TRANSFERÊNCIA DE NITROGÊNIO DO FEIJÃO PARA O MILHO
CONSORCIADO: AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO
ISOTÓPICA DO ^{15}N E EFEITO DA
ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA

ROBERTO BONETTI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz",
para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, Área de Concentração:
Solos e Nutrição de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Bonetti, Roberto

B712e Transferência de nitrogênio do feijão para o milho con
sorciado: avaliação pelo método de diluição isotópica do
15N e efeito da associação micorrízica. Piracicaba, 1991.
63p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Consorciação de cultura agrícola 2. Feijão - Micor
riza 3. Feijão-milho - Consorciação 4. Micorriza 5. Nitro
gênio de feijão - Transferência - Diluição isotópica 6.
Nitrogênio em milho 7. Nitrogênio 15 - Diluição isotópica
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piraci
caba

CDD 635.652

TRANSFERÊNCIA DE NITROGÊNIO DO FEIJÃO PARA O MILHO
CONSORCIADO: AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO
ISOTÓPICA DO ^{15}N E EFEITO DA
ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA

ROBERTO BONETTI

Aprovada em: 13.12.91

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

ESALQ/USP

Prof. Dr. Tasso Leo Krugner

ESALQ/USP

Prof.Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro

CENA/USP

Dra. Maria José Valarini

IZ/N.Odessa

Dr. Itamar Soares de Melo

CNPDA/EMBRAPA

Prof Dr. Álvaro Augusto Teixeira Vargas

Orientador

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e National Academy of Sciences (NAS) pelo apoio financeiro.

Aos laboratoristas Francisco Montrazzi e Mario Bizetto pelas análises químicas.

Ao amigo Paulo Marcos da Silva, pelo estímulo e pelo auxílio na discussão dos resultados.

A todos da Seção de Microbiologia do Solo que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Consorciação gramíneas e leguminosas.....	5
2.2. Uso de técnicas isotópicas.....	9
2.3. Associação micorrízica e o consórcio.....	11
2.4. Transferência de nitrogênio entre leguminosas e... gramíneas.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Experimento I. Transferência de N do feijão para milho consorciado usando o método de diluição isotópica do ^{15}N	16
3.1.1. Etapa 1. Marcação do solo com ^{15}N	16
3.1.2. Etapa 2. Cultivo do milho e feijão.....	18
3.2. Experimento II. Efeito do fungo <i>Glomus clarum</i> no desenvolvimento das plantas e na transfe- rência de N no consórcio milho e feijão.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Experimento I. Transferência de N do feijão para milho consorciado usando o método de diluição isotópica do ^{15}N	26

3.2. Experimento II. Efeito do fungo <i>Glomus clarum</i> no desenvolvimento das plantas e na transfe- rência de N no consórcio milho e feijão.....	41
5. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

LISTA DE TABELAS

página

1. Análise química do solo Terra Roxa Estruturada utilizado no experimento.....	17
2. Análise química do solo Terra Roxa estruturada utilizado no experimento (etapa 2).....	18
3. N-mineral do solo e enriquecimento de ^{15}N , em diferentes épocas de amostragem dos lisímetros (DAE - dias após emergência).....	27
4. Enriquecimento de ^{15}N do feijão, milho e soja coletados em diferentes épocas de amostragem, crescidos sozinhos ou em consórcio em lisímetros com solo marcado com ^{15}N (média de três repetições). DAE - dias após emergência.....	28
5. Peso da matéria seca e absorção de N na parte aérea de soja solteira e consorciada com milho, em duas épocas de coleta (média de três repetições).....	30
6. Peso da matéria seca e absorção de N na parte aérea e sementes de feijão solteiro e consorciado com o milho (média de três repetições).....	32
7. Peso da matéria seca e número dos nódulos, atividade	

da nitrogenase de feijão solteiro e consorciado com o milho (média de três repetições).....	32
8. Peso da matéria seca e absorção de N na parte aérea de milho solteiro (consorciado com soja não nodulante) e consorciado com feijão (média de três repetições), em duas épocas de amostragem.....	34
9. N fixado pelo feijoeiro crescido sozinho ou em consórcio com o milho, utilizando como controle o enriquecimento de ^{15}N da soja (1), do milho (2) e do solo (3) aos 45 e 70 dias após emergência (DAE). (Média de três repetições).....	35
10. N transferido do feijão para o milho calculado utilizando-se a equação (4) e (5). (Média de três repetições).....	36
11. Balanço de N no consórcio milho e feijão. Média de três repetições. Dados relativos à coleta aos 70 dias após emergência.....	38
12. Efeito de <i>G. clarum</i> no peso da matéria seca da raiz, parte aérea e sementes de feijão solteiro de consorciado com o milho (média de três quatro repetições).....	42
13. Efeito de <i>G. clarum</i> no peso da matéria seca e número	

dos nódulos, em feijão solteiro e consorciado com o milho (média de três repetições).....	43
14. Efeito de <i>G. clarum</i> na quantidade de N absorvida pelo feijão solteiro e consorciado com o milho (média de quatro repetições).....	44
15. Infecção micorrízica em raízes e número de esporos no solo em feijão solteiro e consorciado com o milho (média de quatro repetições).....	45
16. Efeito de <i>G. clarum</i> no peso da matéria seca da raiz e parte aérea de milho solteiro e consorciado com feijão (média de quatro repetições).....	46
17. Infecção micorrízica em raízes de milho solteiro e consorciado com o feijão, e número de esporos no solo (média de quatro repetições).....	47
18. Efeito de <i>G. clarum</i> na quantidade de N absorvido pelo milho solteiro e consorciado com o feijão (média de quatro repetições).....	48
19. Quantidade de N transferido do feijão para o milho, calculado pela diferença de N total do milho solteiro e consorciado, e sua porcentagem em relação ao N total do milho e feijão.....	49

TRANSFERÊNCIA DE NITROGÊNIO DO FEIJÃO PARA O MILHO
CONSORCIADO: AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DE DILUIÇÃO
ISOTÓPICA DO ^{15}N E EFEITO DA
ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA

Autor: ROBERTO BONETTI

Orientador: PROF. DR. ÁLVARO AUGUSTO TEIXEIRA VARGAS

Resumo

A transferência de nitrogênio (N) do feijão para o milho consorciado foi estudada em condições de campo, utilizando-se doze lisímetros contendo Terra Roxa Estruturada (TE) onde foi previamente crescido o milho fertilizado com nitrato de potássio a 60% de átomos de ^{15}N em excesso. Após a estabilização da marcação com ^{15}N da fração de N-orgânico e mineral do solo, o feijão e o milho foram plantados em consórcio ou em monocultivo. A soja não nodulante foi incluída como planta controle não fixadora em cada lisímetro. Um outro experimento foi conduzido em casa-de-vegetação com o objetivo de verificar a influência da inoculação do fungo micorrízico vesículo-arbuscular (MVA) *Glomus clarum* no crescimento das plantas e na transferência de N do feijão para o milho consorciado. Para isso, o feijão e o milho foram crescidos separadamente ou em consórcio com e sem adição do do fungo

micorrízico *G. clarum* em areia lavada. O experimento de campo foi coletado aos 45 e 70 dias após a emergência (DAE), e no experimento de casa-de-vegetação, aos 73 DAE. Os parâmetros analisados foram peso da matéria seca, N total, nodulação do feijoeiro, colonização micorrízica nas raízes das plantas, o N₂ fixado pelo feijoeiro e o N transferido do feijão para o milho. No experimento de diluição isotópica, a transferência de nitrogênio foi evidenciada pelo menor enriquecimento de ¹⁵N na parte aérea do milho consorciado comparado com o milho solteiro. Estimou-se que a transferência total de N do feijão para o milho é da ordem de 3,8 kg de N/ha, e que a fixação de N₂ pela simbiose entre o feijoeiro e o *Rhizobium* foi eficiente nessas condições, fixando em média 90% do N total da planta. O fungo *G. clarum* favoreceu o crescimento das plantas, conferindo habilidades competitivas à leguminosa em consórcio. A transferência de N foi maior na presença do fungo *G. clarum*, e causou o aumento do N total do milho consorciado. Nas condições experimentais testadas, a transferência de N do feijão para o milho consorciado apresentou pequena significância agrícola.

NITROGEN TRANSFER FROM BEAN (*Phaseolus vulgaris*) TO
INTERCROPPED MAIZE: EVALUATION USING ^{15}N -
ISOTOPE DILUTION METHODS AND
MYCORRHIZAL EFFECT

Author: ROBERTO BONETTI

Adviser: Prof. Dr. ÁLVARO AUGUSTO TEIXEIRA VARGAS

SUMMARY

Nitrogen (N) transfer from bean to intercropped maize was studied under field conditions, using twelve lysimeters filled with Terra Roxa Estruturada (TE) soil previously cropped with maize fertilized with potassium nitrate at 60 % of atoms ^{15}N excess. After the N-organic and mineral nitrogen soil fractions had reached the steady state, bean and maize plants were cropped alone or intercropped. Non-nodulating soybean was included in each lysimeter as a non-fixing crop control. Another experiment was carried out under glasshouse conditions in order to verify the effect of mycorrhizal fungi *Glomus clarum* on plant growth and on N-transfer from bean to maize plants. For this purpose, bean and maize were grown alone and together with and without mycorrhizal inoculum in washed sand. Data from the field experiment was collected 45 and 70 days after emergence (DAE), and the glasshouse experiment after 73 DAE. The following parameters were

analysed: shoot dry weight, nodulation, total N, root mycorrhizal infection, N₂ fixation and N-transfer from bean to maize. The field isotope dilution experiment, showed clear evidence of N-transfer, by reducing the ¹⁵N content in intercropped maize compared with single maize plants. The N-transfer from bean to maize was estimated to be 3.8 kg N/ha, and nitrogen fixation was very high under these conditions (averaging 90% of total N). The mycorrhizal fungi *Glomus clarum* increased dry matter production and competitive ability of intercropped bean plants. The N-transfer was enhanced by mycorrhiza, and increased the total amount of N in the intercropped maize. Under these experimental conditions the N transfer from bean to intercropped maize showed little agronomic significance.

1. Introdução

Na América Latina, 80% da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris*) ocorre em plantios consorciados, principalmente com o milho (FRANCIS et alii, 1982). No Brasil, embora os grandes produtores não adotem o sistema de consórcio, principalmente nas regiões mais desenvolvidas, o cultivo associado ainda é uma prática comum entre os pequenos agricultores, representando na década de 70, quase 70% de toda a produção de feijoeiro do país (MEDINA, 1972). No Brasil o sistema consorciado é preferido ao solteiro, pois apresenta as seguintes vantagens: maximização de recursos e produção de proteínas; melhor uso da mão-de-obra familiar e exploração da terra; minimização dos riscos; dieta balanceada e aumento na fertilidade do solo (VIEIRA, 1978; SANTA CECÍLIA & VIEIRA, 1978; FARIS et alii, 1983). A maioria dos agricultores cultivam o feijoeiro em solos de baixa fertilidade, principalmente deficientes em nitrogênio (N) e fósforo (P). Estudos no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), demonstraram que este sistema é intensamente utilizado, empregando baixo investimento de fertilizantes, representando um papel duplo, tanto para a produção de alimentos como para a exploração econômica. De uma maneira geral, a produtividade do milho não diminui com o consórcio com outras culturas,

e nesse caso a produção de feijão representa um ganho extra para o produtor (VIEIRA et alii, 1975; AIDAR & VIEIRA, 1979).

A grande importância que o plantio de feijão associado tem para o pequeno agricultor e, o conhecimento de que o nitrogênio é um dos fatores limitantes da produção nesse sistema de cultivo, fizeram aumentar o interesse pelo nitrogênio fixado simbioticamente pelo feijoeiro. Desse modo, a leguminosa pode obter o nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento, diminuindo a competição pelo nitrogênio do solo com o milho e, contribui na transferência do nitrogênio fixado para o milho.

Quando a produtividade de uma não leguminosa é favorecida pelo consórcio com uma leguminosa, tal fato é comumente atribuído ao nitrogênio excretado no solo pela leguminosa. Muitos autores têm mostrado que existe transferência de N de leguminosas para uma não leguminosa (EAGLESHAM et alii, 1981; RUSCHEL et alii, 1979; GILLER et alii, 1991), enquanto outros autores não encontraram evidências de transferência de nitrogênio entre cereais e leguminosas (OFORI et alii, 1987; KESSEL & ROSKOWSKI, 1988). A capacidade da leguminosa de fixar N_2 atmosférico e portanto, reduzir o custo de produção referente à utilização de fertilizantes nitrogenados, é uma das principais vantagens do cultivo consorciado. A possibilidade de que o N_2 fixado possa ser disponível ao milho, aumenta o interesse por este sistema. Entretanto, são escassos os dados confiáveis referentes à quantidade de N_2 fixado em condições de consórcio e, bem como a magnitude da transferência de N para o milho durante o ciclo das culturas

A simbiose micorrízica vesículo-arbuscular (MVA) é um dos fatores ecofisiológicos capaz de afetar o balanço nutricional da relação entre gramíneas e leguminosas crescendo em consórcio (MUNNS & MOSSE, 1980; BAREA & AZCON-AGUILAR, 1983). Devido à diferença entre essas duas famílias de plantas em competir pelos nutrientes, os fatores externos que favorecem uma nutrição balanceada no consórcio de gramíneas com leguminosas, são muito importantes (HAYNES, 1980). Existem muitas explicações do papel das micorrizas no sistema de consórcio. O principal mecanismo da atividade micorrízica pode ser atribuído às hifas do fungo simbiote que aumentam a superfície de absorção das raízes. Como as leguminosas são em geral mais micotróficas que as gramíneas (HAYNES, 1980), possuindo um sistema radicular mais pobre, as micorrizas poderiam contrabalancear a capacidade competitiva das leguminosas absorvendo os nutrientes de baixa mobilidade, particularmente o fósforo. Consequentemente, a fixação de N_2 nas leguminosas, o processo chave para a entrada de N no sistema, sendo dependente da disponibilidade de P, poderia ser beneficiada pelas MVA (BAREA & AZCON-AGUILAR, 1983; HAYMAN, 1986). Como resultado da infecção micorrízica, as plantas dentro do consórcio ficam interconectadas através das hifas dos fungos MVA, levantando-se a hipótese de que esses nutrientes podem ser transferidos de uma planta para a outra através dessas interconexões de hifas (HEAP & NEWMAN, 1980; FRANCIS et alii, 1986).

O uso da diluição isotópica do ^{15}N tem sido amplamente empregada para se estudar a relativa contribuição de diferentes fontes de N para as plantas (solo, fertilizante e atmosfera) (CHALK, 1985;

LEDGARD et alii, 1985; VOSE & VICTORIA, 1986). Esta técnica permite não somente quantificar o N proveniente de diferentes fontes, mas também avaliar os efeitos dos fatores que influenciam as taxas de fixação de N₂ nas associações *Rhizobium* x leguminosas e as interações no consórcio gramíneas/leguminosas (BAREA et alii, 1989). Entre os recentes trabalhos relativos a essas interações estão os trabalhos de competição pelo N do solo (BUTLER & LADD, 1985; MORRIS & WEAVER, 1987), e a avaliação da possível transferência de N no consórcio de leguminosas e gramíneas (TA & FARIS, 1987; VALLIS et alii, 1967, 1977; HAYSTEAD & MARRIOTT, 1979; LEDGARD et alii, 1985), milho e caupi (EAGLESHAM et alii, 1981; AGBOOLA & FAYEMI, 1972; OFORI et alii, 1987) e milho e feijão (GILLER et alii, 1991). Em particular a técnica isotópica de ¹⁵N tem sido utilizada para avaliar o efeito das micorrizas vesículo-arbuscular na fixação de N₂ (BAREA et alii, 1987) e na transferência de N (KESSEL et alii, 1985; GILLER et alii, 1991; BAREA et alii, 1989).

O objetivo do presente trabalho é quantificar o nitrogênio fixado simbioticamente pelo feijoeiro quando consorciado com o milho e em monocultivo, bem como a transferência de N entre as plantas, utilizando a diluição isotópica de ¹⁵N. Outro objetivo é avaliar a importância de plantas colonizadas com *Glomus clarum* no consórcio feijão e milho quanto ao N₂ fixado e à transferência de N.

2. Revisão de literatura

2.1. Consorciação gramíneas e leguminosas.

O sistema consorciado é definido como o plantio de pelo menos duas espécies de planta na mesma área e ao mesmo tempo. Embora muitas espécies estejam envolvidas, a combinação gramínea/leguminosa é a mais predominante (RAO et alii, 1987). É uma prática muito antiga que somente nos últimos anos tem recebido atenção dos pesquisadores (SEIFERT, 1982; RAO et alii, 1987).

No Brasil, o feijoeiro tem sido utilizado como uma cultura secundária ao lado de outras consideradas como economicamente mais importantes (MEDINA, 1972). O plantio do feijão consorciado com o milho é uma prática generalizada entre os pequenos agricultores que, desse modo, procuram aproveitar ao máximo os recursos limitados de que dispõem. A grande desvantagem do processo é que impede a utilização, em maior grau, de técnicas agrícolas que conduzem a altos rendimentos. À medida que o nível tecnológico da agricultura evolui, as culturas consorciadas tornam-se mais difíceis de serem manejadas, principalmente quando a mecanização é introduzida (VIEIRA, 1978).

De um modo geral duas plantas não competem entre si se os suprimentos de água, nutrientes, oxigênio e CO₂, luz e calor são suficientes para ambas. A interferência não competitiva segundo HAYNES

(1980), pode ser um estímulo direto de uma espécie sobre a outra (nitrogênio fixado pelas leguminosas sendo disponível a uma não leguminosa). Entretanto, a competição entre plantas pela luz, água e nutrientes normalmente ocorre. De uma maneira geral é aceito que quanto mais similares forem as necessidades de dois organismos, mais intensa é a competição, e portanto, a competição intraespecífica seria mais intensa que a interespecífica (HAYNES, 1980). Segundo WAHUA & MILLER (1978), não se conhece bem o grau que a competição por luz e nutrientes afeta a fixação de N_2 nas leguminosas em consórcio. Estes autores estudaram o consórcio de soja e sorgo e verificaram que o sombreamento afeta a fotossíntese da leguminosa, e conseqüentemente a fixação de N_2 . PEREIRA et alii (1984), estudando a produção e a fixação de N_2 em feijoeiro plantado após a maturação fisiológica do milho, observaram que o plantio associado estimulou a nodulação e acarretou maior permanência dos nódulos no sistema radicular do feijoeiro. Entretanto, a produção foi maior em monocultivo, o que os levou a concluir que outros fatores deveriam estar envolvidos na limitação da produção do sistema consorciado.

A competição pelo N entre uma gramínea e uma leguminosa representa uma situação única, porque a leguminosa pode aumentar o suprimento de N através da fixação de N_2 , ou pode também competir pelo N mineral do solo (SIMPSON, 1976). O balanço entre a competição e a transferência de N não é constante com o tempo, mas muda com o estágio de crescimento da planta (VALLIS, 1972).

Existem vários aspectos a serem considerados no consórcio feijão-milho. A fixação do nitrogênio pelo *Rhizobium* nas

raízes do feijoeiro e a fertilização do milho com nitrogênio combinado representam um paradoxo. Altas concentrações de N no solo resultam em redução da fixação de N_2 , sem entretanto causar dano à produção (ALLOS & BARTHOLOMEW, 1959; BOLLER & NOSBERGER, 1987). Por outro lado, pode existir uma competição entre o milho e o feijão pelo N do solo. Nesse caso, a fixação do N_2 é capaz de substituir pelo menos em parte o N do solo ou o N aplicado como fertilizante. Segundo DANSO et alii (1987), uma planta não fixadora como o milho, compete com a planta fixadora como o feijão, diminuindo a concentração de N no solo. De acordo com PATE & DART (1961), o crescimento das leguminosas e a fixação de N_2 é frequentemente favorecido por pequenas doses de N, especialmente se o N estiver disponível durante o período entre a exaustão das reservas da semente e o estabelecimento de um ativo sistema fixador de N_2 . De uma maneira geral, assume-se que as leguminosas em consórcio obtêm uma pequena fração de N-mineral disponível no solo, embora em alguns casos possam competir com as gramíneas pelo N mineral (DAVIES, 1964).

De acordo com RUSCHEL et alii (1979), os pequenos agricultores plantam o feijão entre as ruas de milho sem causar nenhum problema para ambas as culturas. Vários estudos mostram que a produção do milho não diminui ou cuja queda na produção não é significativa quando consorciado com o feijão (RAO et alii, 1987; VIEIRA et alii, 1975).

Quando a produtividade de uma gramínea é favorecida pelo consórcio com uma leguminosa, tal fato é comumente atribuído ao nitrogênio excretado no solo pela leguminosa. Muitos autores têm mostrado que existe transferência de N de leguminosas para uma não

leguminosa (EAGLESHAM et alii, 1981; RUSCHEL et alii, 1979; BAREA et alii, 1989). Na maioria dos casos, esta transferência de N se dá via decomposição da parte aérea, raízes e nódulos (SIMPSON, 1976). Sob certas condições, as leguminosas podem excretar compostos amino-solúveis, mas isso normalmente não ocorre (BUTLER & BATHURST, 1956).

TA et alii (1986) trabalhando com alfafa, verificaram que quantidades consideráveis de compostos nitrogenados podem ser excretadas das raízes noduladas. Também mostraram que o N₂ fixado era a principal fonte desses compostos de N excretados. Entretanto, segundo WHITNEY (1981) e GILLER et alii (1991), as plantas leguminosas durante o seu ciclo vegetativo transferem apenas quantidades insignificantes de N para outras espécies. LEDGARD et alii (1985), verificaram que a transferência de N de *Trifolium subterraneum* para *Lolium rigidum* foi de apenas 2,2%. As opiniões divergem sobre a importância relativa das diferentes partes das plantas como principal fornecedora de N. Em *Centrosema* e *Desmodium* foi determinado que a mineralização das folhas é a mais importante fonte de transferência de N (WHITNEY, 1981). De acordo com SIMPSON (1976) a quantidade de N transferido de uma leguminosa para uma gramínea varia com a espécie da leguminosa e da gramínea, a porcentagem da leguminosa no consórcio, a idade do consórcio e o tipo de manejo. Este mesmo autor verificou em campo que as trocas de N entre as raízes das leguminosas e das gramíneas, variam de 3 a 20 % do N total dependendo do tipo de leguminosa. Esses valores incluem a transferência direta e a fase após a decomposição da leguminosa no solo. VALLIS et alii (1967), verificaram que não havia

transferência direta significativa de N entre plantas crescidas em vasos.

Parece que a transferência indireta pela decomposição dos tecidos das leguminosas, é a maior contribuição de N para as gramíneas (BOLLER & NOSBERGER, 1987; DILZ & MULLER, 1962; LEDGARD et alii, 1985). Estimativas feitas por BOLLER & NOSBERGER (1987), mostraram que a transferência aparente de N_2 fixado das leguminosas para as gramíneas, está ao redor de $17 \text{ kg N.ha}^{-1}\text{.an}^{-1}$, incluindo a excreção de N das raízes vivas e a decomposição de raízes e nódulos. EAGLESHAM et alii (1981) e WAHUA & MILLER (1978) concluíram que a excreção de N pelas leguminosas resulta em significativo benefício à cultura associada, somente em baixos níveis de N. TA & FARIS (1987) verificaram que a excreção de N pode diferir entre espécies, ou seja, alfafa e trevo vermelho excretam mais N que o *Trifolium*. VEST (1971) também verificou que certas estirpes de *Rhizobium* excretam mais N que outras.

A capacidade de fixar N_2 atmosférico e portanto, reduzir o custo de produção referente à utilização de fertilizantes nitrogenados, é uma das principais vantagens do cultivo consorciado. A possibilidade do N_2 fixado ficar disponível para o milho, aumenta o interesse por este sistema. Entretanto, são escassos os dados confiáveis referentes à quantidade de N_2 fixado em condições de consórcio, e a magnitude da transferência de N para o milho durante o ciclo das culturas em consórcio.

2.2. Uso de técnicas isotópicas.

Os métodos isotópicos diretos e indiretos, têm sido utilizados para se detectar a transferência de N de leguminosas para gramíneas. O método direto se baseia na exposição de um determinado consórcio de plantas ao $^{15}\text{N}_2$, e subsequentes medidas do enriquecimento de ^{15}N das plantas não leguminosas (CHALK, 1985). Entretanto, este método é sujeito a erros, uma vez que qualquer fixação de N_2 proveniente de organismos associativos nas raízes das gramíneas, seria incluído como N transferido. Além do mais, a absorção de N pelas gramíneas é estimulada na presença de leguminosas, superestimando assim o N transferido das leguminosas para as gramíneas (CHALK, 1985; VALLIS et alii, 1977).

O método indireto, se baseia na adição ao substrato de fertilizante ou matéria orgânica marcados com ^{15}N . Esta metodologia tem sido comumente empregada para medidas de N_2 fixado e transferência de N entre plantas, denominada técnica da diluição isotópica. Tal metodologia requer a marcação do N do solo com material enriquecido com ^{15}N (fertilizantes ou resíduo vegetal), a qual permite diferenciar entre a proporção de N_2 fixado simbioticamente e o absorvido do solo (McAULIFFE et alii, 1958). De acordo com WITTY (1983), a incorporação ao solo de resíduos enriquecidos com ^{15}N , é um método preciso nas estimativas baseadas na diluição isotópica. BODDEY & VICTORIA (1986) verificaram que este método de incorporação de material orgânico ao solo, atinge relativa estabilidade após 18 meses da aplicação do traçador.

O ^{15}N absorvido do solo sofre diluição durante o processo de fixação do N_2 , e deste modo o N_2 fixado e o N transferido

podem ser determinados (FRIED & BROESHART, 1975). Essa técnica tem sido utilizada para se determinar a proporção de N₂ fixado simbioticamente e N transferido em consórcio de várias leguminosas e gramíneas (TA & FARIS, 1987; VALLIS et alii, 1967, 1977; HAYSTEAD & MARRIOTT, 1979; LEDGARD et alii, 1985; EAGLESHAM et alii, 1981; AGBOOLA & FAYEMI, 1972; OFORI et alii, 1987; BAREA et alii, 1989; GILLER et alii, 1991). Essa metodologia, envolvendo o isótopo estável de ¹⁵N, oferece uma ferramenta satisfatória para a medida da fixação de N₂ em sistemas consorciados. Pode-se distinguir a proporção de N na gramínea e na leguminosa proveniente do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica, bem como o N transferido de uma planta para outra. O princípio do método se baseia na comparação da composição isotópica ¹⁴N : ¹⁵N da leguminosa e da gramínea. Esses valores são então relacionados com a composição isotópica da fonte de N primária disponível às plantas (solo ou fertilizante).

2.3. Associação micorrízica e o consórcio.

Um outro ponto a ser considerado no sistema de consórcio, é a disponibilidade de fósforo presente nessas condições. Muitos trabalhos têm mostrado que existe um aumento na absorção de P pelas raízes micorrizadas de feijão e milho (DAFT & El-GHIAMI, 1974; KESSEL et alii, 1985). Entretanto, isto pode variar de acordo com a espécie de fungo utilizada, o nível de P no solo e quantidade de fertilizante fosfatado aplicada (HAYNES, 1980; CRUSH, 1974). A possível transferência de nutrientes entre as plantas consorciadas mediadas pela micorriza vesículo-arbuscular (MVA), pode ser de grande importância.

Devido a característica única da simbiose tripartite existente entre as leguminosas, o *Rhizobium* e os fungos MVA, os pesquisadores afirmam que em condições de baixo uso de insumos, principalmente de N e P, a contribuição do *Rhizobium* e dos fungos MVA para o hospedeiro, é um fator importante que também deve ser considerado. Os fungos MVA desempenham um papel importante na maioria dos solos agricultáveis, e após se estabelecerem dentro das raízes, esses fungos filamentosos podem absorver uma grande quantidade de nutrientes, principalmente os de baixa mobilidade no solo, como o P (MOSSE, 1973).

A infecção MVA se dá através do contato entre as raízes do hospedeiro e as hifas do fungo MVA presentes no solo (FRANCIS & READ, 1984). O resultado desse tipo de infecção é uma interconexão entre raízes de plantas individuais através das hifas do fungo (HEAP & NEWMAN, 1980). Como consequência desse padrão de infecção, as plantas dentro de uma comunidade são interligadas pelas hifas dos fungos MVA (FRANCIS et alii, 1986). Essas interconexões têm sido demonstradas através da autoradiografia, as quais são uma rota direta para a transferência de carbono e P entre as plantas (HEAP & NEWMAN, 1980; FRANCIS & READ, 1984; CHIARELLO et alii, 1982). Normalmente as hifas do fungo MVA podem conectar as raízes de uma grande variedade de espécies, e como esses fungos são cosmopolitas, este fato pode ser um fenômeno freqüente que levanta a hipótese dos nutrientes serem transferidos de uma planta para outra através das hifas desses fungos (HEAP & NEWMAN, 1980).

2.4. Transferência de Nitrogênio entre leguminosas e gramíneas.

Os trabalhos acima mencionados, indicam que no sistema de consórcio, a presença de leguminosas fixadoras de N_2 podem aumentar o teor de N e o crescimento de não leguminosas. Os resultados dos trabalhos de KESSEL et alii, 1985 e FRANCIS et alii, 1986, mostram que o N pode ser transferido de uma planta para outra através da hifa conectando duas ou mais raízes, durante o período de crescimento das plantas. Entretanto, existe muita controvérsia quanto ao mecanismo envolvido na transferência de N de uma leguminosa para uma não leguminosa. Dados disponíveis de experimentos realizados por DANSO et alii (1987) e BOLLER & NOSBERGER (1987), sugerem que a transferência direta (durante o crescimento da planta) tem uma importância menor quando comparada com a transferência indireta (decomposição do material vegetal).

De fato, a morte da leguminosa libera a maior parte do N via decomposição das raízes e nódulos liberando-o para outras culturas. EAGLESHAM et alii (1981) concluíram que a excreção de N de leguminosas consorciadas pode beneficiar a não leguminosa somente quando o nível de N no solo for baixo. De acordo com KESSEL et alii (1985), sob condições de baixos níveis de N e P, existentes na maioria dos solos tropicais, a possível transferência desses nutrientes mediada pela MVA, pode ser significativa.

WARNER (1984) demonstrou que alguns tipos de fungos MVA podem sobreviver algum tempo na matéria orgânica morta, sugerindo que

1.

TSAI, S. M. (CENA. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba) Comunicação pessoal, 1990.

esses fungos podem ter um tipo de nutrição saprofítica. Nesse caso, se o sistema radicular nodulado e micorrizado morrer, os nutrientes do material em decomposição poderiam ser transportados para as raízes vivas próximas através das hifas dos fungos. TSAI ¹ verificou que nódulos de feijão senescentes estavam completamente infectados com hifas de fungos MVA.

Efeitos sinérgicos têm sido verificados em muitas associações de leguminosas, *Rhizobium* e fungos MVA com aumento no conteúdo de P, aumento da matéria seca, nodulação, fixação de N₂ e conteúdo de N (MOSSE et alii, 1976; SMITH & DAFT, 1977; BONETTI, 1984).

KESSEL et alii (1985) e BAREA et alii (1989) trabalhando com soja consorciada com milho e alfafa consorciada com "ryegrass" respectivamente, mostraram que ocorria a transferência de N₂ fixado das leguminosas para o milho. Além disso, foi sugerido que os fungos MVA contribuíram para essa transferência. FRANCIS et alii (1986) evidenciaram a transferência de N de uma planta para outra através das hifas dos fungos, sugerindo que essa transferência ocorria através das hifas conectadas, e não pela simples absorção do N excretado pelas raízes.

HAYSTEAD et alii (1988) demonstraram maiores taxas de transferência de N aplicado em trevo como sulfato de amônio para a gramínea em consórcio, quando as raízes estavam micorrizadas. Entretanto não ficou claro se essa transferência se dava diretamente pelas hifas conectando duas raízes, ou por outros processos indiretos.

O melhoramento e a compreensão deste sistema tradicional requer estudos agronômicos em todos os aspectos. Entretanto, a

pesquisa tem se concentrado em determinados aspectos como a compatibilidade de diferentes espécies, densidade de plantio, espaçamento e genótipos, com pouca ou nenhuma ênfase do aspecto nutricional (RAO et alii, 1987).

Os trabalhos sobre a transferência de N do feijão para o milho são até o presente momento, inconclusivos. Significativa transferência de N de leguminosas forrageiras ocorre quando a planta atinge a maturidade ou quando as plantas são submetidas a estresses como sombreamento, baixa temperatura ou desfoliação repetida (HAYSTEAD & MARRIOTT, 1979; BROADBENT et alii, 1982). Apesar de muitos trabalhos mostrarem a transferência de N, a metodologia utilizada é inadequada, e como consequência, muitas dúvidas surgem. Além disso, os trabalhos sobre milho e feijão são quase inexistentes quanto à este aspecto. Recentemente, GILLER et alii (1991) constataram baixa transferência de N do feijão para o milho. Entretanto, estes autores sugeriram experimentos mais conclusivos, uma vez que as suas parcelas foram severamente afetadas pelo ataque de insetos, mascarando os efeitos do N transferido.

3. Material e Métodos

3.1. Experimento I. Transferência de Nitrogênio do feijão consorciado com milho usando diluição isotópica do ^{15}N .

O experimento foi conduzido nas dependências do CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura em condições de campo em duas etapas: etapa 1, correspondente à marcação do solo com ^{15}N , e a etapa 2, correspondente ao crescimento das plantas, em Piracicaba, São Paulo, Brasil, Latitude 22° 42' 22" S.

3.1.1. Etapa 1. Marcação do Solo com ^{15}N .

Esta etapa foi realizada de janeiro a junho do ano de 1988. Doze lisímetros de 2,4 x 1,0 x 0,60m (comprimento, largura, profundidade) contendo 1 tonelada de solo cada um, foram utilizados nesse experimento. O solo foi a Terra Roxa Estruturada - TE (Paleudalf óxico) cuja análise química se encontra na Tabela 1. O solo coletado possuía uma população nativa de fungos micorrízicos, que promoveu colonização média de 20% nas raízes das plantas de feijão e milho. Incorporou-se neste solo matéria orgânica marcada com ^{15}N . Para isso, o milho cultivar Piranão, foi

crescido no próprio lisímetro adicionando-se ao solo nitrato de potássio enriquecido com 60% de átomos de ^{15}N . O nitrogênio foi aplicado na dose de 40 g de N (100 kg de N/ha) por lisímetro, dividida em três vezes (emergência, 20 e 40 dias após germinação). Após 60 dias o milho foi cortado em pequenos pedaços e incorporado ao solo. Essa atividade foi repetida três vezes.

Tabela 1. Análise química do solo Terra Roxa Estruturada utilizado no experimento.

pH	MO	N	Al^{+3}	H^{+}	H+Al	Ca^{+2}	Mg^{+2}	K^{+}	P
CaCl	%					emg/100 g TFSA			ppm
4,85	4,1	0,09	0,4	0,2	0,60	2,0	0,5	0,1	15,0

Cada lisímetro foi dividido ao meio no sentido do comprimento com uma divisória plástica, originando duas sub-parcelas, com o objetivo de isolar os possíveis contatos entre as raízes das plantas entre as sub-parcelas.

Após três anos, foram retiradas sub-amostras do solo de cada sub-parcela. O solo foi coletado em cinco diferentes locais com auxílio de um trado de rosca, originando duas amostras compostas em cada lisímetro. Em seguida foram pesados 100 g de solo de cada amostra composta e adicionados 130 mL de KCl 2N, agitando-se por quatro horas em agitador rotativo. Imediatamente o solo foi centrifugado e o sobrenadante foi recolhido e destilado em destilador Kjeldahl na presença de MgO, para liberação da amônia e posteriormente adicionado Liga de Devarda para redução do nitrato remanescente à amônia, de acordo com BREMNER (1965). O destilado foi recebido em ácido bórico,

sendo titulado com H_2SO_4 0,01N e concentrado em estufa ventilada a 60°C para posterior análise de ^{15}N .

Uma alíquota do solo foi tomada para determinação da umidade e posteriormente triturada até passar por peneira de malha 100 sendo, então, analisado o teor de N-total, incluindo NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^- de acordo com BREMNER (1965). Após a titulação, as amostras foram aciduladas com três gotas de HCl 1N e concentradas em estufa ventilada a 60°C , para posterior análise de ^{15}N .

As amostras foram analisadas quanto ao enriquecimento de ^{15}N (BREMNER & EDWARDS, 1965) em espectrômetro de massa VARIAN-MAT-230 da Seção de Ciências Ambientais do CENA.

3.1.2. Etapa 2. Cultivo do milho e feijão.

O plantio foi feito em fevereiro de 1991. Antes do plantio do feijão e do milho, foi realizada nova análise química do solo (Tabela 2). A adubação foi feita de acordo com a recomendada pela análise com os seguintes nutrientes: 100 kg de P/ha; 50 kg de K/ha; 1 tonelada/ha de calcário dolomítico.

Tabela 2. Análise química do solo Terra Roxa Estruturada utilizado no experimento (etapa 2).

pH	MO	N	Al^{+3}	H^+	H+Al	Ca^{+2}	Mg^{+2}	K^+	P
CaCl	%		mg/100 g TFSA					ppm	
4,75	3,8	0,09	0,4	0,2	0,60	1,2	0,3	0,1	13,0

A seguir é apresentado o esquema dos lisímetros no campo com os respectivos tratamentos:

Tratamento 1. Consórcio feijão - milho:

Tratamento 2. Feijão em monocultivo:

Em cada lisímetro (idem ao anterior) foi plantado feijão nodulante na sub-parcela I e soja não-nodulante na sub-parcela II, como se segue:

Em cada sub-parcela foram plantadas três linhas de feijão (ou soja não nodulante) no monocultivo, e uma linha de feijão (ou soja não nodulante) entre duas linhas de milho no sistema consorciado, de acordo com os esquemas mencionados, espaçadas de 30 cm. A densidade de plantas de feijão e soja foi de 12 plantas/metro

linear, e a de milho 7 plantas/metro linear. O número final de plantas foi obtido após o desbaste de 15 plantas de feijão e soja, e 10 plantas de milho. As amostragens foram feitas nas linhas centrais.

Foram efetuadas duas épocas de amostragens, 40 e 70 dias após emergência. Cada tratamento foi repetido três vezes, perfazendo um total de seis lisímetros (doze sub-pacelas) em cada época de amostragem, totalizando doze lisímetros (24 sub-parcelas).

O feijão nodulante utilizado foi o *Phaseolus vulgaris*, cultivar Carioca inoculado com o *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, estirpe CIAT 899 através da peletização das sementes com inoculante turfoso produzido na Seção de Microbiologia do Solo do CENA. A soja (*Glycine max* L. Merril) não-nodulante foi a isolinha D-9331 proveniente do Centro Nacional de Soja/EMBRAPA. O milho (*Zea mays*) foi o cultivar Piranão de porte baixo proveniente do Departamento de Genética da ESALQ.

Aos 40 dias após a emergência coletaram-se as plantas de seis lisímetros correspondentes a cada tratamento. Os parâmetros analisados foram: N-total das plantas de milho, feijão e soja e o peso da matéria seca. O peso e número dos nódulos foram avaliados e a atividade da enzima nitrogenase determinada de acordo com HARDY et alii (1968). Aos 70 dias após a emergência foi avaliada a produção de grãos de feijão. A composição isotópica do feijão, milho e soja, foi determinada em ambas as épocas de coleta no material vegetal pelo método de Duma (PROKSCH, 1972) e a do N-mineral do solo pelo método de Rittemberg (BREMNER & EDWARDS, 1965) pela Seção de Ciências Ambientais do CENA.

A fixação de nitrogênio derivado do ar pelo feijão

(NDA) e o nitrogênio transferido do feijão para o milho (NT) foram calculados de acordo com as seguintes equações (FRIED & MIDDLEBOE, 1977):

a) Utilizando a soja não-nodulante:

$$\%NDA = 1 - \left(\frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ excesso feijão nodulante}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ excesso soja não-nodulante}} \right) \times 100 \dots\dots(1)$$

b) Utilizando o milho:

$$\%NDA = 1 - \left(\frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ excesso feijão nodulante}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ excesso milho}} \right) \times 100 \dots\dots(2)$$

c) Utilizando a composição isotópica do N do solo disponível às plantas.

$$\% NDA = 1 - \left(\frac{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ excesso feijão nodulante}}{\% \text{ átomos de } ^{15}\text{N} \text{ excesso N-mineral solo}} \right) \times 100. (3)$$

d) N-transferido (NT) do feijão para o milho (VALLIS et alii, 1967):

$$\% NT = 1 - \left(\frac{\% \text{ átomos } ^{15}\text{N} \text{ excesso milho subparcela I}}{\% \text{ átomos } ^{15}\text{N} \text{ excesso milho subparcela II}} \right) \times 100 \dots\dots(4)$$

e) N-transferido (NT) do feijão para o milho (TA & FARIS, 1987):

$$\% \text{ NT} = \left(\frac{R \text{ milho solteiro} - R \text{ milho consorciado}}{R \text{ milho solteiro} - R \text{ feijao consorciado}} \right) \times 100 \dots\dots\dots (5)$$

onde R = % de átomos excesso de ^{15}N

3.2. Experimento II. Efeito do fungo *Glomus clarum* no desenvolvimento das plantas e na transferência de N no consórcio milho e feijão.

Sementes de feijão *Phaseolus vulgaris* cv. "canadian wonder" e milho *Zea mays* cv. "sweet corn", obtidas do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Dundee-Escócia, foram crescidas sozinhas ou em consórcio em areia lavada esterilizada em um esterilizador térmico por uma hora a 100°C e colocadas posteriormente em vasos plásticos de 2 kg.

Os tratamentos utilizados foram o milho e o feijão solteiros e consorciados, com e sem inoculação com fungos micorrízicos. Utilizaram-se quatro repetições por tratamento, totalizando 24 vasos. Uma planta por vaso foi deixada após o desbaste, sendo no consórcio uma planta de feijão e uma de milho. Três repetições foram adicionadas nos tratamentos de feijão solteiro e em consórcio, para determinação da nodulação aos 45 dias após emergência (DAE).

A inoculação com o fungo micorrízico *Glomus clarum* foi feita por ocasião do plantio. Aproximadamente 300 esporos de *G. clarum* (Departamento de Ciências Biológicas - Universidade de Dundee) foram colocados a 5cm de profundidade na areia. Para que a microbiota fosse equivalente em todos os tratamentos, os vasos sem micorriza receberam o filtrado do inóculo do fungo micorrízico passado três vezes por filtro de diâmetro menor que 0,5 μ m para remoção completa de todos os esporos de *Glomus clarum*.

Na germinação as plantas de feijão foram inoculadas com

Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli* estirpe 3622 (Departamento de Ciências Biológicas - Universidade de Dundee). O *Rhizobium* foi crescido em meio YMA sólido e após dez dias as células foram removidas com solução salina, resultando em uma suspensão de aproximadamente 10^9 células/mL. Em cada vaso, 1 mL desta suspensão foi utilizada como inóculo.

As plantas cresceram em condições controladas de fotofase de 13 horas a 25 °C. Cada vaso recebeu 120 mL de solução nutritiva de "Hoagland", menos nitrogênio e fósforo, que foram substituídos respectivamente pela uréia na dose de 20 ppm de N no início do experimento, e pelo fosfato de rocha (28% de P_2O_5) na concentração de 0,2 g/kg de areia.

As plantas foram coletadas aos 73 dias após emergência (DAE) no início da formação de vagens para avaliação da nodulação e aos 93 DAE para analisar os seguintes parâmetros: peso da matéria seca em estufa de ar forçado por 72 horas e a porcentagem de nitrogênio na parte aérea através de combustão em analisador elementar, Modelo 1106 - Carlo Erba. Os nódulos do feijoeiro foram separados das raízes, pesados e contados. Em seguida 0,5 g de raiz foi retirada para determinação da colonização micorrízica de acordo com o método de PHILLIPS & HAYMAN (1970). Em todos os tratamentos foi feita a contagem do número de esporos na areia através do método de GERDEMANN (1963).

O cálculo do N_2 fixado foi feito considerando-se o N total do milho como o N do solo+fertilizante, e pela diferença entre as quantidades de N do feijão e do milho, calculou-se a o N proveniente da fixação.

Os dados foram analisados usando a análise de variância, cujas diferenças entre tratamentos foram determinadas pelo Teste T calculado para $P < 0,05$.

4. Resultados e discussão.

4.1. Experimento I. Transferência de N do feijão para o milho usando diluição isotópica de ^{15}N .

A marcação da matéria orgânica do solo, após o plantio de milho fertilizado com nitrato de potássio a 60% de átomos de ^{15}N em excesso, resultou no enriquecimento do N-orgânico e do N-mineral do solo, num período de dois anos (Tabela 3). No início do experimento, o N-mineral dos lisímetros apresentavam um enriquecimento de 0,388 % átomos de ^{15}N em excesso. Na segunda coleta, aos 45 DAE, 0,271 e na terceira coleta, 75 DAE, 0,363. O pequeno declínio no enriquecimento de ^{15}N observado aos 45 dias após o plantio do milho e feijão pode ter sido consequência da intensa absorção do N-mineral do solo pelas plantas, resultando na mineralização de N de uma fonte orgânica menos enriquecida. De fato, O N mineral (NO_3^- e NH_4^+) diminuiu durante o cultivo do milho e feijão, de 4,21 ppm no início para 0,50 ppm no final do experimento, indicando a exaustão do N mineral pela absorção radicular, e aos 70 DAE, quando as plantas já não absorviam N, houve um novo equilíbrio do ^{15}N -mineral. O N orgânico do solo não é uniformemente marcado por este método, sendo que o N adicionado imobilizado, embora resistente à mineralização, é mais prontamente mineralizável que o N

original do solo (BROADBENT & NAKASHIMA, 1967). Entretanto esses autores sugerem que após um determinado período, há uma reversão, aumentando a resistência do N adicionado e imobilizado à mineralização.

Tabela 3. N-mineral do solo e enriquecimento de ^{15}N , em diferentes épocas de amostragem dos lisímetros (DAE - dias após emergência).

	0 ¹	DAE 45	70
ppm	4,21	1,50	0,50
desvio	(0,9)	(0,3)	(0,2)
átomos % ^{15}N em excesso	0,388	0,271	0,363
desvio	(0,05)	(0,04)	(0,08)

¹O teor de N-orgânico foi de 0,095% com enriquecimento de 0,145 % de átomos ^{15}N em excesso.

Os dados de FREITAS (1984) indicam que após 60 dias da incorporação da matéria orgânica marcada, há uma remineralização do N, sendo que após esse período, o solo fica marcado com o isótopo ^{15}N . BODDEY & VICTORIA (1986), verificaram que após 18 meses da incorporação de matéria orgânica marcada, houve relativa estabilização no enriquecimento de ^{15}N de gramíneas que amostravam a composição isotópica destes solos.

Uma das vantagens deste sistema de marcação do solo com ^{15}N na forma de matéria orgânica, é a eliminação da planta controle como sistema não fixador (geralmente morfológica e fisiologicamente diferente). Outra vantagem na utilização desse método, é que o N-orgânico (enriquecido com ^{15}N) não inibe a fixação do N_2 atmosférico,

frequentemente prejudicada pelos métodos de diluição isotópica que envolvem adições de N-inorgânico ao solo (BROADBENT et alii, 1982; BOLLER & NOSBERGER, 1987).

Um resultado intrigante, no presente trabalho, foi encontrado com relação à soja não nodulante. Esperava-se que o enriquecimento de ^{15}N da soja solteira e consorciada com o milho fosse semelhante. Entretanto verificou-se que o enriquecimento da soja consorciada com o milho foi bem menor (Tabela 4), variando de 0,256 para 0,160 aos 45 DAE, e de 0,342 para 0,179 % de átomos de ^{15}N em excesso aos 75 DAE. Algumas suposições podem ser feitas para explicar tal fenômeno.

Tabela 4. Enriquecimento de ^{15}N do feijão, milho e soja coletados em diferentes épocas de amostragem, crescidos sozinhos ou em consórcio em lisímetros com solo marcado com ^{15}N (média de três repetições). DAE - dias após emergência.

	DAE	
	45	70
Feijão	0,042	0,026 a
Feijão + Milho	0,031	0,011 b
DMS (P<0,05)	n. s.	*
Milho	0,306 a	0,377 a
Milho + Feijão	0,269 b	0,300 b
DMS (P<0,05)	*	*
Soja	0,256 a	0,342 a
Soja + Milho	0,160 b	0,179 b
DMS (P<0,05)	*	*

Esta redução no enriquecimento de ^{15}N sugere que as plantas de soja estivessem fixando N_2 , hipótese descartada uma vez que

as plantas de soja não nodulante não apresentaram nenhum nódulo. Outra suposição seria que o padrão de absorção de N das plantas de soja não nodulante e milho fossem diferentes, porém o ^{15}N foi adicionado como matéria orgânica bem antes do início do plantio, e de acordo com a literatura, isto deveria reduzir ao mínimo qualquer diferença no enriquecimento de ^{15}N do nitrogênio absorvido devido ao padrão de absorção das plantas (GILLER & WITTY, 1987; CHALK, 1985; BODDEY & VICTÓRIA, 1986) .

A terceira suposição seria a diluição devido ao N da semente. O peso da matéria seca da parte aérea e o N total absorvido da soja consorciada, foram significativamente menores em ambas as coletas (Tabela 5) sendo que praticamente metade de todo o N total da soja consorciada era proveniente das reservas da semente, se admitirmos que as sementes de soja contribuem com aproximadamente 7 mg de N/semente. Isto poderia ter afetado o enriquecimento da soja não nodulante consorciada com milho. Nesse caso, o milho exerceu uma competição muito grande com a soja, removendo praticamente todo o N-mineral do solo, deixando muito pouco para absorção da soja.

Tabela 5. Peso da matéria seca e absorção de N na parte aérea de soja solteira e consorciada com milho, em duas épocas de coleta (média de três repetições).

	45 DAE		70 DAE	
	<u>g/planta</u>	<u>mg N</u>	<u>g/planta</u>	<u>mg N</u>
Solteira	1,51 a	29,9 a	3,3 a	36,1 a
Consórcio	0,95 b	14,0 b	1,0 b	5,8 b
DMS (P<0.05)	*	*	*	*

Entretanto, mesmo ocorrendo a diluição do ^{15}N pelo N da semente, esse fato não poderia ser responsável pela grande diferença de ^{15}N entre a soja solteira e consorciada. Resultados semelhantes foram encontrados por GILLER et alii (1991) em feijão não nodulante em consórcio com o milho e SILVA² com milho em solo cuja marcação com ^{15}N foi feito com adição de matéria orgânica. Uma das explicações dada por GILLER et alii (1991), é que a leguminosa não nodulante pode estimular, provavelmente através de excreções radiculares, a mineralização de N de uma fração da matéria orgânica menos enriquecida com ^{15}N . Provavelmente deve estar ocorrendo um período de instabilidade no enriquecimento de ^{15}N do solo devido à intensa absorção de N pelas plantas, afetando o enriquecimento das plantas devido a diferentes padrões de absorção.

Este fato deve ser melhor explorado, uma vez que muitos experimentos que quantificam a fixação de N_2 em diferentes espécies e cultivares de plantas utilizando a marcação do solo com matéria

¹ SILVA, P. M. (CENA. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba). Comunicação pessoal. 1991.

orgânica-¹⁵N. Atribue-se à fixação de N₂ qualquer diferença de enriquecimento de ¹⁵N com relação ao controle, e nesse caso, pode resultar em erro metodológico.

A produção de matéria seca, sementes do feijoeiro e N total foram significativamente maiores quando em consórcio com o milho aos 70 DAE, embora possa se notar uma tendência do aumento desses parâmetros já aos 45 DAE (Tabela 6). Esperava-se que com o aumento desses parâmetros houvesse uma fixação de nitrogênio mais ativa no feijão consorciado. Entretanto verificou-se que o peso da matéria seca dos nódulos, o número de nódulos e a atividade da enzima nitrogenase, foram praticamente semelhantes tanto para o feijão solteiro quanto para o consorciado (Tabela 7). PEREIRA et alii (1984) verificaram que o plantio consorciado aumenta a longevidade dos nódulos das leguminosas, e nesse caso apesar da atividade dos nódulos não ser maior que o cultivo solteiro, o maior tempo de permanência dos nódulos fixando N₂, pode ser a causa da maior quantidade de N₂ fixado no feijão consorciado. De acordo com WAHUA & MILLER (1978) e PORTES & CARVALHO (1983), a interceptação da luz é a principal causa da redução da produção do feijoeiro consorciado. No experimento realizado, o cultivar de milho foi o Piranão de baixo porte, que devido ao baixo teor de N-mineral no solo, não cresceu o suficiente para reduzir a incidência solar de maneira que diminuísse a produção do feijão. Nesse caso, no feijão solteiro houve maior competição intraespecífica comparado com a competição interespecífica do plantio consorciado, fato também observado por TA & FARIS (1987) e HAYNES (1980).

Tabela 6. Peso da matéria seca e absorção de N na parte aérea e sementes de feijão solteiro e consorciado com o milho (média de três repetições).

	P. aérea ¹		Sementes ²	
	g/planta	mg N	g/planta	mg N
Solteiro	5,11	176,7	7,19 b	275,1 b
Consórcio	4,97	168,5	12,2 a	427,9 a
DMS (P<0.05)	n.s.	n.s.	*	*

¹ correspondente à 1a. coleta - 45 DAE

² correspondente à 2a. coleta - 70 DAE

O peso da matéria seca do milho e o N total absorvido foram sempre maiores quando em consórcio com o feijão. Na primeira coleta (45 DAE), esses parâmetros não foram significativamente diferentes; já na segunda coleta (70 DAE), houve um aumento significativo tanto no peso da matéria seca, de 11,3 para 16,1 g como no N total absorvido, de 65,9 para 110,3 mg (Tabela 8).

Tabela 7. Peso da matéria seca e número dos nódulos, atividade da nitrogenase de feijão solteiro e consorciado com o milho (média de três repetições).

	mg/planta	número nódulos/ planta	N ₂ -ase ($\mu\text{mol}/\text{pta}/\text{h}$)
solteiro	216	114	17,52
consórcio	163	89	15,00
DMS (P<0.05)	n.s.	n.s.	n.s.

Na Tabela 4, verifica-se o enriquecimento de ^{15}N do feijão, milho e soja solteiros e consorciados, crescidos em um solo ao qual adicionou-se matéria orgânica marcada dois anos antes. Como se poderia prever, o feijão reduziu bastante seu enriquecimento de ^{15}N com relação ao enriquecimento do solo, milho ou soja, concluindo-se que a fixação de N_2 foi bastante eficiente. O enriquecimento de ^{15}N do milho aos 70 DAE (0,377) foi semelhante ao do N-mineral do solo (0,363). Pode-se verificar entretanto que quando o milho cresceu consorciado com o feijão, houve um empobrecimento significativo no teor de ^{15}N , de 0,306 para 0,269 na primeira coleta (45 DAE), e de 0,377 para 0,300 na segunda coleta (75 DAE). Este fato leva-nos a concluir que houve uma evidente transferência de N do feijão para o milho, uma vez que a única fonte de N capaz de reduzir o enriquecimento de ^{15}N no milho foi o N proveniente da fixação de N_2 .

A fixação biológica do N_2 no feijoeiro resultou em uma quantidade de N total bem maior e um baixo enriquecimento de ^{15}N quando comparado com o milho ou a soja não nodulante (Tabelas 4 e 9). A utilização do enriquecimento de ^{15}N da soja não nodulante, do milho solteiro ou do N-mineral do solo, resultou em valores semelhantes. Neste caso, como a proporção de N_2 proveniente da fixação foi maior que 80% aos 45 DAE, e maior que 90% aos 70 DAE, a variação no teor de ^{15}N na soja não nodulante, milho ou N-mineral tem pouca influência na estimativa do N_2 fixado. O feijão apresentou quantidades de N_2 fixado significativamente maiores quando consorciado com o milho aos 70 DAE, alcançando uma média de 92% de N_2 fixado ou 254 mg de N, quando

crescido solteiro, e 96% ou 410 mg de N quando consorciado (Tabela 9). O feijão acumulou aproximadamente quatro vezes mais N que o encontrado no milho, indicando que a quantidade de N disponível no solo era limitante (Tabelas 6 e 7).

Tabela 8. Peso da matéria seca e absorção de N na parte aérea de milho solteiro (consorciado com soja não nodulante) e consorciado com feijão (média de três repetições), em duas épocas de amostragem.

	45 DAE		70 DAE	
	g/planta	mg N	g/planta	mg N
Solteiro	4,45	64,1	11,3 b	65,9 b
Consórcio	5,14	71,9	16,1 a	110,3 a
DMS (P<0.05)	n.s.	n.s.	*	*

Tabela 9. N fixado pelo feijoeiro crescido sozinho ou em consórcio com o milho, utilizando como controle o enriquecimento de ^{15}N da soja (1), do milho (2) e do solo (3) aos 45 e 70 dias após emergência (DAE). Média de três repetições.

	45 DAE					
	% de N fixado			mg de N fixado/planta		
Feijão solteiro	83,4 ¹	----- ²	80,4 ³	147,4 ¹	----- ²	142,4 ³
Feijão consorciado	80,3	88,7	89,4	136,5	150,0	151,1
DMS (P<0,05)	n. s.	-	n. s.	n. s.	-	n. s.
	70 DAE					
	% de N fixado			mg de N fixado/planta		
Feijão solteiro	92,4 ¹	----- ²	91,9 ^{3b}	254,5 ^{1b}	----- ²	253,7 ^{3b}
Feijão consorciado	93,8	96,4	97,1 a	401,5 a	412,8	415,5 a
DMS (P<0.05)	n. s.	-	*	*	-	*

A quantificação da transferência de N do feijão para o milho foi calculada através da diluição isotópica, comparando-se o enriquecimento de ^{15}N do milho consorciado com o feijão, com o do milho consorciado com a soja não nodulante. Preferiu-se neste caso o consórcio do milho com uma leguminosa não nodulante para levar em conta a competição inter-específica pelo N. Houve pequena diferença na porcentagem de N transferida calculada pela equação de VALLIS et alli (1967) e TA & FARIS (1987) (Tabela 10). Utilizando-se da equação de VALLIS et alli (1967), verificou-se aos 45 DAE que 11,7% do N do milho foi transferido do feijão, o que corresponde a 8,48 mg de N, ou 5,23 % do N total do feijão. Aos 70 DAE, a porcentagem de N transferido foi

Tabela 10. N transferido do feijão para o milho calculado utilizando-se a equação (4) e (5). Média de três repetições.

45 DIAS APOS EMERGENCIA			
	N transferido para o milho Equação (4)		
	como% do N-milho	mg de N transferido	como % do N-feijão
Milho solteiro	-	-	-
Milho consorciado	11,70	8,48	5,23
DESVIO	(2,9)	(2,7)	(2,3)
45 DIAS APOS EMERGENCIA			
	N transferido para o milho Equação (5)		
	como% do N-milho	mg de N transferido	como % do N-feijão
Milho solteiro	-	-	-
Milho consorciado	13,02	9,45	5,84
DESVIO	(3,4)	(3,2)	(2,7)
70 DIAS APOS EMERGENCIA			
	N transferido para o milho Equação (4)		
	como% do N-milho	mg de N transferido	como % do N-feijão
Milho solteiro	-	-	-
Milho consorciado	19,92	22,20	5,33
DESVIO	(9,8)	(12)	(3,4)
70 DIAS APOS EMERGENCIA			
	N transferido para o milho Equação (5)		
	como% do N-milho	mg de N transferido	como % do N-feijão
Milho solteiro	-	-	-
Milho consorciado	20,49	22,82	5,50
DESVIO	(10)	(12)	(3,5)

de 20,49% do N do milho, correspondendo a 22,82 mg de N ou 5,50% do N total do feijão. Embora quase 23% do N do milho foi estimado ter vindo da transferência do feijão, não houve um efeito benéfico óbvio no N total do milho, uma vez que a limitação de N foi severa e restringiu o crescimento e acúmulo do N total nas plantas de milho e soja não nodulante.

Na Tabela 11, encontramos o balanço de N no consórcio milho e feijão. Considerando a transferência em um hectare, verificamos que apenas 3,8 kg de N/ha são transferidos do feijão para o milho. Como a diferença de N total entre o milho consorciado com a soja não nodulante e o milho consorciado com o feijão chega a 6,7 kg de N/ha, a diferença entre 3,8 e 6,7 kg é provavelmente proveniente do N do solo. De fato, quando verificamos a diferença de N total entre a soja não nodulante solteira e consorciada, constata-se que o milho em consórcio explora mais o N do solo, competindo com a soja. A absorção de N pelas gramíneas é normalmente estimulada pela presença de uma leguminosa (VALLIS et alii, 1977; HAYSTEAD & MARRIOTT, 1979). GILLER et alii (1991) também encontraram os mesmos resultados no consórcio milho e feijão, entretanto, devido ao ataque de insetos em seus experimentos, sugeriram novos estudos antes de concluir que a transferência de N tem pouca significância na agricultura. Após este estudo, podemos verificar que no consórcio milho e feijão, a transferência de N do feijão para o milho é de pouca significância, sendo as quantidades de N transferido da ordem de 4 kg de N/ha.

Tabela 11. Balanço de N no consórcio milho e feijão. Média de três repetições. Dados relativos à coleta aos 70 dias após emergência.

	mg/planta	kg/ha
N transferido ¹	22,20 (12)	3,8 (1,5)
Diferença de N-total entre milho consorciado e solteiro	44,41 (16)	6,7 (2,4)
Diferença de N-total entre soja consorciada e solteira	30,28 (10)	3,8 (1,3)

¹ calculado pela equação (4). Os números entre parenteses indicam o desvio padrão.

A partir dos resultados obtidos com outras associações de leguminosas e gramíneas, também foi concluído que a quantidade total transferida é pequena e de pouca significância para a gramínea (LEDGARD et alii, 1985; EAGLESAHM et alii, 1981; BAREA et alii, 1989 e GILLER et alii, 1991). LEDGARD et alii (1985) trabalhando com trevo, verificaram que apenas 2,2% do N do trevo foi transferido para a gramínea em consórcio em um ano da duração do experimento. VASILAS & HAM (1985) encontraram que entre 5,5 e 6,7 kg N/ha são transferidos da soja nodulante para a soja não nodulante (12% do N total). GILLER et alii (1991) verificaram pouca transferência de N do feijão para o milho, totalizando 9 mg de N ou 10 % do N total do feijão. No presente experimento, verificou-se também pequenas quantidades de N transferido do feijão para o milho (Tabelas 10 e 11).

A transferência do N₂ fixado para o milho pode ser pela excreção de N pelas raízes (AGBOOLA & FAYEMI, 1972), ou pela decomposição dos nódulos ou raízes (TA & FARIS, 1987). De acordo com SIMPSON (1976), a excreção de N parece ser o mecanismo mais rápido de transferência, principalmente na forma de ácido aspártico e produtos correlacionados. Existe um período mínimo no qual a transferência começa a ser significativa, dependendo das várias associações leguminosas/gramíneas. Segundo LEDGARD et alii (1985), este período pode variar de poucas semanas até alguns meses. No caso do milho e feijão, foi verificado que apesar da quantidade não ser considerável, houve uma transferência já aos 45 DAE, aumentando aos 70 DAE. Conclui-se que aos 45 DAE, a transferência se deu principalmente pela excreção de N pelas raízes noduladas, enquanto aos 70 DAE, os mecanismos de decomposição dos nódulos e raízes atuaram mais intensamente.

Não é possível, nesse experimento distinguir entre o N excretado pelo feijão, N liberado pela decomposição de raízes, N proveniente da senescência dos nódulos e da transferência direta através das hifas de fungos micorrízicos. Embora a transferência de N do feijão para o milho não tenha sido considerável, em solos de baixa fertilidade, a transferência de N pode ser importante na sobrevivência do milho, caso a liberação do N seja suficientemente rápida para aliviar o período de estresse inicial.

A combinação da capacidade de fixação de N₂ do feijão e das consideráveis vantagens da cultura consorciada com milho quando comparada com estas espécies em monocultivo, apresenta vantagens

potenciais especialmente onde o emprego de grandes quantidades de insumos não é prático ou econômico.

4.2. Experimento II. Efeito do fungo *Glomus clarum* no desenvolvimento das plantas e na transferência de N no consórcio milho e feijão.

A inoculação com *Glomus clarum* ocasionou um aumento significativo no peso da matéria seca da parte aérea e sementes do feijoeiro, independente de estar ou não consorciado com o milho (Tabela 12). Pode-se verificar que de uma maneira geral houve um acréscimo de duas vezes no peso da parte aérea com a inoculação do fungo. Quanto à nodulação, a inoculação com o fungo *G. clarum* foi benéfica apenas quando o feijão estava consorciado com o milho mostrando que a consorciação reduziu o peso e número dos nódulos, e que a inoculação anulou este efeito (Tabela 13).

O N total, absorvido do solo e N₂ fixado simbioticamente, podem ser visto na Tabela 14. A quantidade absorvida de N foi significativamente maior em todos os tratamentos inoculados com fungo MVA independente do consórcio com o milho. A quantidade de N nas plantas micorrizadas aumentou 1,9 vezes no feijão solteiro e 2,5 vezes no feijão consorciado, indicando o potencial da micorriza em favorecer o feijoeiro consorciado (Tabela 14). A quantidade de N₂

fixado pelo feijão solteiro foi 2 vezes maior quando inoculado com fungo micorrízico, alcançando 138 mg N/planta, e no feijão consorciado, esta quantidade foi 3 vezes maior, atingindo 141 mg N/planta. A

Tabela 12. Efeito de *G. clarum* no peso da matéria seca da raiz, parte aérea e sementes de feijão solteiro e consorciado com o milho (média de quatro repetições).

		P. aérea	Raiz	Sementes
		g/planta		
solteiro	-MVA	3,76 b	0,64 b	0,29 b
	+MVA	5,77 a	1,03 a	2,37 a
consórcio	-MVA	3,23 b	0,51 b	0,66 b
	+MVA	6,64 a	0,87 ab	1,51 a
DMS (P<0.05)		2,01	0,15	0,80

porcentagem de N₂ fixado simbioticamente foi sempre maior nos tratamentos inoculados com fungos MVA, sendo diminuída nos tratamentos consorciados com milho.

CRUSH (1974); HAYNES (1980) e BAREA et alii (1989) verificaram que as leguminosas infectadas com MVA competem mais eficientemente com a gramínea principalmente com relação ao fósforo.

Vários pesquisadores têm mostrado que a infecção MVA em leguminosas proporciona um aumento considerável sobre a produção de matéria seca,

Tabela 13. Efeito de *G. clarum* no peso da matéria seca e número dos nódulos, em feijão solteiro e consorciado com o milho (média de três repetições).

		mg/planta	número/planta
solteiro	-MVA	150,4 a	227 a
	+MVA	184,5 a	196 a
consórcio	-MVA	102,8 b	123 b
	+MVA	183,2 a	223 a
DMS (P<0.05)		39,2	69

nódulos e atividade da nitrogenase (DAFT & EL-GIAHMI, 1974; MOSSE, 1977 e BONETTI, 1984). Uma das explicações do grande desenvolvimento das leguminosas micorrizadas, se baseia no fato de que o processo de fixação do N₂ requer grandes quantidade de energia na forma de ATP (BAREA & AZCON-AGUIILLAR, 1983), e nesse caso a micorriza pode estar contribuindo para melhor nutrição de P, sendo o efeito na fixação de N₂ secundário (MOSSE, 1977).

A colonização micorrízica atingiu níveis adequados nas raízes das plantas, variando de 79,5 a 88,8% nas plantas de feijão solteiro e consorciado respectivamente, e 81,1 a 72,1% para o milho solteiro e consorciado respectivamente. As plantas não inoculadas não

apresentaram nenhuma colonização micorrizica. Apesar de não ser significativa, verificou-se uma pequena tendência no aumento da colonização quando o feijão foi consorciado. Quanto ao número de

Tabela 14. Efeito de *G. clarum* na quantidade de N absorvida pela parte aérea do feijoeiro solteiro e consorciado com o milho (média de quatro repetições).

		% de N	mg/planta	N ₂ fixado ¹	
				%	mg N
solteiro	-MVA	2,33 b	78,48 b	87 ab	68 b
	+MVA	2,88 a	150,00 a	92 a	138 a
consórcio	-MVA	2,10 b	65,35 b	72 b	47 b
	+MVA	2,32 b	163,56 a	86 ab	141 a
DMS (P<0.05)		0,48	38,24	21	37,04

¹Calculada utilizando-se o N total do milho como referência.

esporos na areia, também foi verificado um maior número no tratamento com consórcio, apesar de não ser significativo (Tabela 15 e 16). Temos observado em experimentos de produção de esporos, que gramíneas e leguminosas crescendo juntas, favorecem um maior número de esporos. Tal fato pode estar relacionado com a intensa absorção dos nutrientes do solo pelas plantas, e nessas condições, as MVA podem beneficiar-se, uma vez que substratos pobres em nutrientes normalmente são mais favoráveis ao desenvolvimento da MVA. Geralmente as leguminosas são

Tabela 15. Infecção micorrízica em raízes de feijão solteiro e consorciado com o milho e número de esporos no solo. (Média de quatro repetições).

		% de infecção micorrízica	número de esporos/50cc
solteiro	-MVA	0	0
	+MVA	79,5	6356
consórcio	-MVA	0	0
	+MVA	88,8	8846
DMS (P<0.05)		18,4	3427

menos eficientes na absorção de nutrientes que as gramíneas, sendo nesse caso mais micotróficas (POWELL, 1976). A presença da leguminosa nos plantios consorciados, pode servir como fonte de inóculo para o milho, aumentando o potencial de esporos de fungos MVA do solo sob cultivo.

Quanto ao milho, a inoculação com o fungo MVA, não resultou em aumento significativo do peso da parte aérea, verificando-se aqui apenas um efeito no consórcio (Tabela 16). Embora não seja significativo, pode-se notar uma tendência no aumento do peso

da matéria seca da parte aérea com a inoculação com fungo MVA (Tabela 17). Entretanto, esta diferença é significativa quando se analisa o conteúdo de N total na parte aérea do milho (Tabela 18). Nesse caso, o milho micorrizado consorciado com feijão apresentou uma quantidade de N total maior que todos os tratamentos, aumentado de 11,76 mg para 16.04

Tabela 16. Efeito de *G. clarum* no peso da matéria seca da raiz e parte aérea de milho solteiro e consorciado com feijão (média de quatro repetições).

		P. aérea	Raiz
		g/planta	
solteiro	-MVA	0,60 b	0,24
	+MVA	0,71 b	0,25
consórcio	-MVA	1,23 a	0,24
	+MVA	1,42 a	0,24
DMS (P<0.05)		0,50	0,10

mg N/planta. No milho solteiro, não houve diferença entre a inoculação ou não do fungo MVA de 8,32 para 9,22 mg de N/planta, respectivamente. No milho consorciado, mesmo as plantas não inoculadas mostraram um pequeno aumento no teor de N total quando comparadas com o milho solteiro, variando de 8,32 para 11.76 mg N/planta, indicando que o feijão pode estar contribuindo com algum N para o milho, e neste caso, a micorriza pode ter um importante papel. A importância da MVA em

promover a transferência de N entre leguminosas e gramíneas, tem gerado controvérsias (FRANCIS et alii, 1986; BAREA et alii, 1989). Vários autores tem encontrado um efeito positivo da MVA na transferência de N (BAREA et alii, 1989; KESSEL et alii, 1985; FRANCIS et alii, 1986;

Tabela 17. Infecção micorrízica em raízes de milho solteiro e consorciado com o feijão e número de esporos no solo (média média de quatro repetições).

		% de infecção micorrízica	número de esporos/50cc
solteiro	-MVA	0	0
	+MVA	81,1	5162
consórcio	-MVA	0	0
	+MVA	72,1	8846
DMS (P<0.05)		15,4.	3842.

HAYSTEAD et alii, 1988), porém outros não (GILLER et alii, 1991). No presente experimento, a quantidade de N transferido variou de 3,44 e 6,82 mg de N/planta no milho não micorrizado e micorrizado respectivamente (Tabela 19). A porcentagem de N transferido representou 29,3% e 42,5% do N do milho não micorrizado e micorrizado respectivamente; entretanto não se pode concluir que houve um efeito benéfico óbvio, uma vez que a limitação de N foi severa restringindo o crescimento e acúmulo de N total no milho (comparar com experimento 1).

Com relação ao N do feijão, a quantidade de N transferido foi equivalente a 5,3 e 4,2% para o feijão não micorrizado e micorrizado respectivamente. As quantidades de N transferido foram inferiores

Tabela 18. Efeito de *G. clarum* na quantidade de N absorvida pelo milho solteiro e consorciado com o feijão (média de quatro repetições).

		% de N	mg/planta
solteiro	-MVA	1,40	8,32 b
	+MVA	1,50	9,22 b
consórcio	-MVA	1,00	11,76 b
	+MVA	1,18	16,04 a
DMS (P<0.05)		0,63	4,32

quando comparadas com o Experimento I (campo) onde encontram-se valores maiores (22,82 mg N/planta). As micorrizas parecem ter um efeito positivo na quantidade de N transferida. Em condições de campo verificadas no Experimento I, as culturas formaram micorrizas normalmente.

Tabela 19. Quantidade de N transferido do feijão para o milho, calculado pela diferença de N total do milho solteiro e consorciado, e sua porcentagem em relação ao N total do milho e feijão.

		mg N/planta	% do N-milho	% do N-feijão
consórcio	-MVA	3,44	29,3	5,3
	+MVA	6,82	42,5	4,2
DMS (P<0.05)		2,76	10,3	1,3

Quanto à forma pelo qual o N é transferido até o milho, pode ser pela transferência direta através das hifas dos fungos micorrízicos (KESSEL et alii, 1985; FRANCIS et alii, 1986) durante o período de crescimento das plantas, ou pela absorção do N proveniente da decomposição dos nódulos, raízes e exudatos (BOLLER & NOSBERGER, 1987). No presente experimento, todos esses processos foram considerados na transferência de N do feijão para o milho.

5. Conclusão.

O experimento baseado na diluição isotópica de ^{15}N em solo ao qual foi previamente incorporado matéria orgânica- ^{15}N , mostrou que ocorre a transferência de N do feijão para o milho.

Houve também grande quantidade de N_2 fixado pelo feijoeiro tanto crescendo sozinho como em consórcio.

O fungo *Glomus clarum* favoreceu o aumento no peso da matéria seca e o N total em plantas micorrizadas. O feijoeiro micorrizado resultou em plantas bem noduladas capazes de fixar grandes quantidades de N_2 e transferir parte do N para o milho consorciado.

Referências Bibliográficas.

- AGBOOLA, A.A. & FAYEMY, A.A.A. Fixation and excretion of nitrogen by tropical legumes. *Agronomy Journal*, Madison, **64**: 409-12, 1972.
- AIDAR, H. & VIEIRA, C. Cultura associada de feijão com milho. III. Efeito de populações de plantas sobre o feijão da seca. *Revista Ceres*, Viçosa, **26**: 465-73, 1979.
- ALLOS, H.F. & BARTHOLOMEW W.F. Replacement of symbiotic fixation by available nitrogen. *Soil Science*, Baltimore, **87**: 61-6, 1959.
- BAREA, J.M. & AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen fixing plants. In: BRADY, N.C., ed. *Advances in Agronomy*, New York, Academic Press, 1983. v.36, p.1-47.
- BAREA, J.M.; AZCON-AGUILLAR, C.; AZCON, R. Vesicular arbuscular mycorrhiza improve both symbiotic N₂ fixation and N uptake from soil as assessed with ¹⁵N technique under field conditions. *New Phytologist*, London, **106**: 717-25, 1987.

BAREA, J.M.; EL-ATRACH, F.; AZCON, R. Mycorrhiza and phosphate interactions as affecting plant development, N₂-fixation, N-transfer and N-uptake from soil in legume-grass mixtures by using a ¹⁵N dilution techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 21: 581-9, 1989.

BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. *Plant and Soil*, The Hague, 90: 265-92, 1986.

BOLLER, B.C. & NOSBERGER, J. Symbiotical fixed nitrogen from field-grown white and red clover mixed with ryegrasses at low levels of ¹⁵N fertilization. *Plant and Soil*, The Hague, 104: 209-26, 1987.

BONETTI, R. Efeito de micorrizas vesiculares arbusculares na nodulação, crescimento e absorção de fósforo e nitrogênio em siratro. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, Campinas, 8: 189-92, 1984.

BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. et alii, ed. *Methods of soil analysis*. Part 2. *Chemical and microbiological properties*. Wisconsin, American Society of Agronomy, 1965. p. 1149-78. (Agronomy, 9)

BREMNER, J.M. & EDWARDS, A.P. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soil. I. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonium. *Soil Science Society of American Proceedings*, Madison, **29**: 504-7, 1965.

BROADBENT, F.E. & NAKASHIMA, T. Reversion of fertilizer nitrogen in soils. *Soil Science Society American Proceedings*, Madison, **31**: 648-52, 1967.

BROADBENT, F.E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, G.Y. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. *Agronomy Journal*, Madison, **74**: 625-8, 1982.

BUTLER, J.H. & BATHURST, N.O. The underground transference of nitrogen from clover to associated grass. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 7., Palmerston North, 1956. *Proceedings*. New Zealand, Academic Press, 1956. p.168-75.

BUTLER, J.H. & LADD, J.N. Growth and nitrogen fixation by *Medicago littoralis* in pot experiments: effect of plant density and competition from *Lolium multiflorum*. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, **17**: 335-61, 1985.

CHALK, P.M. Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, **17**:

389-410, 1985.

CHIARELLO, N.; HICKMAN, J.C.; MOONEY, M.A. Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorus in a community of annual plants. *Science*, Washington, 217: 941-3, 1982.

CRUSH, J.R. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VII. Growth and nodulation of some herbage legumes. *New Phytologist*, London, 73: 743-9, 1974.

DAFT, M.J. & EL-GIAHMI, A.A. Effect of endogone mycorrhiza on plant growth. VII. Influence of infection on the growth and nodulation in French Bean (*Phaseolus vulgaris*). *New Phytologist*, London, 73: 1139-47, 1974.

DANSO, S.K.A.; ZAPATA, F.; HARDARSON, G.; FRIED, M. Nitrogen fixation in favabeans as affected by plant population density in sole or intercropped systems with barley. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 19: 411-5, 1987.

DAVIES, W.E. The yields and composition of lucerne grass and clover under different systems of management. V. Method of growing lucerne and meadow fescue. *Journal of the British Grassland Society*, Aberystwyth, 19: 263-70, 1964.

DILZ, K. & MULLER, E.G. Effect of associated growth on yield and nitrogen content of legumes and grasses plants. *Plant and Soil*, The

Hague, 16: 229-37, 1962.

EAGLESHAM, A.R.J.; AYANABA, A.; RAO, V.R.; ESKEW, D.L. Improving the nitrogen nutrition of maize *Zea mays* by intercropping with cowpea *Vigna unguiculata*. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 13: 169-71, 1981.

FARIS, M.A.; De ARAUJO, M.R.A.; LIRA, M.D.A.; ARCOVERDE, A.S.S. Yield stability in intercropping studies of sorghum *Sorghum bicolor* or maize *Zea mays* with cowpea *Vigna unguiculata* or common bean *Phaseolus vulgaris* under different fertility levels in northeastern Brazil. *Canadian Journal of Plant Science*, Guelph, 63: 789-800, 1983.

FRANCIS, C.A.; PRAGER, G.; TEJADA, G. Effects of relative planting dates in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays* L.) intercropping patterns. *Field Crops Research*, Amsterdam, 5: 45-54, 1982.

FRANCIS, R. & READ, D.J. Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature*, London, 307: 53-6, 1984.

FRANCIS, R.; FINLAY, R.; READ, D.J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in inter and intra-specific combinations of host plants. *New Phytologist*, London, 103: 103-11, 1986.

FREITAS, J.R. de. Dinâmica do nitrogênio em um solo Terra Roxa Estruturada (TRE) tratado com matéria orgânica vegetal e sulfato de amônio enriquecidos com isótopo ^{15}N . Piracicaba, 1984. 116 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FRIED, M. & BROESHART, H. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil*, The Hague, **43**: 707-11, 1975.

FRIED, M. & MIDDLEBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant and Soil*, The Hague, **47**: 713-5, 1977.

GERDEMANN, J.W. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Transactions British of the Mycological Society*, London, **46**: 235-44, 1963.

GILLER, K.E. & WITTY, J.F. Immobilized ^{15}N -fertilizer sources improve the accuracy of field estimates of N_2 fixation by isotope dilution. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, **19**: 459-63, 1987.

GILLER, K.E.; ORMESHER, J.; AWAH, F.M. Nitrogen transfer from *Phaseolus* bean to intercropped maize measured using ^{15}N -enrichment and ^{15}N -isotope dilutions methods. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, **23**: 339-46, 1991.

- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation. Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, Lancaster, **43**: 1185-207, 1968.
- HAYMAN, D.S. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany*, Atlanta, **61**: 944-63, 1983.
- HAYMAN, D.S. Mycorrhizae of nitrogen-fixing legumes. *Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, Oxford, **2**: 121-45, 1986.
- HAYNES, R.J. Competitive aspects of the grass-legume association. *Advances in agronomy*, New York, **33**: 227-61, 1980.
- HAYSTEAD, A. & MARRIOTT, C. Transfer of legume nitrogen to associated grass. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, **11**: 99-104, 1979.
- HAYSTEAD, A.; MALAJCZUK, N.; GROVE, T.S. Underground transfer of nitrogen between pastures plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, London, **108**: 417-23, 1988.
- HEAP, A.J. & NEWMAN, E.I. Links between roots by hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*, London, **85**: 169-71, 1980.
- KESSEL, C.VAN; & ROSKOSKI, J.P. Row spacing effects on N₂-fixation,

N-yield and soil N uptake of intercropped cowpea and maize. *Plant and Soil*, The Hague, **111**: 17-23, 1988.

KESSEL, C. VAN.; SINGLETON, P.W.; HOBEN, H. Enhanced N-transfer from soybean to maize by VAM fungi. *Plant Physiology*, Lancaster, **79**: 562-3, 1985.

LEDGARD, S.F.; FRENEY, J.R.; SIMPSON, J.R. Assessing nitrogen transfer from legumes to associated grasses. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, **17**: 575-7, 1985.

MACAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE-ARANGO, H.; WOODHOUSE, JUNIOR, W.W. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ¹⁵N. *Agronomy Journal*, Madison, **50**: 334-7, 1958.

MEDINA, J.C. Aspectos Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1., Viçosa, 1972. *Anais*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1972. p. 3-106.

MORRIS, D.R. & WEAVER, R.W. Competition for nitrogen-15 depleted ammonium nitrate and nitrogen fixation in arrowleaf clover-gulf ryegrass mixtures. *Soil Science Society of American Journal*, Madison, **51**: 115-9, 1987.

MOSSE, B. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review Phytopathology*, Paloalto, **11**: 171-96, 1973.

MOSSE, B. The role of mycorrhiza in legumes nutrition on marginal soils. In: VINCENT, J.M.; WHITNEY, A.S.; BOSE, J., ed. *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Hawaii, University of Hawaii, 1977. p. 275-92.

MOSSE, B.; POWELL, C.L.; HAYMAN, D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IX. Interaction between VA mycorrhiza rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. *New Phytologist*, London, **76**: 331-42, 1976.

MUNNS, D.N. & MOSSE, B. Mineral nutrition of legume crops. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H., ed. *Advances in Legume Sciences*. London, HMSO, 1980. p. 115-25.

OFORI, F.; PATE, J.S.; STERN, W.R. Evaluation of N₂-fixation and nitrogen economy of a maize/cowpea intercrop system using ¹⁵N dilution methods. *Plant and Soil*, The Hague, **102**: 149-60, 1987.

PATE, J.S. & DART, P.J. Nodulation studies in legumes. IV. The influence of inoculum strain and time of application of ammonium nitrate on symbiotic response. *Plant and Soil*, The Hague, **15**: 329-46, 1961.

PEREIRA, P.A.A.; ROCHA, R.E.M.DA; ARAUJO, R.S. Nodulação do feijoeiro em monocultivo e associado com fileiras de milho maduro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Rio de Janeiro, **19**: 951-4, 1984.

PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British of Mycological Society*, London, **55**: 158-60, 1970.

PORTES, T.A. & CARVALHO, J.R.P.DE. Area foliar, radiação solar, temperatura do ar e rendimentos em consorciação e em monocultivo de diferentes cultivares de milho e feijão. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Rio Janeiro, **18**: 755-62, 1983.

POWELL, C.L. Mycorrhizal fungi stimulate clover growth in New Zealand country soils. *Nature*, London, **264**: 436-8, 1976.

PROKSCH, G. Application of mass and emission spectrometry for $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ratio determinations in biological material (Dumas Method). In: SYMPOSIUM ON ISOTOPES AND RADIATION IN SOIL PLANT RELATIONSHIP INCLUDING FORESTRY. Vienna, 1972. *Proceedings*. Vienna, IAEA, 1972. p. 217-25.

RAO, M.R.; REGO, T.J.; WILLEY, R.W. Response of cereals to nitrogen in sole cropping and intercropping with different legumes. *Plant and Soil*, The Hague, **101**: 167-77, 1987.

RUSCHEL, A.P.; SALATI, E.; VOSE, P.B. Nitrogen enrichment of soil and plant by *Rhizobium phaseoli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Plant and*

Soil, The Hague, **51**: 425-9, 1979.

SANTA-CECILIA, F.C. & VIEIRA, C. Associated cropping of beans and maize.

I. Effects of bean cultivars with different growth habits.

Turrialba, San Jose, **28**: 19-23, 1978.

SEIFERT, N.F. *Leguminosas para pastagens no Brasil Central*. EMBRAPA -

DID, 1982. 131 p. (Documento, 7).

SIMPSON, J.R. Transfer of nitrogen from three pasture legumes under periodic defoliation in a field environment. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, **16**: 863-70, 1976.

SMITH, S.E. & DAFT, M.J. Interaction between growth phosphate content and nitrogen fixation in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Medicago sativa*. *Australian Journal of Plant Physiology*, Melbourne, **4**: 403-14, 1977.

TA, T.C. & FARIS, M.A. Species variation in the fixation and transfer of nitrogen from legumes to associated grasses. *Plant and Soil*, The Hague, **98**: 265-74, 1987.

TA, T.C.; MACDOWALL, F.D.H.; FARIS, M.A. Excretion of nitrogen from nitrogen fixed by nodulated roots of alfalfa *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **64**: 2063-67, 1986.

VALLIS, I. Soil nitrogen changes under continuously grazed legume-grass pasture in sub-tropical coastal Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, Melbourne, 12: 495-501, 1972.

VALLIS, I.; HENZELL, E.F.; EVANS, T.R. Uptake of soil nitrogen by legumes in mixed swards. *Australian Journal of Agricultural Research*, Melbourne, 28: 413-25, 1977.

VALLIS, I.; HAYDOCK, K.P.; ROSS, P.J.; HENZELL, E.F. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pastures legumes. III. the uptake of small additions of ^{15}N -labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville lucerne. *Australian Journal of Agriculture Research*, Melbourne, 18: 865-77, 1967.

VASILAS, B.L. & HAM, G.E. Intercropping nodulating and non-nodulating soybeans: effects on seed characteristics and dinitrogen fixation estimates. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 17: 581-2, 1985.

VEST, G. Nitrogen increases in a non-nodulating soybean genotype grown with nodulating genotypes. *Agronomy Journal*, Madison, 63: 356-9, 1971.

VIEIRA, C. Cultivo consorciado de milho com feijão. *Informe*

Agropecuário, Belo Horizonte, 4: 42-5, 1978.

VIEIRA, C.; AIDAR, H.; VIEIRA, R.F. Populações de plantas de milho e feijão no sistema de cultura consorciada utilizadas na Zona da Mata de Minas Gerais. *Revista Ceres*, Viçosa, 22: 286-90, 1975.

VOSE, P.B. & VICTORIA, R.L. Re-examination of the limitation of nitrogen-15 isotope dilution techniques for the field measurement of dinitrogen fixation. In: HAUCK, R.D.; WEAVER, R.W., ed. *Field Measurement of Dinitrogen Fixation and Dinitrification*. Madison, SSSA, 1986. p. 23-42. (Special Publication, 18).

WAHUA, T.A.T. & MILLER, D.A. Effect of intercropping on soybean N fixation and plant composition on associated sorghum and soybean. *Agronomy Journal*, Madison, 70: 292-5, 1978.

WARNER, A. Colonization of organic matter by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Transactions British of the Mycological Society*, London, 82: 352-4, 1984.

WHITNEY, A.S. Role of the legume mixed pasture. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TECHNOLOGY FOR TROPICAL AGRICULTURE, Cali, 1981. *Proceedings*. Cali, CIAT, 1981. p. 80.

WILLEY, R.W. Intercropping - its importance and research needs. I. Competition and yield advantages. *Field Crop Abstracts*,

Aberystwyth, 32: 1-10, 1979.

WITTY, J.F. Estimating N₂ fixation in the field using ¹⁵N-labelled fertilizer: some problems and solutions. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 15: 631-9, 1983.