilidade do solo.

O primeiro princípio pode relacionar-se com a *fertilização da cultura*, uma vez que consiste na aplicação dos nutrientes estritamente necessários à cultura. O segundo princípio consiste na *fertilização do solo* aumentando-lhe a sua capacidade de fornecer nutrientes às plantas, ou seja, aumentando a sua fertilidade. No caso de teores muito baixos de nutrientes no solo adiciona-se um excesso de nutrientes até se atingir um determinado nível e, a partir daí, aplica-se uma quantidade que permita manter esse nível (Varenes, 2003). Este princípio implica a definição de um *limite crítico* do nutriente no solo, que representa uma concentração do nutriente no solo a partir da qual não é expectável a resposta da cultura à adubação.

### **5.2-Análises de plantas**

Para uma determinada espécie e variedade, os padrões interpretativos só são válidos para o mesmo tipo de folhas ou de outros órgãos da planta que tenham sido colhidos em épocas equivalentes àsquelas para que tais padrões foram estabelecidos (INIDA, 1997). Para Rodrigues (1997; 2000) o sucesso da análise de plantas, enquanto técnica de

diagnóstico, depende não só do processo de amostragem e das técnicas analíticas, mas também da interpretação dos resultados.

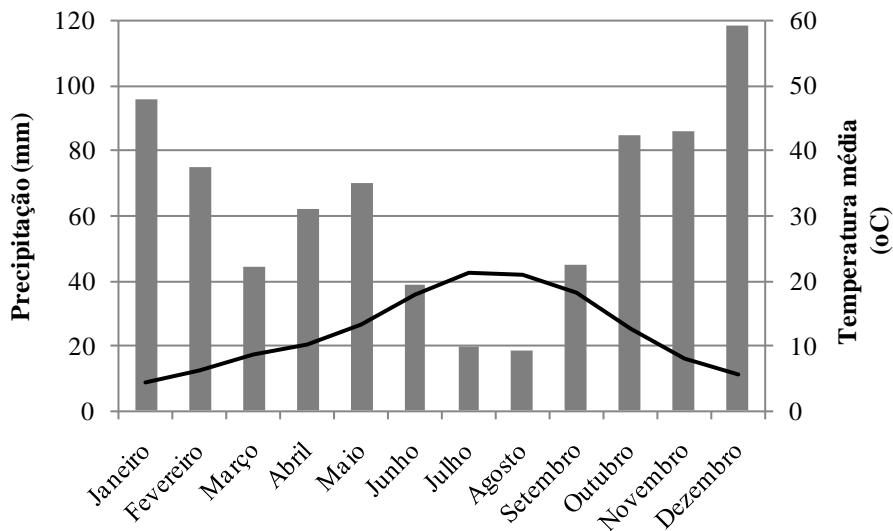
As propostas de interpretação de resultados da análise de plantas, com aceitação e uso generalizado, podem ser divididos em três categorias ou grupos principais: (i) comparação dos valores atuais da composição das plantas com concentrações críticas ou níveis críticos; (ii) agrupamento dos resultados em classes de suficiência, por processo análogo à interpretação dos resultados da análise de terras; e (iii) aplicação do sistema integrado de diagnóstico e recomendação (Diagnosis and Recommendation Integrated System, DRIS). Outras propostas recentes ainda pouco divulgadas têm incidido no refinamento do sistema DRIS e na análise de componentes principais.

## Parte II- Trabalho experimental

### 6-Material e métodos

#### 6.1- Caracterização climática do local e do solo da parcela

O ensaio foi instalado na Quinta do Poulão da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança (Latitude, 41° 47' 47,50" N; Longitude, 6° 46' 5,72" W). A região apresenta um clima do tipo mediterrânico com alguma influência Atlântica (Agroconsultores e Coba, 1991). Os valores da temperatura média do ar e da precipitação acumulada da normal climatológica 1971-2000 são, respetivamente, 12,3°C e 758,3 mm (figura 1).



**Figura 1.** Precipitação e temperatura média mensais em Bragança (1971-2000).

De acordo com a figura 1, os meses de menor disponibilidade de água no solo serão os meses de julho e agosto, altura em que as temperaturas são mais elevadas e a precipitação mais reduzida, o que poderia ser um problema para o desenvolvimento da cultura, caso não houvesse a possibilidade de rega das parcelas.

O solo da parcela onde decorreu o ensaio de campo e de onde se retiraram amostras para os ensaios em vasos e análises químicas laboratoriais classifica-se como fluvissoilo êutrico de aluvião (Arrobas *et al.*, 2013). A sua textura é franca e os teores de argila, limo e areia são respetivamente 21%, 25% e 54%.

## 6.2-Descrição da rotação e do delineamento experimental

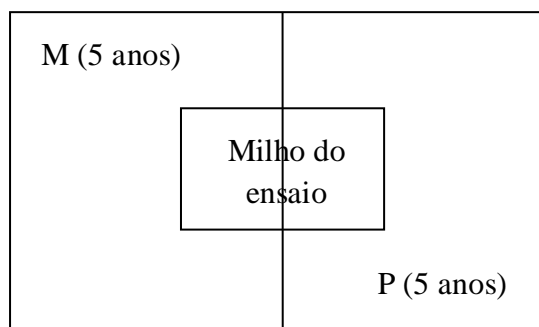
O ensaio de campo tem por base uma rotação octoanual de regadio, organizada em duas folhas: i) uma folha com uma pastagem temporária semeada; e ii) outra folha cultivada com milho em monocultura.

A rotação está instalada sob um pivô central que permite a irrigação das culturas. De acordo com Arrobas *et al.* (2013), a pastagem foi originalmente semeada com trevo branco (*Trifolium repens*) cvs. Haifa e Ladino, azevém perene (*Lolium perenne*) cv. Victorian, azevém híbrido (*L. multiflorum* x *L. perenne*) cv. Manawa e festuca alta (*Festuca arundinacea*) cv. Clarine. As leguminosas foram semeadas à razão de 2,5 kg ha<sup>-1</sup> e as gramíneas com 4,5 kg ha<sup>-1</sup>. Ao longo dos anos, a folha da pastagem e a folha de monocultura de milho durante o Inverno, foram pastoreadas com bovinos de leite da raça Frisia e bovinos de carne da raça Mirandesa. Nos anos a que se reporta esta experiência, a Quinta do Poulão teve uma média de 24 bovinos numa área de pastoreio de 12 ha, perfazendo 2 cabeças normais por hectare. Durante o período da rotação, a folha de milho foi regularmente fertilizada com estrume de bovino (10 a 15 toneladas por hectare) e com a aplicação de aproximadamente 200 kg de superfosfato 18% (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) por hectare e ano. Em cobertura aplicaram-se aproximadamente 250 kg de nitrato de amónio (20,5 % N) por hectare e ano. A pastagem temporária foi apenas fertilizada em fevereiro de 2009 com a aplicação de 250 kg de superfosfato 18% (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) e 200 kg de nitrato de amónio (20,5 % N) por hectare.

No ano em que as duas culturas trocaram de folha (em 2012), e na linha divisória das folhas criaram-se duas pequenas parcelas contíguas (Figura 2) para realizar a experiência que vai ser descrita. Note-se aqui que ocorreu um atraso de um ano na mudança de folhas da rotação relativamente ao que estava previsto. Isto é, a rotação está descrita como octoanual e, sendo assim, cada cultura deveria estar quatro anos na folha respetiva. Contudo, a mudança de folha só ocorreu ao quinto ano, um ano mais tarde que o previsto.

A experiência foi instalada semeando milho em ambas as parcelas (milho sob solo em que tinha sido cultivado milho durante 5 anos e milho sob solo que esteve sujeito a cinco anos de pastagem). No segundo ano (cujos resultados de campo são apresentados nesta tese) repetiu-se a sementeira de milho em ambas as parcelas. Assim, os resultados desta tese dizem respeito a uma folha que esteve com milho pelo sétimo ano

consecutivo e a outra que esteve no segundo ano de milho após ter estado cinco anos com pastagem e no ano anterior com milho.



**Figura 2.** Esquema das duas folhas da rotação, cultivadas com milho (M) e pastagem (P) durante cinco anos. Ao centro encontra-se o talhão experimental onde se semeou milho por dois anos consecutivos (nesta tese apresentam-se os resultados dos dois anos).

Assim, com vista a avaliar o estado de fertilidade do solo após cultivo com milho e pastagem durante cinco anos, em particular a disponibilidade de azoto, comparou-se a performance do milho cultivado nas duas folhas.

Foi ainda conduzido um ensaio em vasos com plantas indicadoras da disponibilidade de azoto no solo e realizaram-se diversas análises químicas laboratoriais. Os solos para o ensaio em vasos e para as análises laboratoriais foram colhidos a duas profundidades (0-10 e 10-20 cm) no ano de mudança de folha das culturas da rotação.

### **6.3-Instalação e condução do ensaio de campo com a cultura de milho**

O ensaio de campo consistiu no cultivo de milho em ambas as folhas da rotação octoanual de regadio previamente cultivadas com monocultura de milho e com uma pastagem temporária. Aqui descreve-se o segundo ano da experiência.

O ensaio foi instalado após mobilização do solo com charrua de aivecas e preparação da cama para a semente com escarificador. O milho, da variedade híbrida PR35Y65 do grupo FAO 500, foi semeado com um semeador monogrão numa densidade de 100 000 plantas por hectare em 23 de maio de 2013.

Em 19 de julho e 16 de agosto de 2013, nos estados fenológicos 39 (9 ou mais nós detetáveis) e 65 (panícula em floração; estigmas completamente emergidos) da escala BBCH (Meier, 2001), foi avaliado o estado nutricional das plantas usando o medidor de clorofila SPAD-502 e colhendo folhas para análise laboratorial. Em ambas as medições foram usadas as folhas mais jovens com o limbo completamente expandido, tal como descrito em LQARS (2006). Em 13 de Setembro de 2013, no estado fenológico 79 (a maioria das espigas atingiu o tamanho final) da escala BBCH (Meier, 2001), repetiu-se o procedimento e colheram-se plantas inteiras em amostras de 1,33 m linear (para perfazer um metro quadrado, tendo em conta uma distância na entrelinha de 0,75 m) para avaliação da biomassa produzida e dos nutrientes contidos na biomassa aérea. As plantas inteiras foram cortadas pela base, desfeitas em pequenos pedaços com a ajuda de facas e posteriormente secas até peso constante, em estufa de ventilação forçada, regulada a 70 °C para determinação da matéria seca das amostras e análise química.

#### **6.4-Ensaio em vasos**

Os ensaios em vasos são métodos biológicos de avaliação da disponibilidade de nutrientes no solo. A informação que fornecem é diferente e complementar da que fornecem os ensaios em campo. Nos vasos, devido aos pré-tratamentos das amostras (secagem, crivagem), a matéria orgânica fica mais exposta ao ataque dos microrganismos do que em campo, podendo este indicador dar melhor informação sobre a disponibilidade potencial de azoto no solo. O fato da experiência decorrer em estufa com uma temperatura mais elevada, concorre também naquele sentido. O ensaio em vasos decorreu nas estufas da Escola Superior Agrária de Bragança.

O solo foi colhido no ano de mudança de rotação das folhas com milho em monocultura e com pastagem. As amostras foram tomadas em vários pontos de amostragem e separadas em duas profundidades, designadamente 0-10 e 10-20 cm.

O solo foi seco ao ar e passado por um crivo de 2 mm. Na preparação dos vasos para a sementeira foi adicionado o substrato perlite (1/4 do volume) com propósito de melhorar o arejamento e favorecer o desenvolvimento radicular das plantas. Os vasos de polietileno foram cheios com aproximadamente 2 kg da mistura solo/perlite referida. De cada tipo de solo (parcela vs profundidade) foram constituídas seis repetições (seis vasos).

As espécies indicadoras da disponibilidade de azoto cultivadas foram nabiça (*Brassica rapa* L.) e centeio (*Secale cereale* L.). Estas duas espécies foram escolhidas pela sua conhecida nitrofilia e pelo fato de terem ciclos biológicos bastante distintos, com a nabiça com pico de absorção de nutrientes e crescimento expectável para o Outono e o centeio um pouco mais tarde para o fim do Inverno. A sementeira ocorreu a 4 de agosto de 2013. A nabiça foi cortada em 28 de janeiro de 2014 e o centeio em 12 de março de 2014. Durante a experiência as plantas foram regadas com água destilada em dotação que não limitasse o crescimento das plantas. Os parâmetros avaliados foram a produção de matéria seca e a concentração de azoto (e outros nutrientes) nos tecidos. Com base nestes dois parâmetros calculou-se a quantidade de azoto (e outros nutrientes) exportada na matéria seca.

Durante a experiência foram determinados os teores de nitratos no solo dos vasos, como forma de monitorar o processo de mineralização. Usaram-se membranas de troca aniónica para o efeito. Seguiu-se o procedimento descrito em Schoenau e Huang (1991) e Qian e Shoneau (1995) e repetido por Rodrigues e Arrobas (2010). Em cada um dos vasos foi colocada uma membrana de troca aniónica (40 mm x 20 mm de área) cortada a partir de folhas de 125 x 125 mm (Produto 551642S, VWR, BDH, PROLABO). As resinas foram previamente saturadas durante 24 horas com o ião  $\text{NaHCO}_3^-$  proveniente de uma solução de  $\text{NaHCO}_3^-$  0,5M. Foram depois colocadas no solo e retiradas ao fim de 4 dias. Depois de lavadas em água destilada eram colocadas em 20 ml de HCl 0,5M durante 4 horas para a eluição dos aniões do solo que aderiram às membranas por troca com aniões  $\text{NaHCO}_3^-$ . Nos extratos obtidos foram determinadas as concentrações de nitratos. Esta metodologia permitiu ainda a determinação de fosfatos no solo.

## **6.5-Determinações laboratoriais**

### **6.5.1-Análises de Solos**

As amostras de solo foram colhidas nas profundidades 0-10 e 10-20 cm, como já se referiu. Posteriormente foram secas ao ar e crivadas em malha de 2 mm. Na fração terra fina foram efetuadas as determinações: textura, pH, matéria orgânica, fósforo e potássio “assimiláveis”, azoto total, análise ao complexo de troca e micronutrientes. Nesta fração do solo foi também avaliado o potencial de mineralização da matéria orgânica usando métodos químicos laboratoriais. Tal como descrito no ponto anterior, procedeu-se ainda

à determinação da concentração de íons fosfato e nitrato no solo no início e final da experiência em vasos, recorrendo a membranas de troca aniónica. Os métodos analíticos associados às determinações referidas apresentam-se descritos de forma breve de seguida:

*Textura* - Após agitação de uma porção de solo (fração inferior a 2 mm) com um agente dispersante (hexametáfosfato de sódio), a areia é separada do limo e argila com um crivo de 50 µm de malha. O limo e argila foram determinados pelo método da pipeta. A suspensão é colocada numa proveta de 1000 mL. As partículas sedimentam ao longo do tempo de acordo com o seu tamanho e posicionam-se em diferentes profundidades da proveta. A pipeta serve para recolher uma amostra de solo e argila nos primeiros centímetros a contar da superfície e depois para recolher limo + argila. As suspensões são depois secas a 105 °C e avaliada a proporção de cada fração na amostra de solo (Van Reeuwijk, 2002).

*pH* - O pH do solo foi avaliado numa suspensão de solo:solução, de água e KCl 1M, na proporção de 1:2,5, após duas horas de contacto com agitação ocasional (Van Reeuwijk, 2002). O equipamento usado foi um potenciómetro *Inolab Level 1 WTW*.

*Matéria orgânica* - Foi seguido o procedimento de Walkley-Black para determinação do carbono (C) facilmente oxidável. Este método consiste numa digestão húmida da matéria orgânica do solo com uma mistura de dicromato de potássio e ácido sulfúrico durante 30 minutos. O dicromato residual é titulado com sulfato de ferro e o teor de matéria é estimado multiplicando a percentagem de carbono pelo fator 1,724, associado à suposição de que a matéria orgânica do solo contém cerca de 58% de C (Van Reeuwijk, 2002). Foi também determinado o teor de matéria orgânica pelo método gravimétrico, que consiste na incineração da amostra a 450°C durante 6 horas. O teor de matéria orgânica é determinado a partir da diferença de peso da amostra seca a 105°C e o peso das cinzas obtidas após incineração (Combs e Nathan, 1998).

*Fósforo e Potássio “assimiláveis”* - Estes elementos foram extraídos de acordo com o método de Egner-Riehm que consiste na adição de uma solução de lactato de amónio e ácido acético tamponizada a pH 3,5 aplicada a uma porção de solo na proporção solo: solução de 1:20, durante duas horas (MAP, 1977). Após filtração, o fósforo é determinado por espectrofotometria UV/VIS no comprimento de onda 882 nm, depois do desenvolvimento de cor pelo método do ácido ascórbico. Este método consiste na

formação de um complexo ácido fosfo-molibdénico que é reduzido a azul-fosfo-molibdénico em presença do ácido ascórbico (Van Reeuwijk, 2002). O equipamento utilizado foi um espectrofotómetro *UV/VIS T80 PG Instrument Lda*. O potássio é quantificado por fotometria de chama (MAP, 1977) num equipamento *Jenway*.

*Azoto kjeldahl* - Um grama de solo foi digerido com ácido sulfúrico na presença de um catalisador num bloco de digestão em alumínio à temperatura de 400 °C, durante 40 minutos. Findo o período de digestão, o tubo foi colocado num equipamento automático *Kjeltec TM 8400 Analyser* da marca *FOSS* e foi adicionada uma quantidade de hidróxido de sódio acompanhado de vapor de água. A amónia formada é arrastada na corrente de vapor e titulada com ácido clorídrico num vaso com uma solução recetora de ácido bórico e indicadores (verde de bromocresol e vermelho de metilo) (Bremner, 1996).

*Capacidade de troca* - Uma amostra de solo é percolada com uma solução de acetato de amónio tamponizada a pH 7 e os catiões  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$ , determinados no extrato filtrado, por espectrofotometria de absorção atómica (Van Reeuwijk, 2002) num equipamento *PYE Unicam PU 9100X*.

*Micronutrientes* - A extração dos micronutrientes do solo foi efetuado de acordo com a metodologia de Lakanen e Erviö (1971). Uma amostra de solo é agitada com uma solução constituída por acetato de amónio, ácido acético e EDTA, tamponizada a pH 4,65 numa relação solo: solução de 1:5. Após meia hora de contacto com agitação, a suspensão é filtrada e os micronutrientes cobre, ferro, zinco e manganês são determinados por espectrofotometria de absorção atómica. O boro é determinado numa extração própria com água fervente. Numa alíquota de extrato é adicionada uma solução de desenvolvimento de cor à base de azometina-H. A cor desenvolvida em função da concentração em boro é depois determinada num espectrofotómetro UV/VIS a 430 nm (Jones, 2001).

*Potencial de mineralização da matéria orgânica do solo* – Foram ainda utilizados métodos de extração química que fornecem informação sobre a disponibilidade potencial de azoto no solo. A finalidade destes procedimentos é a extração de azoto de frações facilmente mineralizáveis e com elevado significado biológico. Foram usadas as metodologias i) extração de azoto com KCl a quente e a frio, e ii) absorvância UV/VIS em extratos preparados com  $\text{NaHCO}_3$ .

i) Extração de azoto com KCl a quente e a frio

A uma quantidade de solo foi adicionada uma quantidade de KCl 2M numa relação de solo/solução de 1/4. Os recipientes com solo e KCl foram colocados numa estufa a 100°C durante 4 horas. Ao fim deste tempo deixou-se arrefecer as amostras, filtrou-se e, no extrato, determinou-se a concentração dos iões  $\text{NH}_4^+$ . Em paralelo procedeu-se da mesma forma sem introduzir as amostras na estufa e após filtração procedeu-se à determinação da concentração de iões  $\text{NH}_4^+$  no extrato frio. O potencial de  $\text{NH}_4^+$  libertado por mineralização, ou a quantidade de azoto amoniacal hidrolisável, encontrou-se pela diferença entre  $\text{NH}_4^+$  extraído a quente e a frio (Rodrigues, 2000).

A concentração de iões  $\text{H-NH}_4^+$  determinou-se pelo método do fenato que tem como princípio a formação de um composto de cor azul, indofenol, pela reação da amónia, hipoclorito e fenol, catalisado pelo nitroprussido de sódio (Clescerl *et al.*, 1998).

ii) Determinação da absorvância UV/VIS (205 e 260 nm) em extratos preparados com  $\text{NaHCO}_3^-$

Uma amostra de solo foi tratada com uma solução de  $\text{NaHCO}_3^-$  0,5M durante meia hora. Ao fim deste tempo a suspensão foi filtrada e avaliada a absorvância das amostras nos comprimentos de onda 205 e 260 nm num espectrofotómetro UV/VIS (Rodrigues, 2000).

*Determinação da concentração de iões fosfato e nitrato no solo, extraídos com as resinas de troca aniónica* - Os iões fosfato e nitrato foram determinados após eluição das resinas com HCl (ponto 6.4). Para a concentração dos iões fosfato foi utilizado o método do ácido ascórbico para o desenvolvimento de cor (Van Reeuwijk, 2002), já apresentado anteriormente. Para a determinação da concentração dos iões nitrato procedeu-se à leitura dos extratos no espectrofotómetro *UV/VIS T80 PG Instrument Lda*, na gama ultravioleta a 220 nm. Porque a matéria orgânica dissolvida também absorve a 220 nm e o ião nitrato não absorve a 275 nm, fez-se uma segunda medição a 275 nm para corrigir o valor de  $\text{NO}_3^-$  (Clescerl *et al.*, 1998).

### **6.5.2-Análise de plantas**

A biomassa proveniente da cultura do milho em campo (folhas e plantas inteiras) e das espécies cultivadas em vasos (nabiça e centeio) foi analisada para a composição elementar. A biomassa foi previamente seca a 65°C em estufa de ventilação forçada (*Memmert*). A matéria seca foi depois moída num moinho *Cyclotec* com um crivo de 1 mm de malha.

*Determinação da concentração em azoto* - Para a determinação da concentração em azoto foi pesado 1 grama de matéria seca num frasco de digestão para equipamentos Kjeldahl. A digestão e a leitura foram feitas pelos processos descritos no ponto anterior (6.5.1).

*Determinação da concentração em fósforo, potássio, cálcio, magnésio, cobre, ferro, zinco e manganês* - Uma quantidade de 0,25 g de matéria seca foi digerida num digestor por micro-ondas *MARS* na presença de ácido nítrico. Na solução obtida foi feita a determinação dos iões referidos pelas metodologias descritas no ponto anterior (6.5.1).

*Determinação da concentração em boro* - O boro foi determinada após incineração da amostra com óxido de cálcio e após a diluição das cinzas com ácido sulfúrico diluído. O desenvolvimento de cor foi feito pelo método da azometina (Jones, 2001).

### **6.6-Avaliação do teor de clorofila SPAD- 502**

O estado nutritivo do milho em campo foi monitorizado com um aparelho portátil (*SPAD-502 Chlorophyll meter*) que estima o teor de clorofila, medindo a transmitância da luz através das folhas (Blackmer e Schepers, 1994). O teor de clorofila é um bom indicador do estado nutritivo azotado, na medida em que a maior parte do N das células se encontra associado às moléculas de clorofila (Lopez-Cantarero *et al.*, 1994). As leituras foram efetuadas em 19 de julho e 16 de agosto nos estados fenológicos 39 e 65 da escala BBCH (Meier, 2001) já anteriormente descritos. As leituras foram tomadas no segundo terço das folhas a contar da base, escolhendo a folha oposta à primeira espiga.

## **6.7-Análise estatística dos resultados**

A análise dos resultados foi efetuada no programa estatístico JMP. Na análise estatística dos resultados procedeu-se à análise de variância. As médias com diferenças significativas foram separadas com o teste Tukey HSD ( $\alpha = 0,05$ ).

## 7-Resultados e discussão

### 7.1-Parâmetros químicos nas amostras de solos

Os resultados apresentados no quadro 1 mostram que não houve diferenças significativas nos valores de pH em H<sub>2</sub>O e KCl entre solos mantidos em monocultura de milho e com pastagem. As culturas da rotação parece não terem tido um efeito significativo no pH do solo, ou pelo menos os cinco anos de ocupação das folhas não foram suficientes para o efeito no pH ser significativo.

Os teores de matéria orgânica no solo revelaram diferenças significativas entre as duas situações culturais (quadro 1). O solo com pastagem apresentou os valores mais elevados na profundidade 0-10 cm (4,27 g kg<sup>-1</sup>) em comparação com o solo mantido em monocultura de milho (2,67 g kg<sup>-1</sup>). Os teores de matéria orgânica mais baixos que foram observados na folha em monocultura de milho devem-se preferencialmente ao facto do solo ser anualmente mobilizado. De acordo com Mesquita (2000), a mobilização acelera a decomposição da matéria orgânica, devido a uma mistura mais uniforme dos resíduos orgânicos com as partículas do solo e a um melhor arejamento, condições favoráveis à atividade dos microrganismos e a uma mais rápida degradação das substâncias orgânicas. Estudos desenvolvidos por Castro *et al.* (2009) e Kulthcouski *et al.* (2009) mostraram que, para elevar os teores de matéria orgânica num determinado solo, o melhor método é a inclusão de pastagens nas rotações, em parte devido à eliminação da mobilização do solo. Santos e Tomm (1999) explicam que há maiores possibilidades de se incorporar no solo mais matéria orgânica e alguns nutrientes (fósforo e potássio) quando os sistemas de rotações de culturas são mais diversificados. Segundo os mesmos autores, a quantidade de matéria orgânica vai decrescendo com a profundidade. De acordo com Rodrigues *et al.* (2010) o incremento dos resíduos depositados a partir dos sistemas radiculares e da deposição da parte aérea, conjugado com a deposição dos dejetos dos animais, pode aumentar o teor de matéria orgânica do solo. Importante para a manutenção de teores elevados de matéria orgânica no solo é o ritmo de decomposição dos substratos orgânicos, sendo este influenciado por vários fatores como temperatura, humidade, textura e reação do solo (Costa, 1995; Havlin *et al.* 2005; Leite, 2011).

O teor em fósforo (expresso em P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) foi também superior no solo da folha com pastagem, na profundidade 0-10 cm (80,73 mg kg<sup>-1</sup>), em comparação com a folha

mantida em monocultura de milho (50,46 mg kg<sup>-1</sup>). Na camada 10-20 cm não ocorreram diferenças significativas (quadro 1). Na camada 0-10 cm, o teor de fósforo foi significativamente mais elevado na parcela cultivada com pastagem. Santos e Tomm (2003) também obtiveram valores elevados na primeira camada, num estudo sobre a disponibilidade de nutrientes e teor de matéria orgânica. O maior teor de fósforo na camada superficial da parcela com pastagem pode dever-se à deposição dos dejetos dos animais e à imobilidade do elemento no solo ficando à superfície.

No caso do potássio, as concentrações foram mais elevadas na camada superficial mas sem diferenças significativas entre as duas situações culturais (quadro 1). Talvez a maior dinâmica da matéria orgânica à superfície possa explicar este resultado.

As amostras de solos provenientes da pastagem apresentaram maiores concentrações de nitratos em ambas as profundidades (35,84 e 29,58 mg kg<sup>-1</sup>) em relação à cultura de milho (19,16 e 16,38 mg kg<sup>-1</sup>) (quadro 1). O resultado deverá ser explicado pelo aumento do processo de mineralização e mobilidade do nutriente no solo.

**Quadro 1.** Algumas características químicas do solo no início do ensaio em amostras provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof (cm)	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCl)	MO (g kg <sup>-1</sup> )	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O (mg kg <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )
	0-10	5,82 a <sup>†</sup>	5,32 a	2,67 b	50,46 b	115,0 a	19,16 b
Monoc.	10-20	5,81a	5,32 a	2,70 b	26,80 c	57,0 b	16,38 b
	0-10	5,65 a	5,23 a	4,27 a	80,73 a	89,1 a	35,84 a
Past.	10-20	5,65 a	5,05 b	2,49 b	33,43 c	60,0 b	29,58 a

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ). Monoc. -Solo de milho 5 anos; Past.- Solo de pastagem

A análise às bases de troca, acidez de troca e capacidade de troca catiónica revelou diferenças significativas entre as diferentes proveniências das amostras de solo nos teores de cálcio, magnésio, potássio e capacidade de troca catiónica (quadro 2). Os

valores mais elevados de cálcio (18,18 g kg<sup>-1</sup>), bem como os valores mais elevados de magnésio (7,93 g kg<sup>-1</sup>), foram registados na pastagem na camada 0-10 cm. Estudos desenvolvidos por Santos *et al.* (2001) e Santos e Tomm (2003) registaram também valores superiores destes catiões na primeira camada. Esta diferença talvez se deva à maior atividade de mineralização dos substratos orgânicos no solo da parcela com pastagem. Como amonificação e nitrificação do azoto são processos acidificantes é possível que se tenha solubilizado o excesso de cálcio e magnésio que surge nas análises. Os valores mais elevados de potássio foram registados na folha de monocultura de milho na camada 0-10 cm (0,46 g kg<sup>-1</sup>) (valor médio de acordo com LQARS, 2006). É possível que este efeito seja devido à aplicação anual de fertilizantes, que foi feita na folha de milho. O valor mais elevado de capacidade de troca catiónica foi registado na pastagem na camada 0-10 cm (27,11 Cmol<sub>c</sub> kg<sup>-1</sup>). Este valor será devido ao contributo da matéria orgânica para o aumento da capacidade de troca catiónica (Varenes, 2003).

**Quadro 2.** Bases de troca, acidez de troca e capacidade de troca catiónica em amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof	Ca	Mg	K	Na	AT	CTC
	(cm)	----- (Cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> ) -----					
	0-10	14,63 bc <sup>†</sup>	6,57 b	0,46 a	0,20 a	0,15 a	22,10 bc
Monoc.	10-20	12,82 c	6,08 b	0,22 b	0,30 a	0,15 a	19,56 c
	0-10	18,18 a	7,93 a	0,31 b	0,44 a	0,25 a	27,11 a
Past.	10-20	17,17 ab	6,41 a	0,18 b	0,30 a	0,20 a	24,27ab

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

Relativamente aos micronutrientes ferro, manganês, zinco, cobre e boro apenas ocorreram diferenças significativas entre proveniências das amostras de solo nos teores em boro (quadro 3). Foram registados valores significativamente mais baixos na camada 10-20 cm da folha com pastagem. Os valores de boro no solo oscilaram entre 1,46 mg kg<sup>-1</sup> (valor alto de acordo com LQARS, 2006) (na pastagem, camada 0-10 cm e

milho, camada 10-20 cm) e 0,86 mg kg<sup>-1</sup> (valor médio) (pastagem, camada 10-20 cm). Talvez pelo fato da camada 10-20 cm ser uma zona de absorção e menos de deposição de resíduos orgânicos e também pelo fato do solo da pastagem não ser mobilizado se tenha gerado esta distribuição do boro.

**Quadro 3.** Micronutrientes em amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof	Fe	Mn	Zn	Cu	B
	(cm)	----- mg kg <sup>-1</sup> -----				
	0-10	189,0 a <sup>†</sup>	164,8 a	4,72 a	7,84 a	1,28 a
Monoc.	10-20	193,3 a	178,3 a	5,00 a	8,03 a	1,46 a
	0-10	211,8 a	161,5 a	6,65 a	7,49 a	1,46 a
Past.	10-20	213,5 a	157,5 a	3,84 a	7,87 a	0,86 b

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

## 7.2-Carbono orgânico e azoto total

O carbono orgânico no solo apresentou diferenças significativas quer determinado pelo método Walkley-Black quer determinado por incineração. Pelo método Walkley-Black, o valor mais elevado foi registado na folha com pastagem na camada 0-10 cm (22,38 g kg<sup>-1</sup>). A determinação do carbono orgânico por incineração apresenta o mesmo padrão de resultados, sendo o valor mais elevado obtido na folha de pastagem na profundidade 0-10 cm (50,15 g kg<sup>-1</sup>) (quadro 4). Relativamente ao azoto total no solo foram registadas diferenças significativas entre as formas de ocupação do solo. Os valores mais elevados foram observados na parcela de pastagem (1,94 g kg<sup>-1</sup>) na profundidade 0-10 cm em comparação com a monocultura de milho (1,56 g kg<sup>-1</sup>). Na camada mais profunda 10-20 cm, não ocorreram diferenças significativas em ambas as situações culturais. No entanto, a quantidade nesta camada foi significativamente inferior à quantidade da camada superficial em ambos os casos.

Outro aspeto a realçar é que nos solos da pastagem gerou-se um decréscimo no carbono orgânico com a profundidade, o que está de acordo com o perfil de matéria orgânica em profundidade neste tipo de ocupação do solo (Brady, 1990). Nos solos cultivados com milho em monocultura o teor de carbono orgânico foi semelhante nas duas profundidades. Este resultado deve estar relacionado com a homogeneização da matéria orgânica no perfil promovida pelas mobilizações.

**Quadro 4.** Carbono orgânico determinado pelos métodos Walkley-Black e incineração e azoto total (Kjeldahl) em amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 e 10-20 cm de folhas cultivadas com monocultura de milho e pastagem durante cinco anos.

		Carbono orgânico		N kjeldahl	C/N
Prof (cm)		Walkley-Black	Incineração	g kg <sup>-1</sup>	
	0-10	15,54 b <sup>†</sup>	33,85 b	1,56 b	21,94 b
Monoc.	10-20	15,71 b	33,17 b	1,40 c	23,69 ab
	0-10	22,38 a	50,15 a	1,94 a	25,87 a
Past.	10-20	14,50 b	33,38 b	1,40 c	24,36 ab

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

Os cinco anos de pastagem originaram um incremento significativo no teor de matéria orgânica do solo relativamente ao cultivo de milho em monocultura tal como já tinha sido observado por Arrobas *et al.* (2013). Para os autores, o aumento de matéria orgânica é explicado pelo fato do solo com pastagem deixar de ser mobilizado e ter aumentado o pisoteio dos animais, o que diminui o arejamento do solo e, conseqüentemente, limita a atividade microbiana. Também seria expectável encontrar mais azoto orgânico na camada superficial. Pillon *et al.* (2011) referem que os teores de carbono orgânico e azoto orgânico vão decrescendo em profundidade no solo. Neste estudo, isso ocorreu em ambas as parcelas. Dado a natureza dos resíduos de pastagem, os valores são mais elevados do que na parcela de milho.

O aumento do teor de matéria orgânica no solo contribuiu significativamente para o aumento do teor de N orgânico do solo, determinado pelo método kjeldahl. Para este resultado deverá ter contribuído a componente de leguminosas incluídas na pastagem, já

que estas espécies apresentam tecidos mais ricos em azoto. Os valores de N são significativamente mais elevados que os verificados na camada 0-10 cm de milho. Em ambas as camadas 10-20 cm os resultados foram significativamente inferiores, provavelmente devido à menor proporção de resíduos orgânicos nesta camada.

De acordo com Rodrigues (2000) e Varennes (2003), o ritmo de decomposição do substrato orgânico depende da razão C/N. Havlin *et al.* (2005) consideram que um valor de C:N acima de 20:1 significa imobilização de N mineral no solo. No entanto, o departamento de agricultura dos Estados unidos (USDA, 2011) indica o valor de 24:1 como um valor adequado para a atividade microbiana do solo e valores inferiores significam mineralização líquida de N. De acordo com os valores de C/N apresentados no quadro 4, estes valores deverão estar associados a mineralização líquida de N, confirmado pelos valores de N exportados pelas culturas de nabiça e centeio apresentado no quadro 6.

### **7.3-Indicadores laboratoriais de disponibilidade de azoto**

Como indicadores químicos laboratoriais de disponibilidade de azoto utilizaram-se absorvância de extratos de  $\text{NaHCO}_3$ , a extração de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  com soluções salinas de KCl a frio, a extração de  $\text{NH}_4^+$  com solução salina de KCl a quente, o  $\text{NH}_4^+$  hidrolisado (diferença de  $\text{NH}_4^+$  extraído com KCl a quente e a frio) e azoto mineral ( $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ) extraídos a frio.

De todos os indicadores utilizados apenas ocorreram diferenças significativas para a concentração de nitratos nos extratos obtidos com KCl a frio, na concentração de  $\text{NH}_4^+$  nos extratos obtidos com KCl a quente e no azoto mineral. Os valores mais elevados foram registados nas amostras de solo provenientes da camada 0-10 cm da folha com pastagem (quadro 5).

Esta tendência para os indicadores químicos de disponibilidade potencial de azoto mostrarem valores mais elevados nas amostras de solo provenientes da camada 0-10 cm da folha com pastagem, pode significar que há maior substrato orgânico com significado biológico, isto é, mais facilmente mineralizável. De certa forma, reforça a informação relativa ao aumento de fertilidade do solo nas folhas com pastagem em concordância com o aumento da matéria orgânica que foi verificado.

**Quadro 5.** Azoto inorgânico libertado por vários métodos químicos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos (F= Frio; Q= Quente).

	Prof	NaHCO <sub>3</sub>	KCl F (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	KCl Q (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	KCl Q-F (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	KCl F (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)	KCl F (N mineral)
	(cm)	----- mg kg <sup>-1</sup> -----					
Monoc.	0-10	0,87 a <sup>†</sup>	7,9 a	17,7 b	9,8 a	3,6 b	11,4 b
	10-20	0,89 a	8,9 a	17,1 b	8,2 a	3,9 b	12,9 b
Past.	0-10	0,74 a	11,0 a	21,7 a	10,7 a	8,3 a	19,3 a
	10-20	0,80 a	8,3 a	17,6 b	9,2 a	7,2 a	15,5 a

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

#### 7.4-Indicadores biológicos de disponibilidade de azoto

Como indicadores biológicos da disponibilidade de azoto no solo utilizaram-se a biomassa produzida e o azoto exportado por plantas nitrófilas (nabiça e centeio) cultivadas em vasos, usando amostras de solos provenientes das parcelas de milho e pastagem nas profundidades 0-10 cm e 10-20 cm.

A produção da matéria seca variou entre 1,72 e 4,27 g/vaso na cultura de nabiça e 2,63 e 4,82 g/vaso na cultura de centeio. Os valores mais elevados foram registados nas amostras provenientes da pastagem na profundidade 0-10 cm e os mais baixos nas amostras provenientes da folha de milho na profundidade 0-10 cm (quadro 6).

A concentração de azoto nos tecidos seguiu a tendência da produção de matéria seca, com valores mais elevados nos solos provenientes da profundidade 0-10 cm da pastagem. O efeito não é contudo tão evidente quanto a biomassa, devido ao fenómeno de diluição, isto é, mais nutriente disponível estimula a produção de mais matéria seca mantendo-se a concentração do nutriente nos tecidos baixa.

Quando se avalia o azoto exportado por nabiça e centeio, as diferenças significativas acentuam-se, devido ao efeito multiplicativo da produção de matéria seca pela concentração de azoto na matéria seca. Assim, no caso da nabiça, as plantas recuperaram 81,91 mg N/vaso a partir das amostras de solo da camada 0-10 cm da

pastagem e apenas 31,42 mg N/vaso nas amostras de solo provenientes da camada 0-10 cm da cultura do milho. No caso do centeio, estes valores foram respetivamente 59,42 e 29,71 mg N/vaso.

**Quadro 6.** Produção de matéria seca (PMS), concentração de azoto na planta (CNT) e azoto recuperado na biomassa aérea (N Rec) em nabiça e centeio cultivados em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof (cm)	Nabiça			Centeio		
		PMS (g vaso <sup>-1</sup> )	CNT (g kg <sup>-1</sup> )	N Rec (mg vaso <sup>-1</sup> )	PMS (g vaso <sup>-1</sup> )	CNT (g kg <sup>-1</sup> )	N Rec (mg vaso <sup>-1</sup> )
Monoc.	0-10	1,72 c <sup>†</sup>	18,32 ab	31,42 c	2,63 c	11,27 b	29,71 b
	10-20	2,45 b	16,75 b	41,09 bc	3,14 b	10,73 b	33,67 b
Past.	0-10	4,27 a	19,15 a	81,91 a	4,82 a	12,37 a	59,42 a
	10-20	2,78 b	17,60 ab	48,57 b	2,95 bc	11,38 b	33,47 b

<sup>†</sup>Médias seguidas de mesma letra na coluna não são significativamente diferentes pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0.05$ ).

Na matéria seca produzida nos ensaios em vasos foi determinada a concentração de diversos outros nutrientes, tendo a informação sido organizada na forma de macronutrientes (fósforo, potássio, cálcio e magnésio) e micronutrientes (ferro, manganês, zinco, cobre e boro). Os resultados apresentados dizem respeito à exportação de nutrientes na matéria seca de nabiça e centeio, que resulta da multiplicação da matéria seca produzida pela concentração de nutrientes nos tecidos.

As plantas de centeio cultivadas em solos provenientes da profundidade 0-10 cm de pastagem continham na matéria seca mais fósforo, potássio, cálcio e magnésio que as plantas cultivadas em solos provenientes da monocultura de milho (quadro 7). A explicação para este resultado parece simples. O azoto é sem dúvida, o fator limitante ao crescimento das plantas no vaso. Isto é, a quantidade de biomassa produzida foi limitada pelo azoto disponível e a quantidade de outros nutrientes absorvidos (não limitantes) foi proporcional à biomassa produzida.

**Quadro 7.** Macronutrientes recuperados na cultura de centeio cultivado em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof (cm)	P ----- mg/vaso	K ----- mg/vaso	Ca ----- mg/vaso	Mg ----- mg/vaso
Monoc.	0-10	8,5 b <sup>†</sup>	10,0 b	7,6 c	7,7 c
	10-20	8,9 b	11,4 b	9,6 bc	9,9 bc
Past.	0-10	10,9 a	15,6 a	18,0 a	18,3 a
	10-20	5,8 c	10,7 b	10,2 b	10,4 b

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

No caso dos micronutrientes ferro, zinco e boro manteve-se a tendência verificada para os macronutrientes (quadro 8). Manganês e cobre saíram do padrão, sem que seja fácil encontrar explicação para o sucedido.

**Quadro 8.** Micronutrientes recuperados na cultura de centeio cultivado em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof (cm)	Fe ----- mg/vaso	Mn ----- mg/vaso	Zn ----- mg/vaso	Cu ----- mg/vaso	B ----- mg/vaso
Monoc.	0-10	1,52 b <sup>†</sup>	0,79 b	0,02 bc	0,13 a	0,05 b
	10-20	3,40 ab	1,03 a	0,02 ab	0,18 a	0,06 b
Past.	0-10	6,24 a	0,78 b	0,03 a	0,17 a	0,08 a
	10-20	2,62 ab	0,77 b	0,01 c	0,15 a	0,05b

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ )

A quantidade de macronutrientes presentes na matéria seca da nabiça seguiu exatamente o padrão do centeio, com valores significativamente mais elevados nas plantas cultivadas em solos provenientes da camada superficial da folha da pastagem (quadro 9). As razões terão sido as mesmas, já apresentadas para os resultados de centeio.

**Quadro 9.** Macronutrientes recuperados na cultura de nabiça cultivada em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof (cm)	P ----- mg/vaso	K ----- mg/vaso	Ca ----- mg/vaso	Mg ----- mg/vaso
Monoc.	0-10	5,4 b <sup>†</sup>	45,8 b	23,5 c	8,7 b
	10-20	6,2 b	47,8 b	31,7 bc	14,0 b
Past	0-10	13,5 a	87,7 a	60,4 a	20,9 a
	10-20	7,4 b	54,0 b	38,0 b	14,2 b

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

**Quadro 10.** Micronutrientes recuperados na cultura de nabiça cultivada em vasos a partir de amostras de solo provenientes das profundidades 0-10 cm e 10-20 cm de folhas previamente cultivadas com pastagem temporária e monocultura de milho durante cinco anos.

	Prof (cm)	Fe ----- mg/vaso	Mn ----- mg/vaso	Zn ----- mg/vaso	Cu ----- mg/vaso	B ----- mg/vaso
Monoc.	0-10	5,43 b <sup>†</sup>	0,27 b	0,09 c	0,03 b	0,06 c
	10-20	17,75 ab	0,64 ab	0,16 b	0,05 ab	0,09 b
Past.	0-10	19,40 a	0,75 a	0,24 a	0,07 a	0,15 a
	10-20	17,88 ab	0,61 ab	0,15 bc	0,05 ab	0,09 b

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

No caso da nabiça a quantidade de micronutrientes extraídos na biomassa segue o padrão de valores mais elevados na camada 0-10 cm da pastagem de forma mais coerente do que se tinha verificado para o centeio (quadro 10).

### 7.5-Membranas de troca aniónica

Foram usadas membranas de troca aniónica para monitorar o teor de nitratos e fosfatos no solo dos vasos. As membranas foram introduzidas no solo por períodos de quatro dias. Nestes ensaios o procedimento repetiu-se duas vezes em novembro de 2013 e março de 2014. Os resultados são apresentados no quadro 11.

A metodologia pretendia colher informação que auxiliasse a perceber o ritmo de mineralização da matéria orgânica e a forma como os nutrientes azoto e fósforo iam ficando disponíveis para as plantas. Os resultados apresentaram, contudo, grande variabilidade experimental e uma tendência difícil de explicar. Contudo, no caso dos nitratos e na data de novembro de 2013 os valores mais elevados ocorreram nos vasos cujos solos foram provenientes da profundidade 0-10 cm da pastagem. No caso do fósforo e para a mesma data, verificou-se maior quantidade deste nutriente em formas disponíveis para as plantas na camada 0-10 cm em ambas as parcelas.

**Quadro 11.** Concentração de fosfatos e nitratos nos extratos obtidos com membranas de troca aniónica inseridas em vasos com terras provenientes da profundidade 0-10 cm e 10-20 cm de parcelas cultivadas com pastagem e monocultura de milho durante cinco anos.

	Solo	Novembro 2013		Março 2014	
		Prof (cm)	P (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	P (mg/L)
Monoc.	0-10	1,16 a <sup>†</sup>	4,62 a	0,31 b	107,51 b
	10-20	0,64 b	5,65 a	2,56 a	155,09 a
Past.	0-10	1,07 ab	6,25 a	2,46 a	149,18 ab
	10-20	0,59 b	5,80 a	2,36 a	108,77 b

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

## 7.6-Indicadores do estado nutritivo da planta de milho

As leituras feitas com o medidor de clorofila portátil SPAD-502 e as análises foliares laboratoriais, mostraram diferenças significativas entre o estado nutritivo azotado das plantas cultivadas na folha de monocultura de milho e na pastagem (quadro 12). Em 2012, nas duas datas efetuadas, os valores de clorofila SPAD do milho foram 45,2 e 52,9 g kg<sup>-1</sup> na folha de pastagem e 44,9 e 42,1g kg<sup>-1</sup> na folha da monocultura. Em 2013, os valores SPAD foram 57,4 e 45,8 g kg<sup>-1</sup> na folha da pastagem e 56,3 e 42,4 g kg<sup>-1</sup> na folha de monocultura de milho.

A concentração de azoto nas folhas confirmou o padrão observado com o aparelho SPAD, isto é, os valores de concentração de azoto nas folhas mais elevados foram registados nas plantas cultivadas na folha da pastagem. Em 2012, nas duas datas de amostragem, registaram-se os valores 31,8 e 23,0 g kg<sup>-1</sup> nas plantas cultivadas na folha da pastagem e 27,5 e 15,4 g kg<sup>-1</sup> na folha de monocultura de milho.

Os resultados apresentam-se claros relativamente à maior fertilidade do solo, sobretudo à maior disponibilidade de azoto, da folha mantida com pastagem.

**Quadro 12.** Valores SPAD e concentrações de azoto nas folhas (CNF) em milho cultivado após cinco (2012) e seis (2013) anos de monocultura de milho e no primeiro (2012) e segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem temporária.

	2012				2013		
	SPAD <sup>1</sup>	SPAD <sup>2</sup>	CNF <sup>1</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	CNF <sup>2</sup> (g kg <sup>-1</sup> )	SPAD <sup>3</sup>	SPAD <sup>4</sup>	CNF <sup>4</sup> (g kg <sup>-1</sup> )
Monoc.	44,9 a <sup>†</sup>	42,1 b	27,5 b	15,4 b	56,3 a	42,4 b	15.2 b
Pasta.	45,2 a	52,9 a	31,8 a	23,0 a	57,4 a	45,8 a	16.2 a

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

<sup>1,2,3,4</sup> Estados fenológicos do milho: <sup>1</sup>4 Julho 2012 (V8, 8 folhas); <sup>2</sup>31 Julho 2012 (VT, bandeira); <sup>3</sup>19 Julho 2013 (V11, 11 folhas); <sup>4</sup>16 Agosto 2013 (R1, espigamento).

O medidor de clorofila SPAD-502 tem sido utilizado com sucesso em diversas outras culturas como indicador do estado azotado (Ferreira, 2008; Pereira *et al.*, 2009), na medida em que a maior parte do azoto das células se encontra associado à molécula

de clorofila (Arrobas, *et al.*, 2013). Os valores SPAD registados na folha da pastagem podem ser considerados elevados, já que para as datas consideradas estão ao nível dos valores que se encontram publicados para a cultura mesmo quando se utilizam fertilizantes industriais. Assim, os resultados indicam que a *pool* de N orgânico do solo começou a sofrer mineralização líquida logo que o solo começou a ser mobilizado para a preparação da sementeira do milho do ensaio.

### 7.7-Produção de matéria seca e azoto recuperado pela cultura de milho

Em 2012, no primeiro ano de cultivo de milho do ensaio, a produção de matéria seca foi significativamente mais elevada na folha que tinha tido pastagem (15,3 t ha<sup>-1</sup>) comparativamente com a que tinha tido milho (8,8 t ha<sup>-1</sup>). A concentração de azoto nos tecidos também foi maior nas plantas cultivadas na parcela que tinha tido pastagem. Em consequência, as plantas cultivadas na folha que esteve com pastagem recuperaram 175,4 kg N ha<sup>-1</sup> na biomassa aérea enquanto as plantas cultivadas onde esteve milho recuperaram apenas 68,0 kg N ha<sup>-1</sup> (quadro 13).

**Quadro 13.** Produção de matéria seca (PMS), concentração de azoto nos tecidos (CNT) e azoto recuperado na biomassa aérea (NRec) em milho cultivado após cinco (2012) e seis (2013) anos de monocultura de milho e no primeiro (2012) e segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem.

	2012			2013		
	PMS (t ha <sup>-1</sup> )	TNC (g kg <sup>-1</sup> )	NRec (kg ha <sup>-1</sup> )	PMS (t ha <sup>-1</sup> )	TNC (g kg <sup>-1</sup> )	NRec (kg ha <sup>-1</sup> )
Monoc.	8,8 b <sup>†</sup>	7,8 b	68,0 b	8,4 b	6,0 b	50,3 b
Past.	15,3 a	11,5 a	175,4 a	10,0a	7,8 a	78,3 a

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

Em 2013, no segundo ano em que se cultivou milho nas folhas que dois anos antes estavam com milho e pastagem, os resultados tiveram a mesma tendência que em 2012.

Contudo, produção de milho, concentração de azoto nos tecidos e azoto exportado apresentaram valores mais baixos. Os valores da produção de matéria seca foram de 10,0 e 8,4 t ha<sup>-1</sup>, respetivamente na parcela que tinha estado com pastagem e milho em monocultura. Quanto aos valores de azoto exportado foram de 78,3 e 50,3 kg N ha<sup>-1</sup>, respetivamente nas plantas cultivadas nas folhas que tinham estado com pastagem e milho

As diferenças registadas na produção de milho, concentração de azoto nos tecidos e azoto exportado justificam-se pelo incremento da fertilidade do solo durante os cinco anos com pastagem. Arrobas *et al.* (2013) justificam que a introdução de pastagens na rotação melhora a fertilidade do solo pelo fato das leguminosas fixarem azoto atmosférico e aumentarem a produção de biomassa e consequentemente os resíduos depositados no solo. Por outro lado, os dejetos dos animais exercem também um efeito importante e, como já se referiu, o fato de não se ter mobilizado o solo restringe a degradação da matéria orgânica e a perda progressiva de nutrientes. Varennes (2003) salienta que a introdução de leguminosas assegura a entrada adicional de azoto. Segundo Filho e Spagnollo (2013) as práticas de monocultura contribuem para a degradação da estrutura do solo e o fomento de doenças e pragas nas culturas, o que pode afetar no rendimento da produção.

### **7.8-Exportação de outros nutrientes na cultura de milho**

Os macronutrientes fósforo, potássio, cálcio e magnésio exportados na biomassa aérea da cultura do milho não diferiram significativamente entre as plantas cultivadas na folha da pastagem e do milho, embora tendencialmente os valores tenham sido superiores nas plantas cultivadas na folha da pastagem (quadro 14). De acordo com Gonzaga (2009), a rotação de culturas contribui para manter o equilíbrio de nutrientes no solo e aumentar a sua fertilidade.

**Quadro 14.** Exportação de macronutrientes na matéria seca de milho cultivado após seis (2013) anos de monocultura de milho e no segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem temporária.

	P	K	Ca	Mg
2013	----- kg ha <sup>-1</sup> -----			
Monoc.	13,5 a <sup>†</sup>	71,1 a	18,7 a	33,0 a
Past.	14,1 a	68,4 a	19,7 a	46,2 a

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

Também a quantidade de micronutrientes exportados na biomassa aérea do milho não diferiu entre plantas cultivadas nas folhas onde previamente esteve pastagem e milho em monocultura (quadro 15). Assim, parece que a grande vantagem da introdução das pastagens temporárias na rotação se deve ao aumento da fertilidade do solo que resulta do incremento do teor de matéria orgânica do solo e do azoto disponível. Este azoto tem origem na fixação biológica pelas leguminosas da pastagem e pela reciclagem do azoto no sistema através das fezes e urina dos animais.

**Quadro 15.** Exportação de micronutrientes na matéria seca de milho cultivado após seis (2013) anos de monocultura de milho e no segundo (2013) anos após cinco anos de uma pastagem temporária.

	Cu	Fe	Zn	Mn	B
2013	----- g ha <sup>-1</sup> -----				
Monoc.	68,8 a	697,9 b	396,4 a	590,6 a	51,5 a
Past.	78,6 a	1055,4 a	373,6 a	470,7 a	58,7 a

<sup>†</sup>Médias seguidas da mesma letra na coluna não são significativas pelo teste Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ).

## **8-Conclusões**

Em síntese, a introdução de uma pastagem temporária na rotação parece ter melhorado substancialmente a fertilidade do solo.

Durante os cinco anos, o solo mantido sob pastagem foi o que originou maiores teores de matéria orgânica na camada superficial comparativamente com o solo em monocultura de milho. Na pastagem, o teor de carbono orgânico decresceu com o aumento da profundidade, enquanto na parcela cultivada com milho em monocultura o teor de carbono orgânico foi semelhante nas duas profundidades.

O estado nutritivo azotado do milho instalado no campo foi superior na folha previamente cultivada com pastagem em comparação com a folha cultivada com monocultura de milho. Estas diferenças na disponibilidade de azoto no solo também foram comprovadas através das análises laboratoriais realizadas, designadamente: azoto kjeldahl; extração química de azoto amoniacal e nítrico com KCl; e membranas de troca aniónica. As leituras feitas com o aparelho portátil SPAD-502 e os ensaios em vasos forneceram informação no mesmo sentido.

A produção de milho, centeio e nabiça foram significativamente superiores na folha que teve pastagem em comparação com a folha mantida com monocultura de milho.

Os resultados deste estudo, bem como de muitas outras experiências, resultados em todo mundo mostraram, que a sucessão contínua de uma cultura na mesma parcela pode resultar numa diminuição no rendimento.

## 9-Referências bibliográficas

- Agroconsultores & Coba. (1991). *Carta dos solos, carta do uso actual da terra e carta da aptidão da terra no Nordeste de Portugal*. Lisboa. UTAD, Vila Real.
- Arrobas, M. (2000). *Fraccionamento do fósforo em solos de Portugal. Sua relação com a fertilidade do solo*. Tese de Doutoramento, UTAD, Vila Real.
- Arrobas, M., Claro, A. M., Ferreira, I. Q., & Rodrigues, M. A. (2013). *Pastagens temporárias na rotação como forma de promover a fertilidade do solo*. *Pastagens e Forragens*, 32/33: 143-156.
- Black, C. (1992). *Soil fertility evaluation and control*. Lewis Publisher.
- Blackmer, T. M., & Schepers, J. S. (1994). *Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn*. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25: 1791-1800.
- Brady, N. (1990). *The nature and properties of soils*. 10<sup>th</sup> ed, Macmillan Publishing company, N. Y.
- Bremner, J. M. (1996). *Nitrogen – Total*. In: *Methods of Soil Analysis. Part 3-Chemical Methods*. SSSA Book Series: 5. p. 1085- 1121.
- Camargo, O. D., Moniz, A., Jorge, J., & Valadares, J. (2009). *Métodos de Análise Química, Mineralógica e Física de Solo do Instituto Agronômico de Campinas*. Ciências Agrárias. Boletim técnico 106:1-77. Acesso: 2014-01-15, Disponível em <http://www.iac.sp.gov.br/publicacoes/porassunto/pdf/Boletim106.pdf>.
- Castro, C., Coutinho, J., & Moreira, N. (2009). *Cereais em rotações de sequeiro. Evolução dos teores de azoto inorgânico do solo*. *Rev.Cien. Agrárias*, 32(2):43-55.
- Castro, C., Coutinho, J., Moreira, N., & Crespi, A. (2007). *Produção de trigo e triticales em rotações de sequeiro*. *Rev. Cien. Agrárias* . Lisboa, 31 (1): 103-116.
- Clescerl, L., Greenberg, A. E., & Eaton, A. D. (1998). *Standard Methods for Examination of Water & Wastewater* (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater) (20 ed.). APHA, AWWA, WEF.
- Combs, S. M., & Nathan, M. V. (1998). *Soil Organic Matter In Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region*. *North Central*

*Regional Research Publication n° 221*. Missouri Agricultural Experiment Station SB 1001.

Costa, J. B. (1995). *Caracteriação e constituição do solo (5ª ed.)*. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian.

Diehl, R. (1989). *Agricultura Geral (2ª ed.)*. Porto, Portugal: Clássica Editora.

Èliard, J. L. (1979). *Manual Geral de Agricultura (2ª ed.) Mira-Sintra, Portugal*: Publicações Europa-América. Lda.

Favoretto, C. M. (2007). *Caracterização da orgânica humificada de um latossolo distrofico através da espectroscopia de fluorescência induzida por laser*. Tese de Mestrado, UEPG/PR, Pós- Graduação e Química Aplicada, Ponta Grossa.

Favoretto, C. M., Gonçalves, D., Milori, D. M., Rosa, J. A., Leite, W. C., Brinatt, A. M., et al. (2008). *Determinação da humificação da Matéria Orgânica de um Latossolo e de suas funções Organo- minerais*. Universidade Estadual de Ponta Grossa,. *Quim. Nova* 31(08): 1-3.

Ferreira, J. (2009). *As bases da agricultura biológica. Tomo 1- Produção vegetal*. J. Ferreira (Coordenador). EDIBIO, Edições.

Ferreira, I. A. (2008). *Adaptação de e Inverno de colza às condições ecológicas de Trás-os-Montes*. Tese de Mestrado, IPB, Bragança.

Filho, J. A. W., & Spagnollo, E. (2013). *Sistemas de cultivos e doses de nitrogénio na sanidade e no rendimento do milho*. *Cien. Rural*, vol. 42, n 2: 199-205.

Fontona, A. (2009). *Fracionamento da matéria orgânica e caracterização dos ácidos húmicos e sua utilização nos sistemas brasileiros e classificação dos solos*. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Agronomia, Seropédia. Acesso: 2013-12-23, Disponível: [http://www.ia.ufrj.br/cpacs/arquivos/teses\\_dissert/65\\_Ademir\\_Fontana\\_\(DO2009\).pdf](http://www.ia.ufrj.br/cpacs/arquivos/teses_dissert/65_Ademir_Fontana_(DO2009).pdf).

Gianello, C., & Bremner, J. M. (1986). *Comparison of chemical methods of assessing potentially available organic nitrogen in soil*. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.*, 17:216-236.

- Gonzaga, R. L. (2009). *Efeito dos sistemas de preparo e manejo do solo, culturas de coberturas, rotação nas propriedades físico-químico do solo e na cultura do milho*. Tese de mestrado em Unesp -SP.
- Hardarson G, Atkins C. (2003). *Optimising biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems*. Plant Soil 252: 41–54.
- Havlin, J. L., Beaton, J. D., Tisdale, S. L. & Nelson, W. L. (2005). *Soil fertility: an introduction to nutrient management*. Pearson Prentice Hall<sup>™</sup>.
- INIDA. (1997). *Manual de Fertilidade de Solo e Fertilização das Culturas*. São Jorge dos Orgãos, Cabo Verde.
- Jones, J. B. Jr., Ecr, H. V., & Voss, R. (1990). *Plant analysis as an aid in fertilized corn and grain Sorghum*. (p. 521-562) in: Soil testry and plant analysis. 3th ed. Westerman, R. L. (ed). SSSA, Boor, series nº 3.
- Jones, J. J. (2001). *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. . London, New York, Wachington, DC: CRC Press, Boca Raton.
- Kluthcouski, J., Oliveira, P., & Aidar, H. (2009). *Rotação com pastagem é alternativa para o sistema de plantio direto*. Visão Agrícola, vol .6, n. 9: 21-24.
- Knox, O. G. G., Leake, A. R.; Walker, R. L., Edwards, A. C. & Watson, C. A. (2011). *Revisiting the multiple benefits of historical crop rotations within contemporary UK agricultural systems*. J. Sustain. Agr. 35: 163-179.
- Lakanen, E., & Ervio, R. (1971). *A comparison of eight extractants for the determination of plant available micronutrients in soils*. *Accta Agr. Fenn*(123), 223-232.
- Leite, M. M. (2011). *Impactos dos incêndios nas propriedades dos solos em áreas de montanha sob coberto de matos*. Tesse de Mestrado. IPB- Portugal.
- Lopez-Cantarero, I., Lorente, F. A., & Romero, L. (1994). *Are chlorophylls good indicators of nitrogen and phosphorus levels*. J. Plant Nutr. 17: 979-990.
- LQARS. (2006). *Manual de fertilização das culturas*. Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Pescas, Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas.
- MAP. (1977). *Ministério da agricultura e pescas*.

- Meier, U. (2001). *Growth stages of mono-and dicotyledonous plants*. BBCH Monographs, 2nd edition. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. BBCH publications, Germany.
- Melsted, S. W & Peck, T. R. (1977). *The Mitscherlich-Bray growth function*. In: Peck, TR, Cope, JT and Whitney, DA (Eds) *Soil Testing: Correlating and interpreting the analytical results*. p.1-18. ASA Spec. Publ. 29 Madison.
- Mesquita, C. M. C. (2000). *Influência da mobilização dos solos nas características físicas e químicas da camada superficial do solo*. Tese de Licenciatura. IPB-Bragança.
- Monday, T. A., Foshee, W. G., Blythe, E. K., Dozier, W. A., Wells, L.W., Sibley, J. L., & Brown, J. E. (2013). *Nitrogen Requirements for Sweetpotato Following a Crimson Clover Cover Crop*. International Journal of Vegetable Science, 19:78–82.
- Moreira, N. (2002). *Agronomia das forragens e pastagens*. (S. Editorial, Ed.) Vila Real, Portugal.
- Perdigão, A., Coutinho, J., & Moreira, N. (2011). *Potencialidade das leguminosas forrageiras anuais como fonte de azoto na agricultura biológica*. Rev. Cien. Agrárias, vol.34(2) :142-153.
- Pereira, A., Rodrigues, M. Â., & Arrobas, M. (2009). *Avaliação da libertação de azoto a partir de correctivos orgânicos utilizando membranas de troca anionicas e um medidor de clorofila SPAD-502*. I & II Congresso Ibérico da Ciência do Solo. Lisboa., 31 (1) :1-44.
- Pillon, C. N., Santos, D. D., & Lima, C. L. ( 2011). *Carbono e nitrogénio de um solo argilossolo vermelho sob floresta, pastagem e mata nativa*. Cien. Rural, Vol. 41 (3) : 448-452.
- Pirhofer-Walzl, K., Rasmussen, J., Høgh-Jensen, H., Eriksen, J., Søgaard, K., & Rasmussen, J. (2012). *Nitrogen transfer from forage legumes to nine neighboring plants in a multi-species grassland*. Plant Soil 350:71–84.
- Power, J. F. (1990). *Legumes and crop rotations*. In Francis, C. A.; Flora, C. B.; KING, L. D. (Eds.). Sustainable agriculture in temperate zones. John Wiley & Sons, Inc., NY, USA. p. 178-204.

- Qian, P., Schoenau, J. J. & Huang, W. Z. (1992). *Use of ion exchange membranes in routine soil testing*. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 23:1791–1804.
- Qian, P. & Schoenau, J. J. (1995). *Assessing nitrogen mineralization from soil organic matter using anion exchange membranes*. Fertilizer Research. 40: 143-148.
- Quitambo, J. M., & Aguiar, P. R. (2010). *Diagnostico do manejo do cultivo de milho (Zea mays L) no Municipio do Sumbe. Estudo de Caso*. Tese de Bacharelato em Agronomia, Instituto Superior Politécnico do K-Sul, Sumbe /Angola.
- Rodrigues, M. Â. (1997). *Análise de plantas: Potencialidades e limitações*. Série Simiários Nº 5. Escola Superior Agrária, Fitotécnia e Engenharia Rural, Bragança.
- Rodrigues, M. Â. (2000). *Gestão do azoto na cultura da batata: estabelecimento de indicadores do estado nutritivo das plantas e da disponibilidade de azoto no solo*. Tese de Doutoramento, UTAD, Vila Real.
- Rodrigues, M. Â., Gomes, V., Dias, L. G., Pires, J., Aguiar, C.F. & Arrobas, M. (2010). *Evaluation of soil nitrogen availability by growing tufts of nitrophilic species in an intensively grazed biodiverse legume-rich pasture*. Spanish Journal of Agricultural Research 8 (4): 1058-1067.
- Rodrigues, M. Â. & Arrobas, M. (2010). *Optimizing the time of incubation of an anion exchange membrane inserted into the soil to use in studies of monitoring soil nitrate levels*. p. 239-240. *Proceedings of AGRO 2010 the XI the ESA Congress*, Montpellier, France.
- Ronquim, C. C. (2010). *Conceitos de fertilidade de Solo e manejo adequados em regiões tropicais*. Campinas: EMBRAPA. p. 19-21.
- Russelle, M. P. (2008) *Biological dinitrogen fixation in agriculture*. In: Schepers JS, Raun WR (eds) *Nitrogen in agricultural systems*. Agronomy monograph nº 49, ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wis, p. 281-359.
- Salgueiro, T. A. (2008). *As pastagens- passado, presente e futuro*. Lisboa. 31 (1): 271-282.
- Santos, J. (2011). *Manual de agricultura geral II. (MINAGRI, Ed.)* Coímbra, Portugal: SINFIC, SA.

- Santos, J. Q. (2012). *Fertilização - Fundamentos da utilização dos adubos e correctivos*. (4ª ed.). Lisboa. Portugal: Europa-América, Lda.
- Santos, H. P. & Tomm, G. O. (1999). *Rotação de culturas para trigo, após quatro anos: efeitos da fertilidade do solo em plantio direto*. Cien. Rural, Vol. 29 (2) : 259-265.
- Santos, H. P. & Tomm, G. O. (2003). Disponibilidade de nutrientes e o teor de matéria orgânica em função dos sistemas de cultivo e do manejo do solo. Cien. Rural, Vol. 33 (3) : 477-486.
- Santos, H. P., Fontaneli, R. S. & Tomm, G. O. (2001). *Efeito de sistemas de produção de grãos e de pastagens sob plantio direto sobre o nível da fertilidade do solo após cinco anos*. Rev. Bras.Cien. Solo. 25: 645-653.
- Schoenau, J. J. & Huang, W. Z. (1991). *Anion-exchange membrane, water, and sodium bicarbonate extraction as soil test for phosphorus*. Commun. Soil Sci.Plant Analysis. 22: 465-492.
- SSSA. (2008). *Glossary of soil science terms*. ASA- CSSSA-SSSA. p. 88.
- Taimo, J. P., & Calegari, A. ( 2007). *Manual de Agricultura de Conservação*. Beira, Sofala, Moçambique, Promec. p. 113.
- Trabelsi, D., Hammar, H. B., Mengoni, A., & Mhamdi, R. (2012). *Appraisal of the crop-rotation effect of rhizobial inoculation on potato cropping systems in relation to soil communities*. Soil biology & Biochemistry. 54: 1-6.
- USDA. (2011). *Carbon to nitrogen ratios in cropping systems*. USDA Natural resources conservation service. Soils.usda.gov/sgi.
- Van Reeuwijk, L. P. (2002). *Procedures for soil analysis*. Sixth edition. ISRIC. FAO.
- Varenes, A. (2003). *Produtividade dos solos e ambiente*. Lisboa, Portugal: Escolar Editora.
- Zotarelli, L., Zatorre, N. P., Boddey, R. M., Urquiaga, S., Jantalia, C. P., Franchini, J. C., & Alves, B. J. R. (2012). *Influence of no-tillage and frequency of a green manure legume in crop rotations for balancing N outputs and preserving soil organic C stocks*. Field Crops Research 132: 185–195.