UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GREGORI DA ENCARNAÇÃO FERRÃO

Emissões de N_2O pela parte aérea de plantas de milho (*Zea mays* L.)

Piracicaba
2013

GREGORI DA ENCARNAÇÃO FERRÃO

Emissões de N_2O pela parte aérea de plantas de milho (*Zea mays* L.)

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Brigitte Josefine Feigl

Piracicaba

2013

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Ferrão, Gregori da Encarnação

Emissões de N_2O pela parte aérea de plantas de milho (*Zea mays* L.) / Gregori da Encarnação Ferrão; orientadora Brigitte Josefine Feigl. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

70 f.: il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Absorção de água pelas plantas 2. Ambiente protegido (plantas) 3. Aquecimento global 4. Desnitrificação 5. Efeito estufa 6. Fertilizantes nitrogenados 7. Óxido nitroso 8. Translocação vegetal 9. Transpiração vegetal I. Título

CDU (581.116 + 631.461.4) : 546.172.5

Aos meus pais Joe e Marlene, minha irmã Natali, dedico, na mera esperança de um dia retribuir todas as formas de amor que me acolheram nesta existência.

Isabela e Heitor dedico e ofereço, muito além deste, também o meu amor!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço especialmente à orientadora Profa. Dra. Brigite Josefine Feigl, pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto de pesquisa, incentivo, confiança, sugestões e acima de tudo pela amizade ao longo destes sete anos em "cena".

Aos Prof. Doutores: Joe Luiz Ferrão, Marlene Inês da Encarnação Ferrão e Natali da Encarnação Ferrão pelos ensinamentos da vida. Ciclos que se reiniciam. Obrigado por tudo!

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Clemente Cerri e Prof. Dr. Carlos Eduardo Cerri pelos valiosos conselhos e suporte científico.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez y Huaman do Departamento de Biologia da FFCLRP - USP e seu grupo de pesquisa pelo suporte científico e amizade durante a breve estada em Ribeirão Preto.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate do Laboratório Max Feffer de Genética de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ - USP pelo compartilhamento do imenso conhecimento e pela ajuda (já de longa data!) e à Mônica, técnica responsável por este laboratório, que sempre se preocupou com o bem estar coletivo e perfeito funcionamento de tudo ao seu redor.

Aos amigos Dr. Marcos Siqueira Neto (pelo sorriso!) e Leidivan Frazão.

Ao Prof. Dr. Martial Bernoux do *Institut de recherche pour le développement-IRD* da França pelas sugestões inseridas neste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Lázaro Eustáquio Peres pelas dúvidas e incentivo sempre.

Aos funcionários do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do CENA - USP, Lílian, Ralf, Dagmar, Admilson, Zezinho e Sandra pelo apoio durante a fase experimental deste projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcílio de Almeida e sua equipe, em especial Katherine e Gilvano, pelas sugestões, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Gerhard Bandel, pela disponibilização da área experimental sob cultivo de milho e amizade desde a chegada em Piracicaba.

Ao Prof. Dr. Angelocci pelos direcionamentos e esclarecimentos.

Aos amigos Márcio (cunhado!), Pepe, Rafa e Diego sempre presentes nas andanças de minha vida.

A todos os amigos do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental do CENA – USP.

Aos amigos Matheus, Japa, Tetê, Laís, Lindo, Linda e Joel que me acompanharam em Ribeirão Preto em parte deste doutoramento. Obrigado!

À bibliotecária Marília Ribeiro Garcia Henyei pelas preciosas correções e formatação desta tese e ao amigo Romeu pela paciência transmitida.

À CAPES pela bolsa concedida durante o curso de Doutoramento.

À FAPESP pelo suporte financeiro (processo 2011/ 03055-5) do projeto "*Fontes de emissão de metano e óxido nitroso pela sucessão "soja-milho" nos estados de Mato Grosso e Rondônia*" sob coordenação da Profa. Dra. Brigitte J. Feigl.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e Universidade de São Paulo pela oportunidade de participar deste prestigiado programa de Doutoramento.

Ao pessoal da CPG/CENA, em especial Daiane e Fábio pela paciência e solicitude sempre.

À equipe do transporte do CENA, Claudião, Oldack, Bola, Ademir e Luisinho pela amizade e pela ajuda durante todas as coletas de solos. Muito obrigado!

Às freiras e à Dara do pensionato *Vita et Pax* pelo acolhimento e paz durante a estada em Ribeirão Preto.

Aos amigos Ivan e Thiago pelas sugestões que tanto auxiliaram na finalização desta tese e, principalmente, pela amizade!

Aos calorosos companheiros de alegria Mimi, Tuco e Trusca.

Ao Prof. Paulo Cândido Pires pelos aconselhamentos e sugestões sobre a vida docente que se inicia.

À Magnólia de Luciê Gomes Pires, Luciana Gomes Pires, Willian Guindani, Alice Pires Guindani e Melino Poulain por transformar os ares paulistanos em momentos aprazíveis.

A todos aqueles que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho de pesquisa.

E, em especial, à minha eterna namorada, companheira e esposa ,Isabela, presente, e participante e, principalmente, entusiasta de cada nova etapa de minha vida.

RESUMO

FERRÃO, G. E. **Emissões de N_2O pela parte aérea de plantas de milho (*Zea mays* L.).** 2013. 70 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

O óxido nitroso (N_2O) é um gás traço, considerado um dos principais causadores do aquecimento global. Em solos agrícolas, a aplicação de fertilizantes nitrogenados, necessários às culturas, é a principal responsável pela formação deste gás. Internacionalmente, a metodologia mais utilizada e aceita para quantificar os fluxos totais de uma área baseia-se na alteração de concentração no interior de câmeras estáticas instaladas sobre o solo. Entretanto, diversos trabalhos sugerem que as plantas também são agentes desta dinâmica de fluxos entre o solo e a atmosfera, um fator não contabilizado na quase totalidade das pesquisas. O objetivo deste trabalho de pesquisa foi quantificar as emissões de N_2O em plantas de milho simultaneamente aos fluxos provenientes do solo ao longo de um ciclo de cultivo, assim, agregar este montante potencial de emissão nas estimativas do sistema solo-planta-atmosfera. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, sendo que seis Câmaras de Crescimento e Coleta (CCC's) comportaram as plantas de milho e três CCC's permaneceram sem plantas (testemunhas). Durante a coleta das amostras a atmosfera no interior das câmaras foi mantida a 28ºC ± 1 °C, a umidade relativa abaixo do ponto de saturação e a concentração de dióxido de carbono (CO_2) entre 300 e 400 ppmv. As medidas de N_2O provenientes da parte aérea e do solo foram determinadas durante todo o ciclo da cultura do milho (i. e. 105 dias). O fluxo de $N–N_2O$ proveniente do solo variou de 10,37 a 693,85 $\mu g\ m^{-2}_{solo}\ h^{-1}$. Para a parte aérea das plantas de milho, os fluxos de $N–N_2O$ variaram de 65,47 a 1444,92 $\mu g\ m^{-2}_{folha}\ h^{-1}$. Os resultados mostraram uma estreita correlação entre as respostas nas emissões provenientes do solo e parte aérea após a aplicação do fertilizante nitrogenado em cobertura, indicando não somente a influencia do conteúdo de N_2O do solo, mas também a influência da dimensão da aérea foliar das plantas no momento de disponibilidade deste N_2O no solo. O fator de emissão total (solo + parte aérea) calculado em função N-fertilizante aplicado foi de 8,2%. Ao longo do período amostral, cada planta acumulou uma emissão superior a 8000 μg $N–N_2O$. Os resultados explicitam que, ao negligenciar esta via emissora, pode-se estar subestimando o fluxo total de N_2O emitido por uma área sob cultivo em mais de 20%.

Palavras-chave: Óxido nitroso. Transpiração vegetal. Fator de emissão total. Fertilizante nitrogenado. Cultura do milho.

ABSTRACT

FERRÃO, G. E. **Nitrous oxide emissions from the above ground part of maize plants (*Zea mays* L.).** 2013. 70 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

Nitrous oxide (N_2O) is a trace gas, considered a major cause of global warming. In agricultural soils the application of nitrogen fertilizer needed for crops, is the main responsible for the formation of this gas. Internationally, the most used and accepted method to measure total flow from one area is based on the change of concentration into static chambers installed on the soil surface. However, several studies suggest that plants are also active members of this dynamic flux between soil and atmosphere, a factor not accounted for in almost all surveys. Thus, the aim of this research was to simultaneously quantify N_2O emissions from maize plants and soil over a crop cycle and thus aggregate this potential amount of emission in the estimates of the soil-plant-atmosphere system. The experiment was conducted in a completely randomized design with six Growth and Sampling Chambers (CCC) containing plants and three Chambers without plants (controls). During sampling period the atmosphere inside the chambers was maintained at 28 ° C ± 1 ° C, relative humidity below the saturation point and the concentration of carbon dioxide (CO_2) between 300 and 400 ppmv. Measurements of N_2O from shoot and soil were made throughout the life cycle of maize (i.e. 105 days). The flux of N_2O-N from soil ranged from 10.37 to 693.85 μg $m^{-2}{}_{soil}$ h^{-1}. For the shoots of maize, N_2O-N flux ranged from 65.47 to 1444.92 μg $m^{-2}{}_{leaf}$ h^{-1}. The results showed a close correlation between the responses from soil and shoot emissions after the application of nitrogen fertilizer as topdressing, indicating not only the influence of the content of N_2O in soil, but also the influence the leaf size of the plants when N_2O was available in the soil. The total emission factor (soil + shoot) calculated according to total N in the applied fertilizer was 8.2%. Over the sample period, each plant accumulated more than 8000 μg N-N_2O emissions. The results of this research indicates that ignoring this way of N_2O release can lead to an underestimation of almost 20% of the total N_2O flux emitted by an area under cultivation.

Keywords: Nitrous oxide. Plant transpiration. Emission factor. Nitrogen fertilizer. Maize crop.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema dos processos de nitrificação e desnitrificação.....20
Figura 2 – Confecção dos microcosmos.....28
Figura 3 – Vedação dos microcosmos.....29
Figura 4 – Reforma das “Câmaras de Topo Aberto” (CTA´s).....33
Figura 5 – Adaptação das CTA´s: Câmaras de Crescimento e Coleta (CCC´s).....34
Figura 6 – Instalação do experimento 35
Figura 7 – Câmara de Crescimento e Coleta com plantas de milho e testemunha.....36
Figura 8 – Layout do experimento na casa de vegetação da FFCLRP/USP 37
Figura 9 – Amostragem e final do experimento.....39
Figura 10 – Determinação da área foliar da planta no estádio V3 42
Figura 11 – Determinação da área foliar da planta no estádio V5. 44
Figura 12 – Evolução dos estádios ao longo do experimento 45
Figura 13 – Período final de coleta de gases e finalização do experimento.....46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução da área foliar de uma planta de milho durante o período amostral de N_2O nas câmaras de crescimento e coleta.....43
Gráfico 2 – Fluxos de N-N_2O em μg h^{-1}.....48
Gráfico 3 – Fluxo de N-N_2O (μg m^{-2}_{solo} h^{-1}).....49
Gráfico 4 – Fluxo de N-N_2O (μg m^{-2}_{folha} h^{-1}) determinado por metro quadrado de folha. 50
Gráfico 5 – Emissões acumuladas de N_2O por microcosmo e pela parte aérea das plantas de milho no período de 03 de novembro de 2012 a 28 de janeiro de 2013.....53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. REVISÃO DA LITERATURA 15
2.1. Classificação, morfofisiologia da produção do milho 15
2.1.1. Luminosidade 15
2.1.2. Água 16
2.1.3. Nitrogênio 17
2.2. Milho – Uma contextualização 18
2.3. Milho e emissões de N_2O 19
2.3.1. Síntese de N_2O 19
2.3.2. Destino do N_2O 21
2.3.3. Emissão de N_2O pelas plantas 22
3. HIPÓTESE 25
4. OBJETIVOS 26
4.1 Objetivo geral 26
4.2 Objetivos específicos 26
5. MATERIAL E MÉTODOS 27
5.1. Localização e caracterização da unidade experimental 27
5.2. Desenvolvimento das unidades contentoras de substrato (“Microcosmos”) 27
5.3. Preparo do solo 30
5.4. Obtenção e instalação das plântulas de milho 31
5.5. Confecção do ambiente de amostragem de N_2O emitido pelas plantas de milho 32
5.6. Instalação do experimento 34
5.7. Amostragem de gases emitidos pela parte aérea das plantas de milho 37
5.8. Amostragem de gases emitidos pelos solos contidos nos microcosmos 39
5.9. Determinação da área foliar 40
5.10. Cálculo do fator de emissão de óxido nitroso do fertilizante nitrogenado 40
5.11. Análise das amostras 41
5.12. Análise estatística dos dados 41
6. RESULTADOS 42
6.1. Desenvolvimento das plantas e determinação da área foliar 42
6.2. Fluxos de N-N_2O 47

6.3. Emissões de N_2O pelos microcosmos *49*
6.4. Emissões de N_2O pela parte aérea das plantas de milho *50*
6.5. Emissão acumulada de N_2O e Fator de emissão do fertilizante aplicado *52*
7. DISCUSSÃO **54**
7.1. Fluxos de N_2O do solo *54*
7.2. Fluxos de N_2O das plantas *55*
7.3. Emissão acumulada de N_2O e Fator de emissão do fertilizante aplicado *59*
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS **61**
REFERÊNCIAS **63**

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, crescente atenção tem sido destinada ao aumento da concentração atmosférica dos chamados gases de efeito estufa (GEE), responsáveis diretamente pelo aquecimento da Terra. Entre os principais gases, destaca-se o óxido nitroso (N_2O), cuja síntese biológica natural decorre, principalmente, do processo incompleto de nitrificação e desnitrificação durante o metabolismo de compostos nitrogenados utilizados na agricultura.

Este gás de efeito estufa, considerando um tempo de residência de 100 anos, possui um potencial de aquecimento global 296 vezes superior em relação ao equivalente em massa de CO_2. Além disso, como as outras formas dos NO_x, o óxido nitroso também possui efeito químico deletério no ozônio estratosférico (CRUTZEN et al., 2008).

Globalmente, a concentração atmosférica de N_2O passou de 280 ppbv (parte por bilhão volume) no período da pré Revolução Industrial (1879) para aproximadamente 320 ppbv em pouco mais de um século. Este incremento ocorreu simultâneo à descoberta da síntese da ureia pelo ciclo Haber-Bosch, culminando no aumento da produção e do consumo de fertilizantes nitrogenados e demais agroquímicos, impulsionados anos mais tarde pela revolução verde (GALLOWAY et al., 2004).

Considerando o grande destaque do Brasil no cenário mundial de produção de alimentos, é razoável ponderar que subprodutos das atividades agrícolas e pecuária possam tornar-se problemas com impactos globalmente relevantes. Esse fato é facilmente exemplificado ao se considerar que 75% das emissões brasileiras de gases de efeito estufa estão diretamente relacionadas às práticas agrícolas e ao desmatamento. Este padrão diverge da média mundial, na qual a queima de combustíveis fósseis é o principal responsável pelo crescente aumento atmosférico dos GEE (66%) (IPCC, 2006).

Atualmente, o Brasil desponta como terceiro maior produtor mundial de milho (67,8 milhões de toneladas de grãos de milho na safra 2011/12 - CONAB, 2012), representando mais de 6% da produção global (FAOSTAT, 2013). Esta produção é obtida em aproximadamente 15 milhões de hectares, cabendo salientar que, deste total, mais de um milhão de hectares foram incorporados ao sistema apenas no último ano (IBGE, 2013). Este cultivo está concentrado nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e apresenta área total menor apenas para a cultura da soja, a qual é realizada em aproximadamente 24 milhões de hectares do território brasileiro (BRASIL, 2013).

O histórico supracitado e a perspectiva de crescimento no setor de 20 milhões de toneladas até a safra 2019/2020 (BRASIL, 2013), tornam este segmento foco de muitas especulações, principalmente no que tange as áreas econômica, social e ambiental.

Com o previsto aumento da produção desta cultura, o consumo de insumos, principalmente, de fertilizantes nitrogenados, também deve se elevar, uma vez que o N é um dos nutrientes requeridos em maior quantidade para todas as culturas, com teor variando entre 1 e 4 % na massa seca nos tecidos vegetais (REICHARDT et al., 1979). Além disso, a cultura do milho responde economicamente de forma positiva em produtividade com o aumento da dose de N aplicada (PAVINATO et al., 2008).

Este incremento na demanda pode ocasionar, em muitos casos, o aumento proporcional nas emissões de N_2O (HUANG et al., 2004) oriundo dos processos microbianos, responsáveis por mais de 60% das emissões deste gás (IPCC, 2001). Desta forma, os níveis de N fertilizante aplicado têm uma grande influência sobre a taxa de emissões de N_2O em solos cultivados. Estimativas do Intergovernmental Panel on Climate Change mostraram que, em condições climáticas favoráveis, aproximadamente 1% do fertilizante nitrogenado aplicado pode ser emitido na forma de N_2O (IPCC, 2006).

Na busca de alternativas mitigadoras que não apenas mantenham a viabilidade econômica deste integrante do agronegócio, como também possibilitem a sustentabilidade produtiva deste segmento, fatores que controlam o ciclo deste gás em ambientes agrícolas tem sido alvo de inúmeros trabalhos. Alterações nas taxas emitidas ou consumidas na matriz do solo, que são influenciadas pela umidade, porosidade ou compactação, microbiota, fertilização, entre outros, tem sido exaustivamente pesquisados ao longo de anos. No entanto, nota-se que a quase totalidade destas pesquisas está voltada apenas aos fatores atuantes na dinâmica do óxido nitroso no solo, ignorando quase por absoluto a participação de outros potenciais agentes neste sistema, como as plantas.

É bem relatado na literatura que o N_2O produzido na matriz do solo sofre emissão para a atmosfera, principalmente, por difusão (CHANG et al., 1998). Porém, uma rota alternativa pode ocorrer através das plantas durante sua transpiração (MOSIER et al., 1990; PIHLATIE et al., 2005). Alguns trabalhos demonstram a emissão de N_2O pela soja (DEAN; HARPER, 1986) e pelo milho (LI; CHEN, 1993). Na ocasião, devido à pequena quantidade detectada, foi considerado que este gás era produzido no interior das plantas (CHANG et al., 1998).

Esta incerteza pode ser relacionada ao fato da quase totalidade das estimativas de emissões dos três principais gases causadores do efeito estufa (N_2O, CH_4 e CO_2) em sistemas agrícolas ser resultado de amostragens realizadas apenas em câmaras estáticas na ausência de

vegetação (STEUDLER et al., 1991). Desta forma, a hipótese de que quantias significativas de N_2O (CHANG et al., 1998) poderiam ser emitidos para a atmosfera durante a transpiração (TERAZAWA et al., 2007; PIHLATIE et al., 2005) tem sido totalmente ignorada na contabilização das emissões dos GEE para a atmosfera. Neste caso, os valores estimados da emissão total de N_2O (CHANG et al., 1998) para a atmosfera podem estar em grande parte subestimados (PIHLATIE et al., 2005).

Neste contexto, a quantificação completa das emissões globais de N_2O, complexa por considerar a heterogeneidade de ecossistemas terrestres e a variabilidade nas condições ambientais que controlam os fluxos desse gás (WATSON et al., 1990), depende também de outra potencial fonte emissora não considerada até então – i.e. a transpiração das plantas durante o cultivo.

É importante ressaltar que, além de quase não haver material científico sobre o tema, a maioria dos trabalhos realizados que abordam as emissões de N_2O via transpiração foram realizados com material vegetal coletado ou utilizando câmaras estáticas sem descrição do controle de temperatura, umidade e concentração de CO_2.

As pesquisas conduzidas utilizando estes sistemas apresentam diversos aspectos positivos em avaliações preliminares como baixo custo e facilidade de manuseio. Contudo, a exposição de plantas a condições adversas pode resultar em uma série de respostas fisiológicas não comuns ao metabolismo basal (MONSON et al., 1995; SHARKEY, 1996).

A ausência de pesquisas relacionadas ao potencial efetivo desta fonte de emissão de N_2O (sistema planta-atmosfera), relacionando-a, em conjunto, às emissões provenientes do solo, torna essencial a abordagem planta-solo-atmosfera, a qual contribuirá para refinar e melhor elucidar a complexa dinâmica deste gás em sistemas agrícolas.

A busca de alternativas de manejo viáveis, visando a redução nas emissões deste GEE no contexto de crescimento deste setor do agronegócio com intensificação do uso de fertilizantes pelo aumento de produtividade, torna necessário quantificar as emissões de N_2O durante diversas fases do ciclo de cultivo de plantas de milho sob condições fisiológicas normais, ou seja, sem a geração de possíveis condições de estresse. Estas mensurações devem compreender as emissões totais oriundas das principais possíveis fontes (sistema solo + sistema planta), de modo a colaborar com um diagnóstico mais preciso regional para fomentar as tomadas de decisões globais mitigadoras do aquecimento global.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Classificação, morfofisiologia da produção do milho

O milho (*Zea mays* L.) tem como centro de dispersão a América, provavelmente, a região centro-sul do México. É pertencente ao grupo de plantas denominadas Angiospermae ou Divisão Magnoliphyta. Atualmente, pelo sistema de classificação APG III (ANGIOSPERM PHILOGENY GROUP, 2009), o milho pertence ao clado das monocotiledôneas (monocots) do grupo monofilético das comelinídeas (commelinids) da Ordem Poales e Família Poaceae.

As principais características dessa família são: i) a forma da inflorescência (espiga); ii) o caule em colmos e iii) as folhas em lâminas com nervuras paralelíneas de bainha aberta.

O milho é uma gramínea anual e, diferentemente de outras poáceas, possui um mecanismo ineficiente de compensação de espaços, uma vez que, além de sua limitada capacidade de expansão foliar, o perfilhamento apresentado é escasso e pouco efetivo (ANDRADE; VEGA; UHART, 1999). No entanto, sua grande tolerância a altas populações o aumento na densidade de plantas é uma forma de maximizar o rendimento de grãos (OTEGUI; ANDRADE, 2000).

Como a maioria das gramíneas, o milho é uma planta do tipo C4, altamente responsiva a variáveis como luminosidade, água e nitrogênio (TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.1.1. Luminosidade

As plantas do tipo C4 ou Ciclo de Hatch-Slack possuem uma diferenciação no mesofilo foliar de forma que apresentam uma razão superfície-volume mais elevada em relação às dicotiledôneas, isto possibilita maior eficiência nas trocas gasosas. Além disso, estas plantas têm células específicas ao redor dos feixes condutores, denominadas bainha vascular, cujo arranjo é semelhante a uma coroa – denominado de anatomia de Kranz. As células da bainha vascular contêm paredes mais espessas, sem espaços intercelulares e são pouco permeáveis às trocas gasosas. Em compensação, os plasmodesmos, entre as células do mesofilo, são bastante numerosos, com elevada capacidade de transporte citoplasmático (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

O funcionamento do sistema fotossintético faz com que o primeiro produto detectável na via C4 seja o oxaloacetato que foi fixado ao fosfoenolpiruvato (PEP) realizado nas células do mesofilo foliar. O oxaloacetato é então reduzido a malato ou convertido a aspartato, dependendo do tipo de planta. Estes produtos são transferidos para as células da bainha, onde são descarboxilados para produzir CO_2 e piruvato. Então, o CO_2 entra no ciclo de Calvin e reage com a ribulose 1,5, bisfosfato (RuBP) para produzir gliceraldeido 3-fosfato (PGAL). O piruvato retorna as células do mesófilo para regeneração do PEP (LEHNINGER; NELSON; COX, 2007).

Desta forma, as plantas C4 são mais eficientes na captação e aproveitamento do CO_2 e da energia luminosa em relação às dicotiledôneas, pois melhor se adaptam a elevada intensidade luminosa, elevada temperatura e a seca. Além disso, o milho está entre as plantas C4 que possuem maior eficiência de uso da radiação solar, com valor médio de 67 mmol mol^{-1}, enquanto outras espécies deste mesmo grupo apresentam valores em torno de 56,5 mmol mol^{-1} (LARCHER, 2000).

2.1.2. Água

Com relação à água, assim como outras C4, o milho possui baixo consumo por quilo de matéria seca produzida (TAIZ; ZEIGER, 2004), mas o grande acúmulo de matéria seca resulta em altas demandas diárias. Cabe ressaltar que a disponibilidade hídrica é fator marcante observado em safras oscilantes, afetando o rendimento com maior frequência e intensidade que outras variáveis (MATZENAUER et al., 1995).

A necessidade hídrica raramente ultrapassa 2,5 mm/dia, enquanto a planta não ultrapassar os 30 centímetros de altura. Com a continuidade do crescimento e início do período reprodutivo, o consumo pode ser superior a 7 mm diários (FANCELLI, 1992). No entanto, situações de altas populações, temperaturas elevadas e baixa umidade relativa do ar podem acarretar em consumo diário próximo aos 10 mm (DAKER, 1970).

A resposta das plantas à deficiência hídrica está atrelada ao estádio de ocorrência. Deste modo, é possível sumarizar o resultado do estresse hídrico da seguinte forma:

- De ocorrência durante o desenvolvimento vegetativo: ocorrerá atraso nos estádios fenológicos demandando para isso maior acúmulo de graus-dia para completar o ciclo (FRANÇA; BERGAMASCHI; ROSA, 1999). Além disso, a produção de matéria seca será

afetada pela redução do desenvolvimento da área foliar e acúmulo de matéria seca no colmo (FERREIRA; MAGALHÃES; DURÃES, 2000);

- De ocorrência durante a emissão das anteras: poderão resultar em redução de mais de 50% na produção (HENCKEL, 1964), pela redução no número de grãos por espiga (BERGONCI et al., 2001);
- De ocorrência após determinação do número de grãos: reduzirá o período de enchimento de grãos, porém com pouco efeito sobre a taxa de acúmulo de matéria seca (SILVA, 2000).

De modo geral cultivos sem o uso de irrigação exigem entre 300 a 800 mm de água, dependendo das condições climáticas e população, distribuída durante o ciclo da cultura para obtenção de produções médias (4 a 6 toneladas por hectare) de grãos (FANCELLI, 1992; DOORENBOS; KASSAN, 1994).

2.1.3. Nitrogênio

Assim como em outras culturas, o nitrogênio (N) é um dos nutrientes requerido em maior quantidade pelas gramíneas, como o milho. Seu suprimento pelo conteúdo natural do solo, frequentemente, ocorre em quantidades insatisfatórias (REICHARDT, 1985). Em sistemas agrícolas, as fontes de N são: a deposição atmosférica (CARVALHO JUNIOR, 2004), a fertilização nitrogenada, a fixação biológica do N_2 atmosférico (SCHLESINGER, 1997) e a mineralização do N-orgânico do solo (BUSTAMANTE et al., 2004). O N disponível para as plantas depende, entre outros fatores, da quantidade de matéria orgânica no solo (AMADO; MIELNICZUK; FERNANDES, 2000), da característica dos resíduos vegetais (TRINSOUTROT et al., 2000), do manejo adotado (KRISTENSEN; DEBOSZ; MCCARTY, 2003), do tipo de solo (THOMSEN et al., 2001), da umidade, da aeração e da temperatura do solo (SIERRA; MARBÁN, 2000). Das quantidades de N adicionadas ao solo, apenas uma pequena parte é recuperada pelas plantas, evidenciando a grande perda de N no solo, em virtude de processos de volatilização, lixiviação, desnitrificação e erosão (STEVENSON, 1982).

Devido à alta exigência de nitrogênio, o milho responde positivamente à quantidade de N aplicado. Respostas podem, em muitos casos, ser determinadas em doses superiores a 240 kg ha^{-1} (ARAUJO; FERREIRA; CRUZ, 2004; PAVINATO, 2008). No entanto, recomendações devem levar em conta, além da responsividade do material genético à

adubação nitrogenada, outros fatores como sistema de cultivo (direto ou convencional), composição do solo, condições edafoclimáticas, parcelamento e fontes nitrogenadas.

Na literatura, é possível encontrar diversos estudos buscando determinar a época de máxima eficiência de adubação nitrogenada (MUNDSTOCK; BREDEMEIR, 2002; DA ROS et al., 2003). Árdua tarefa, uma vez que o dinamismo deste elemento impossibilita recomendações generalistas. Assim, é conveniente considerar a disponibilização de N nas fases iniciais como imprescindível, pois, apesar de quantitativamente pequenas, é o momento de definição do potencial produtivo das plantas (NOVAIS; NOVAIS; BRAGA, 1974).

2.2. Milho – Uma contextualização

Base alimentar de diversos povos da América Central (FREITAS, 2001) desde a sua domesticação há mais de 7000 anos (MCCLINTOCK, 1959), acredita-se que os primeiros cultivos de milho tenham sido realizados à apenas 4500 anos atrás na América do Sul (GOODMAN, 1987; PROUS, 1989). Os primeiros exemplares foram levados de Cuba para a Europa por Cristóvão Colombo (MCCLINTOCK, 1959).

No século XVIII, durante o ciclo do ouro, o milho ganha destaque no cenário brasileiro como alimento energético, passando a figurar como alimento para consumo humano e animal (FREITAS, 2001).

Atualmente, esta cultura apresenta destaque econômico caracterizado pelas diversas formas de utilização, abrangendo não só a alimentação humana e animal, como também a indústria (álcool, amido, remédios) (ASSIS, 2004). Porém, cabe ressaltar que, no Brasil, o principal uso deste cereal é direcionado à alimentação animal, onde 70% das 67,8 bilhões de toneladas produzidas na safra 2011/2012 tiveram este destino (CONAB, 2012).

Na safra 2011/2012, que representou mais de 6% da produção global, o Brasil foi ranqueado entre os três maiores produtores mundiais de milho (FAOSTAT, 2013). Porém, com a perspectiva de aumento no setor, é provável que nosso país seja responsável pela produção de 8,5% do montante global (854,1 milhões de toneladas) na safra 2012/2013 (USDA, 2013).

Neste contexto, este segmento torna-se foco de muitas especulações e perspectivas, principalmente no que tange as áreas econômica, social e ambiental. Deve-se considerar que

qualquer alteração desta atividade agrícola possa tornar-se um problema com impactos globalmente relevantes.

2.3. Milho e emissões de N_2O

O aumento previsto na produção, anteriormente descrito, deve alavancar também o consumo de insumos, principalmente, de fertilizantes nitrogenados, pois o N é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura do milho.

Este aumento na demanda pode ocasionar, em muitos casos, o aumento proporcional nas emissões de N_2O (HUANG et al., 2004) oriundo dos processos microbianos.

O N_2O possui um tempo de residência de 100 anos e potencial de aquecimento global 296 vezes superior em relação ao equivalente em massa de CO_2 (CRUTZEN et al., 2008). A concentração atmosférica de N_2O passou de 280 ppbv no período da pré Revolução Industrial (1879) para mais de 300 ppbv atualmente. Esta elevação ocorreu simultânea à descoberta da síntese da ureia pelo ciclo Haber-Bosch, culminando no aumento da produção e do consumo de fertilizantes nitrogenados e demais agroquímicos, impulsionados anos mais tarde pela revolução verde (GALLOWAY et al., 2004).

2.3.1. Síntese de N_2O

A produção do óxido nitroso é realizada, principalmente, por microorganismos em ambientes terrestres e marinhos, sendo intermediário em diversos processos do ciclo do nitrogênio (MATSON; VITOUSEK, 1990). No entanto, sua síntese pode ocorrer durante a queima de biomassa ou de combustíveis fósseis, por outras fontes menos expressivas e por reações químicas na atmosfera (DENTENER; CRUTZEN, 1994).

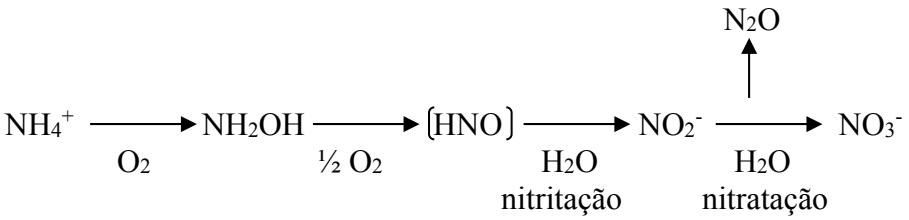
Em solos agrícolas, a produção de óxido nitroso ocorre, principalmente, quando o aporte de N é realizado via fertilizante mineral ou orgânico, sendo favorecida sua emissão em condições de baixa aeração.

Geralmente, há uma elevação na taxa de emissão (pico) de óxido nitroso imediatamente após a aplicação do fertilizante, com duração de poucos dias (CAI; DING; LUO, 2012) há algumas semanas (SKIBA; SMITH; FOWLER, 1993). Após este período, a

taxa de emissão apresenta forte redução e varia em torno de valores próximos aos iniciais, independentemente da quantidade de nitrogênio aplicada (MOSIER et al., 1983).

A síntese de N_2O nos solos é decorrente de processos microbiológicos de desnitrificação e nitrificação a partir do nitrogênio mineral (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) conforme Figura 1.

Nitrificação



Desnitrificação

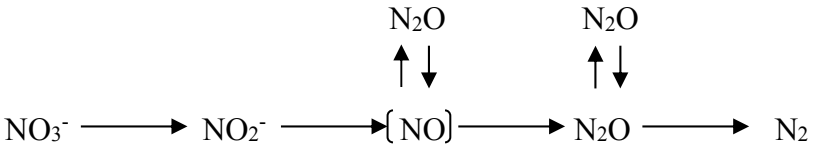


Figura 1 - Esquema dos processos de nitrificação e desnitrificação (Adaptado de Weiske et al., 2001)

A nitrificação representa a oxidação aeróbia do amônio (NH_4^+) a NO_3^-. O processo é realizado por bactérias quimioautotróficas. A nitrificação é realizada em duas etapas. A primeira etapa, chamada nitritação, é realizada por bactérias, principalmente, do gênero *Nitrosomas sp*., que oxida o NH_4^+ a nitrito NO_2^-. A segunda etapa, chamada nitratação, oxida o nitrito a nitrato, sendo realizada por bactérias *Nitrobacter sp.*, *Nitrospira sp*., *Nitrococcus sp*. (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A desnitrificação representa a redução do NO_3^- a NO, N_2O e N_2. Estas formas nitrogenadas são de ocorrência gasosa e na maioria das vezes são perdidos para a atmosfera. Este processo é predominante sob condições anaeróbias, comum em solos preenchidos por mais de 80% de água (MOSIER et al., 1998). Nestas condições, o NO_3^- presente no solo torna-se um aceptor de elétrons potencial (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) e pode ser rapidamente perdido na forma gasosa. No entanto, estima-se que, mesmo sob condições predominantemente aeróbias, 5 e 30% do N aplicado como fertilizante possa ser perdido por desnitrificação, pela existência de sítios anaeróbios nos solos (CANTARELLA, 2007).

Na prática, considerar a emissão de N_2O proveniente principalmente de um processo deve ser visto com cautela (SKIBA; SMITH; FOWLER, 1993), pois a contribuição de cada processo irá depender das condições locais e práticas agrícolas adotas (EICHNER, 1990).

2.3.2. Destino do N_2O

Após a síntese no solo, considera-se que o N_2O tenha os seguintes destinos:

- Emitido do perfil do solo por difusão ou fluxo de massa. Neste caso, o N_2O movimenta-se simplesmente em resposta ao gradiente de concentração, no caso da difusão, ou seria "expulso" do perfil do solo por fluxo de massa, no caso do preenchimento dos poros com água (precipitação ou irrigação), em resposta ao gradiente de pressão. Com relação ao processo de difusão, cabe salientar que nele enquadram-se a grande maioria das avaliações de fluxos entre "solo-atmosfera";
- Consumido pela microbiota especializada. Assim, assume-se que o N_2O atue como aceptor de elétrons em condições de redução de outros aceptores (por exemplo O_2 e NO_3^-), sendo evoluído a N_2 (BREMNER, 1997; BUTTERBACH-BAHL; BREUER; GASCHE, 2002). Diversos trabalhos apontam para o consumo realizado por bactérias (OKEREKE, 1993; BAZYLINSKI; SOOHOO; HOLLOCHER, 1986; YU; CHEN; STRUWE, 2000). No entanto, em detrimento ao pensamento comum de que apenas bactérias atuem como consumidoras exclusivas de N_2O, pesquisas tem apontado para o consumo realizado por fungos (SHOUN et al., 1992);
- Difundido na solução do solo. Desse modo, a característica de alta solubilidade da molécula "N_2O" facilitaria sua difusão na solução do solo (HEINKE; KAUPENJOHANN, 1999). Aqui, a solução do solo poderia atuar como um "tampão" em situações oscilantes desta molécula na atmosfera do solo. Além disso, situações alterando o nível do lençol freático ou percolação da água precipitada podem resultar em quantidades substanciais transportadas para fora do perfil do solo que o sintetizou.

Tratando-se do papel desempenhado pelas plantas nestes fluxos, poucos autores têm abordado sua real participação. Na verdade, a quase totalidade das pesquisas voltadas aos fatores que controlam o ciclo deste gás em ambientes agrícolas tem sido direcionada às alterações nas taxas emitidas ou consumidas na matriz do solo influenciadas pela umidade, porosidade, compactação, pH, microbiota, fertilização (BREMNER, 1997; MOSIER et al., 1998; STEVENS; LAUGHLIN, 1998; LIU et al., 2010; CAI; DING; LUO, 2012).

A participação atribuída às plantas refere-se basicamente ao efeito indireto que rizosfera e deposição de matéria orgânica possam influenciar na atividade microbiana do solo durante a síntese ou consumo de N_2O (YANG; CAI, 2005; GHOSH; MAJUMDAR; JAIN, 2002; CHAPUIS-LARDY et al., 2007; ROSENKRANZ et al., 2006; LISBOA et al., 2011).

No entanto, trabalhos recentes (PIHLATIE et al., 2005; CHEN et al., 1999; SMART; BLOOM, 2001) demonstraram contribuições substanciais provenientes diretamente das plantas. Neste sentido, trabalhos voltados à determinação e quantificação deste possível agente emissor devem, o quanto antes, auxiliar na contabilização das emissões totais de uma região.

2.3.3. Emissão de N_2O pelas plantas

Até meados de 1980, considerava-se o N_2O proveniente de ambientes agrícolas oriundo unicamente do produzido na matriz do solo pela microbiota, sendo emitido para a atmosfera via, principalmente, difusão (IPCC, 2006). Contudo, com a divulgação da pesquisa realizada por Harper (1981), na qual as plantas poderiam atuar como agentes desnitrificadores ($NO_3^- \rightarrow NO_X$) levantou-se a hipótese de que emissões substanciais de N_2O pudessem também ocorrer pelo processo de desnitrificação (CHANG et al., 1998).

Na ocasião, devido à pequena quantidade detectada, foi considerado que a desnitrificação ocorria no interior das plantas de soja (HARPER, 1981). Cabe aqui salientar que esta capacidade de desnitrificação em plantas já havia sido detectada anteriormente por Vanecko e Varner (1955). No entanto, estes pesquisadores não utilizaram material vegetal asséptico (isento de contaminantes biológicos), assim, a possibilidade de que a desnitrificação fosse mediada por micro-organismos ofuscou a relevância da descoberta (GOSHIMA et al., 1999).

A confirmação de que o N_2O poderia ser produzido durante a redução do nitrato veio dos estudos de Dean e Harper (1986). Neste estudo foi provado a que a redução do nitrato poderia originar como subproduto o N_2O. Pesquisas posteriores conduzidas por Smart e Bloom (2001) concluíram que mais de 5% do N_2O emitido para a atmosfera por sistemas agrícolas poderia ser proveniente do processo reducional do nitrato em plantas.

No entanto, esta taxa de emissão não explica os elevados fluxos determinados em diversas pesquisas (CHEN et al., 1999; ZOU et al. 2005), atrelados, principalmente, a eventos geradores de elevados montantes de N_2O no solo (por exemplo: fertilização nitrogenada e precipitações).

Uma resposta plausível a ser hipotetizada nestes casos, deve considerar a alta solubilidade do N_2O (HEINKE; KAUPENJOHANN, 1999) anteriormente mencionada. Assim, situações altamente favoráveis à síntese de N_2O na matriz do solo (temperatura

elevada, elevado teor de umidade e disponibilidade de N) promoveriam o rápido incremento de sua concentração na atmosfera do solo e, por conseguinte na solução do solo.

Neste *continuum* hídrico existente na matriz do solo recobrindo partículas do solo (argila, silte e areia fina), matéria orgânica e raízes, o N_2O dissolvido move-se a curtas distâncias, impulsionado pelo aumento de entropia das moléculas (difusão), migrando de regiões de síntese para regiões de baixa concentração. Este movimento de moléculas solubilizadas na solução do solo pode explicar a reposição de quantias substanciais à regiões atuantes como potenciais drenos.

Neste ponto integramos um novo, e possivelmente poderoso, "dreno" do solo capaz de explicar elevados montantes anteriormente descritos (PIHLATIE et al., 2005) mas não contemplados e explicados pela descoberta de Dean e Harper (1986), ou seja as plantas.

A partir deste "novo dreno", ou melhor, "agente emissor de óxido nitroso" incorre apenas de um entrave, ou seja, a barreira imposta pela membrana plasmática (MP) das células vegetais (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Neste caso, o N_2O produzido na matriz do solo, solubilizado e interceptado pelas raízes de uma planta teria na MP uma potencial barreira impossibilitadora de progressão desta molécula ao interior dos vasos xilemáticos, caules e folhas, câmaras subestomáticas e por fim a atmosfera.

Apenas "teria", caso as características de permeabilidade da MP e sua interação com esta molécula não possibilitassem um elevado trânsito (ou alta permeabilidade).

A principal característica pode ser descrita como a dependência da permeabilidade da MP ao grau de ionização da molécula (ou átomo). Neste caso, cátions (Ca^{++}, K^{+}) e ânions ($H_2PO_4^{-}$) cruzam as membranas biológicas 10^9 mais lentamente que a H_2O (TAIZ; ZEIGER, 2004). Esta característica esta associada, principalmente, à camada de hidratação que moléculas hidrofílicas possuem.

A elevada carga residual (ionte) atrai diversos dipolos opostos (das moléculas de água) formando camadas ao seu redor (NYSTROM, 1973). Entrando em contato com a MP este ionte precisaria ser "solto" pelas moléculas de água em seu entorno para reduzir seu tamanho residual, ou buscar um uma abertura (proteína específica) que comporte sua passagem de acesso ao interior celular (TAIZ; ZEIGER, 2004). Além disso, a segunda característica apresentada por este ionte que dificulta seu acesso por entre a MP, é o seu caráter polar. Neste caso, o caráter hidrofóbico (apolar), característico da região interna da bicamada lipídica, seria mais um entrave (NYSTROM, 1973).

Assim, moléculas detentoras destas características, como CO_2 e N_2 e O_2 podem apresentar coeficientes de permeabilidade similares ao da H_2O (BUCHANAN; GRUISSEM;

JONES, 2000). Neste ponto é possível conceber que, uma possível elevada permeabilidade da molécula de N_2O poderia ser explicada pelas características físicas e químicas como as fracas cargas residuais (HEINKE; KAUPENJOHANN, 1999) correlacionadas com o diminuto tamanho da molécula (e talvez forma linear?).

Com o trânsito potencialmente favorecido pelas características físicas e químicas desta molécula o direcionamento e deslocamento ao interior da célula deve ser impulsionado pela diferença de concentração existente entre a solução do solo e citosol (simplasto).

No interior das células o movimento e homogeneização pode continuar ocorrendo por difusão, ou ser deslocado por fluxo de massa pelo movimento citosólico, denominado ciclose, tendendo ao equilíbrio na célula. No entanto, é pouco provável que o N_2O fique restrito às células das raízes. O destino provável é o transporte e descarregamento no xilema (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Cabe aqui ponderar que, durante o transporte via xilema existe um ótima maneira de determinar a existência de elevados montante de gases dissolvidos na solução (agora denominada seiva bruta). Esta averiguação pode ser realizada nas plantas, principalmente nas horas mais quentes do dia em condições de baixa umidade relativa do ar.

Sob estas condições, as elevadas demandas transpiratórias geram uma força tênsil, necessária à ascensão da seiva bruta para a copa das árvores, inferior a -3 Megapascal. Esta imensa tensão gerada no xilema favorece a separação dos gases dissolvidos na solução (seiva bruta), originando a formação de bolhas microscópicas. Estas microbolhas podem rapidamente coalescer e expandir-se causando o rompimento da coluna de água no xilema. Este rompimento, denominado embolismo, obstrui o duto xilemático e interrompe o transporte de seiva bruta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Evidentemente, este processo ocorre em situações extremas do quotidiano. Desta forma, água e solutos descarregados no xilema terão como destino mais provável, as folhas. Nutrientes minerais serão utilizados no metabolismo vegetal, e a água, em mais de 90% do absorvido será perdida para a atmosfera. As moléculas de O_2 e CO_2 poderão ser utilizadas no metabolismo basal, respiração e fotossíntese respectivamente. No entanto, o N_2 e outros gases dissolvidos e não metabolizados pela planta terão como destino provável a emissão à atmosfera. Neste caso, relativo à molécula "N_2O", ponderando sobre o exposto e refletindo sobre o déficit existente nas pesquisas (DEAN; HARPER, 1986; SMART; BLOOM; 2001), e os resultados de pesquisas atuais (PIHLATIE et al., 2005; BARUAH et al., 2012), esta não seria a via e destino mais provável incorrente de altíssimo potencial emissor?

3. HIPÓTESE

A proposta deste projeto de pesquisa baseou-se na hipótese de que o sistema "solo-planta" é emissor de um dos principais gases causadores do chamado efeito estufa, o óxido nitroso.

Diversos estudos nos levam a crer que as atuais estimativas das taxas de emissão deste gás estejam subestimadas, não só no cultivo do milho, como também em todos os cultivos realizados em solos não inundados. Isto porque o N_2O emitido durante a transpiração das plantas nunca foi determinado por todo um ciclo de cultivo e sua possível contribuição nunca foi contabilizada para efeito de emissão total de uma área.

Neste sentido, o cultivo de milho poderia representar um potencial emissor de óxido nitroso além do atualmente estimado no Brasil.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo principal desta pesquisa foi quantificar o potencial de emissão de um dos principais gases causadores do efeito estufa, o óxido nitroso, pelas plantas de milho simultaneamente aos fluxos provenientes do solo ao longo de um ciclo de cultivo e, assim, agregar este potencial montante de emissão nas estimativas para a cultura de milho.

4.2 Objetivos específicos

- Estimar a participação das plantas de milho nos fluxos totais de N_2O no sistema solo-planta-atmosfera;
- Quantificar as emissões totais de óxido nitroso (solo e transpiração vegetal) relacionado ao cultivo de plantas de milho;
- Quantificar o fator de emissão total (solo + planta) de N_2O para a cultura do milho, considerando o uso do fertilizante nitrogenado ureia;
- Determinar períodos potencialmente críticos às emissões pelo sistema "solo – planta";
- Estimar a participação das plantas nos fluxos totais de N_2O entre solo e atmosfera.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Localização e caracterização da unidade experimental

A condução da etapa experimental desta pesquisa foi realizada no período que compreende os meses de outubro de 2012 a fevereiro de 2013, na casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), situada no município de Ribeirão Preto, SP, nas seguintes coordenadas geográficas: 21° 9’ 44,72” S e 47° 51’ 35,96” O.

5.2. Desenvolvimento das unidades contentoras de substrato (“Microcosmos”)

A concepção, desenvolvimento e montagem das unidades contentoras de substrato, aqui denominadas simplesmente *microcosmos*, necessários ao desenvolvimento do sistema radicular das plantas de milho, teve dois focos principais. Em um primeiro momento objetivou-se gerar um sistema de drenagem eficaz ao minimizar a formação de sítios anaeróbios. Em seguida, estes mesmos microcosmos deveriam impedir a ocorrência de qualquer troca gasosa entre seu interior e exterior nos momentos de amostragem de gases oriundos da transpiração da parte aérea, minimizando, desta forma, condições estressantes infringidas às plantas de milho.

A solução, para confecção dos microcosmos, foi utilizar tubos de policloreto de polivinil (PVC) com 30 centímetros de diâmetro por 40 centímetros de altura, vedados nas duas extremidades (superior e inferior) com “caps”, soldados com adesivo plástico para PVC (mistura de solventes, cetonas, ésteres e resina de PVC - da marca “Tigre”) recoberto com cola de silicone (produto químico preparado à base de polimetilsiloxano, polidimetilsiloxano, metiltriacetoxisilano, etiltriacetoxisilano, derivados de alquil-benzeno e sílica amorfa - da marca “Orbived”) (Figura 2a).

Na extremidade inferior, a base dos microcosmos, foi elaborado um sistema de drenagem na seguinte sequência:

1º) Brita grossa número 3 (faixa granulométrica: 32 - 57 milímetros);

2º) Brita média número 1 (faixa granulométrica: 12 - 24 milímetros);

3º) Areia média (faixa granulométrica: 0,5 - 1 milímetro).

Estas frações foram separadas por telas plásticas (0,2 milímetros de abertura) (Figura 2b a 2e). Ainda na base dos vasos, foi instalada uma válvula hidráulica para drenagem, passível de vedação total ao acionamento, de fundamental importância nos períodos de isolamento do sistema radicular (amostragens) do exterior das câmaras coletoras (Figura 2f).

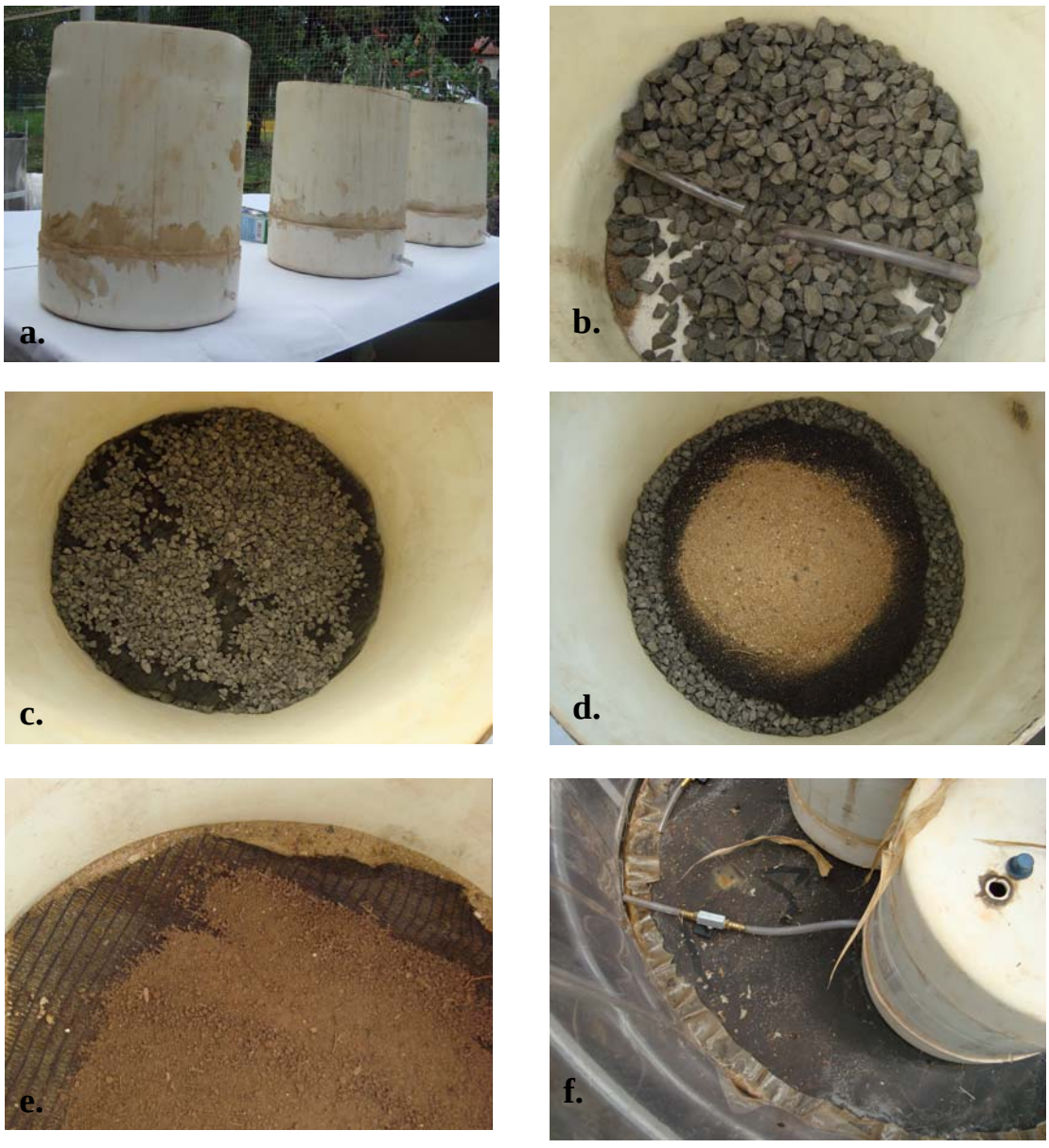


Figura 2 – Confecção dos microcosmos. a. Estrutura externa do microcosmo confeccionado com tubo de policloreto de polivinil (PVC), vedados na extremidade inferior com "cap" (soldados com adesivo plástico para PVC e recoberto com cola de silicone); b-d. Sequência de substratos na montagem do sistema de dreno de cada microcosmo; e. Solo alocado sobre o sistema de dreno para subsequente correção de pH, incubação e estabilização; f. Detalhe da válvula hidráulica no sistema de drenagem

Na extremidade superior do topo dos microcosmos foram feitos quatro orifícios em cada “cap”. O orifício central, com 55 mm de diâmetro, foi destinado a transpassar o caule das plantas em conjunto com uma rolha de borracha de laboratório (marca “Noveduc”) utilizada para a vedação (Figura 3a a 3d). Os três orifícios laterais, deslocados 10 centímetros do centro do “cap” (Figura 3b) e com diâmetro de meia polegada foram destinados à: i) reposição de água (vedado com uma rolha do tipo “butyl rubber stopper”) e ii) para a coleta de gases emitido pelo solo (vedado com válvulas de retenção de duas vias).

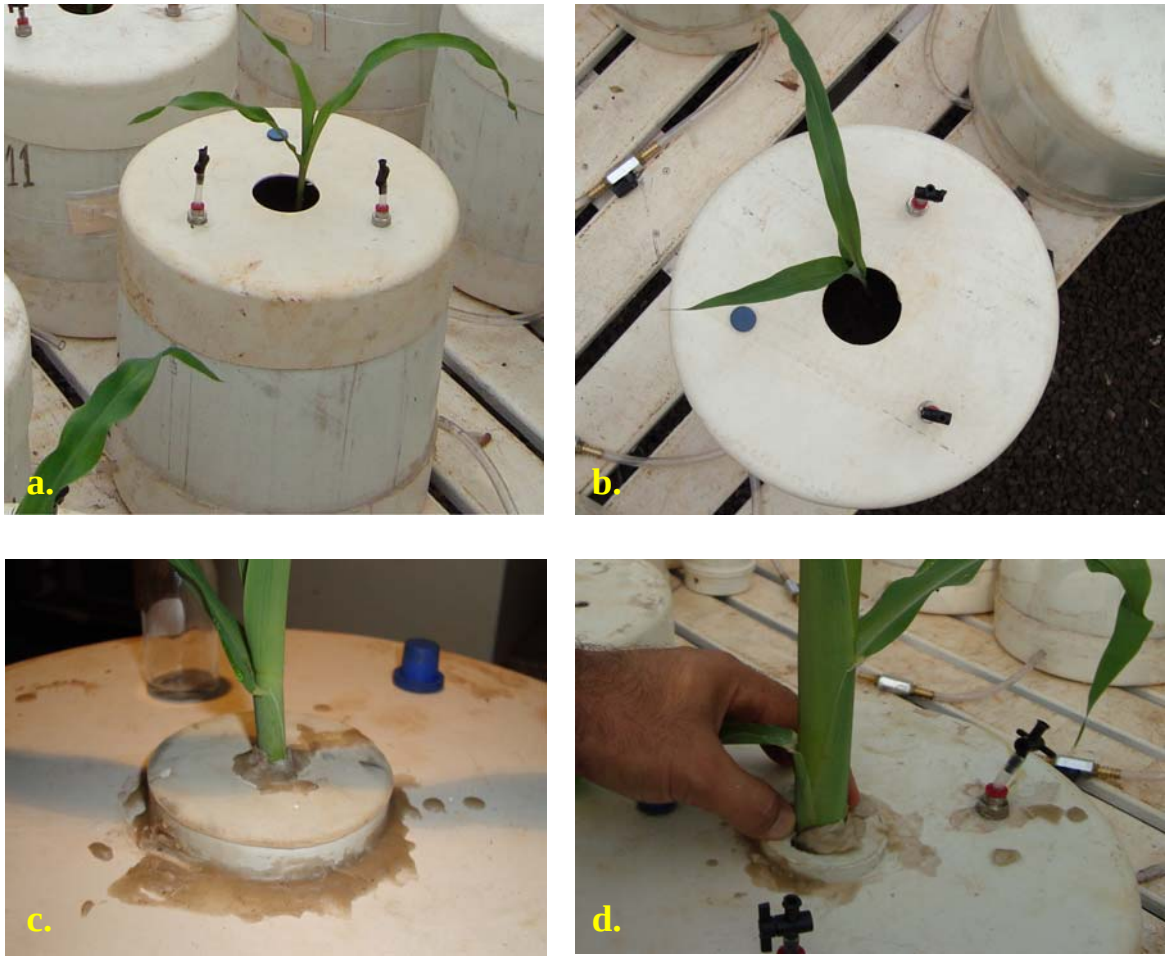


Figura 3 – Vedação dos microcosmos. a. “Cap de PVC” vedando a extremidade superior do microcosmo (milho em estádio “V2”); b. Detalhe: quatro orifícios utilizados ao longo das coletas até a senescência das plantas; c-d. Detalhe das rolhas de borracha utilizadas para vedação dos caules durante o crescimento das plantas

5.3. Preparo do solo

O solo utilizado como substrato na composição final dos microcosmos (Latossolo vermelho textura argilosa), ou seja, base para o desenvolvimento do sistema radicular e o fornecimento de água, macro e micronutrientes para as plantas de milho, foi coletado em fevereiro de 2012 na área experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP), na camada 0 – 30 centímetros. A escolha deste solo baseou-se no conhecimento do histórico de cultivo da área com a sucessão soja/milho por diversos anos, e desta forma, buscou-se utilizar um solo padronizado e homogêneo para a cultura.

Após a secagem ao ar, o solo foi peneirado a 2 mm, homogeneizado e uma alíquota de 25 gramas foi enviada para caracterização físico-química no Laboratório do Departamento de Solos (ESALQ/USP). O pH foi determinado em H_2O e KCl (1,0 mol L^{-1}) usando a relação solo:solução de 1:2,5. O P disponível e os cátions trocáveis (K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+}) foram extraídos em resina trocadora de íons (RAIJ; QUAGGIO, 1983). O P disponível foi quantificado por espectrofotometria e os teores de K^+ por espectrometria de chama. O Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinados por espectrofotômetro de absorção atômica. A acidez potencial do solo foi determinada pela solução SMP a pH 7,5. A CTC potencial a pH 7,0 (T) e saturação por bases (V%) foram calculadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades químicas do solo utilizado para formação dos microcosmos

Prof.	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
cm		g dm^{-3}	mg dm^{-3}			$mmol_c$ dm^{-3}				%
0 – 30	5,4	31	9	0,4	44	14	30	58,4	88,4	66

Em maio de 2012, o solo foi transportado até a casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia da FFCLRP/USP em Ribeirão Preto.

Para formação do microcosmo foram colocados 8 kg de solo seco ao ar em vinte e quatro recipientes pré-formado com o sistema de drenagem anteriormente descrito (Figura 3). Desse modo, cada microcosmo conteve em seu interior uma coluna de 30 cm de altura de solo por 30 centímetros de diâmetro.

A área superficial resultante de 0,070686 m^2, necessária ao dimensionamento de calagem e adubação, foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$A = \prod r^2 \qquad (1)$$

Onde: A é igual a área superficial do microcosmo; $\prod$ é igual a 3,141593; r é a distância da borda lateral ao centro do microcosmo.

Com o objetivo de atingir 70% de saturação por base da CTC a pH 7, conforme recomendação do Boletim Técnico 100 (RAIJ et al., 1997), após a formação do microcosmo, foi realizada a correção do pH com 25,02 gramas de calcário dolomítico filler com PRNT (poder relativo de neutralização total) de 100 % por microcosmo (dose equivalente a 3 toneladas por hectare), irrigado com água deionizada e incubado previamente à instalação do experimento para estabilização do sistema.

5.4. Obtenção e instalação das plântulas de milho

As sementes de milho (*Zea mays* L. - híbrido DKB 390 PRO) foram obtidas no Departamento de Genética (ESALQ/USP). Foram colocadas para germinar 200 sementes em 10 caixas plásticas do tipo "gerbox" (12 x 16 x 4 cm), sobre papel filtro autoclavado (120°C e pressão de 1 atmosfera por 60 minutos), umedecido com água destilada na quantidade correspondente a três vezes o peso do papel substrato, em câmara de germinação, na ausência de luz, sob temperatura de 26 °C ± 1°C.

As sementes foram irrigadas diariamente por um período de três dias, no qual 80 % das sementes havia emitido uma radícula de aproximadamente 0,1 cm. As plântulas mais homogêneas que apresentaram este padrão de emissão radicular foram transferidas para os microcosmos localizados na casa de vegetação no dia 18 de outubro de 2012.

Em cada microcosmo foi plantada uma plântula numa profundidade de 0,5 cm, totalizando vinte e quatro unidades. A emergência das plântulas ocorreu em sua totalidade quatro dias após o plantio (22 de outubro de 2012). A umidade do solo foi monitorada através do medidor de umidade do solo modelo "HH2", equipado com o sensor de umidade do tipo *Theta probe ML2X sensor (Delta-T devices, UK),* e mantido a 60% ±5% da capacidade de campo (CC).

Simultâneo ao plantio das sementes, foi aplicado 2,061 gramas do fertilizante "NPK" de formulação 10-24-18 (dose equivalente a 30 kg ha^{-1} N, 70 kg ha^{-1} P_2O_5 e 50 kg ha^{-1} K_2O) por microcosmo, referente à adubação de base utilizada na cultura em campo, tendo como critério para recomendação a análise de solo (K, P e textura do solo), com uma expectativa de produção de 8000 kg de grãos por hectare, considerando como referência o item "13.7 milho para grão e silagem" do Boletim Técnico 100 (RAIJ et al., 1997).

5.5. Confecção do ambiente de amostragem de N_2O emitido pelas plantas de milho

Para avaliar o N_2O emitido, oriundo unicamente da parte aérea das plantas de milho, foi necessário isolá-las dentro de câmaras adaptadas, alocadas no interior da casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal (FFCLRP/USP). Para tornar esta etapa possível, as denominadas "Câmaras de Topo Aberto" (CTA's) existentes neste laboratório foram adaptadas e reformadas, visando impedir qualquer troca gasosa através da estrutura.

A reforma foi iniciada pela instalação de um filme plástico de alta barreira ao oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2), e alta resistência mecânica à perfuração (estrutura resinada com EVOH) obtido da empresa Parnaplast Indústria de Plástico LTDA, situada no município de Araucária – PR. As duas principais alterações feitas nas estruturas pré-existentes das CTA's de 1,0 metro de diâmetro x 2,0 metros de altura e volume total de 1741 litros (Figura 4a e 4b) foram o isolamento da base e a adaptação de uma estrutura que se ajustasse ao seu topo.

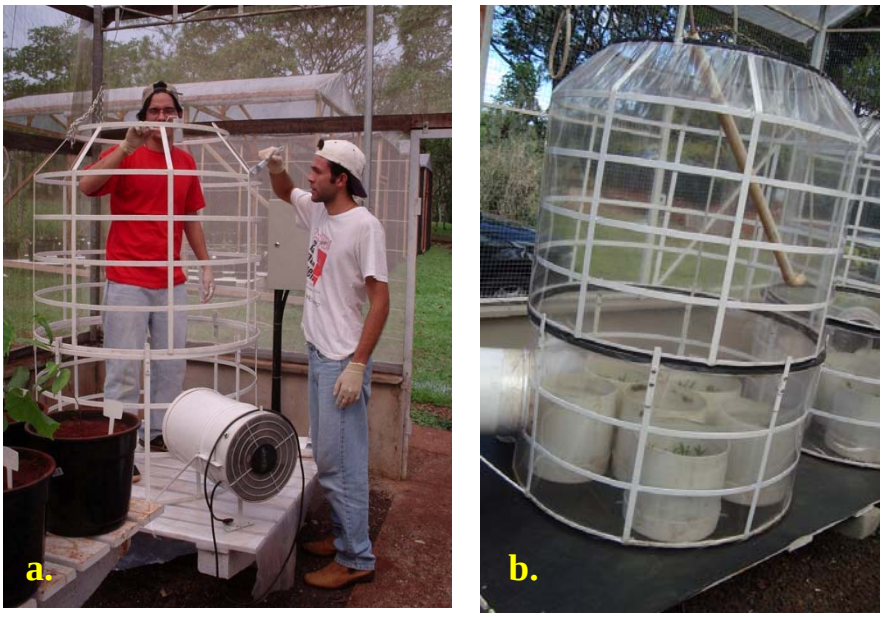


Figura 4 – Reforma das "Câmaras de Topo Aberto" (CTA´s). a. Detalhe da câmara de topo aberto durante a reforma; b. Câmara de topo aberto reformada

A primeira alteração foi necessária para restringir as trocas gasosas pela base das câmaras. Desta forma, a cola de silicone (produto químico preparado à base de polimetilsiloxano, polidimetilsiloxano, metiltriacetoxisilano, etiltriacetoxisilano, derivados de elquil-benzeno e sílica amorfa - da marca "Orbived") foi utilizada para soldar a base da câmara ao piso coberto com um manta de borracha lisa (3000 x 1200 x 5,5 mm), vedando por completo a parte inferior deste sistema (Figura 5a).

Em um segundo momento, a alteração feita no topo das câmaras teve como foco principal, além de promover a completa vedação do sistema, permitir a recirculação e homogeneização da atmosfera criada no interior das câmaras (Figura 5b). Neste ponto a denominação outrora designada "CTA" foi alterada para *"câmaras de crescimento e coleta*" (CCC – Figuras 5 c-d).

Figura 5 – Adaptação das CTA´s: Câmaras de Crescimento e Coleta (CCC´s). a. Detalhe da câmara da base da câmara vedada com cola de silicone; b. Extremidades superior da CCC com adaptação para a recirculação de ar instalada; c. Finalização da construção das câmaras de crescimento e coleta no dia 01 de outubro de 2012; d. Detalhe das CCC's suspensas ao fundo e plantas de milho em estádio "V1" quatro dias após emergência (26 de outubro de 2012)

5.6. Instalação do experimento

No dia 03 de novembro de 2012, 80 % das plantas de milho atingiram o estádio "V3", no qual as folhas expandidas apresentavam três aurículas visíveis (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 1993). Em seguida, o topo de doze microcosmos (selecionados ao acaso entre os vinte e quatro inicialmente cultivados) foi selado ao redor dos caules com um anel de borracha e cera de abelhas (Figuras 6 a-b).

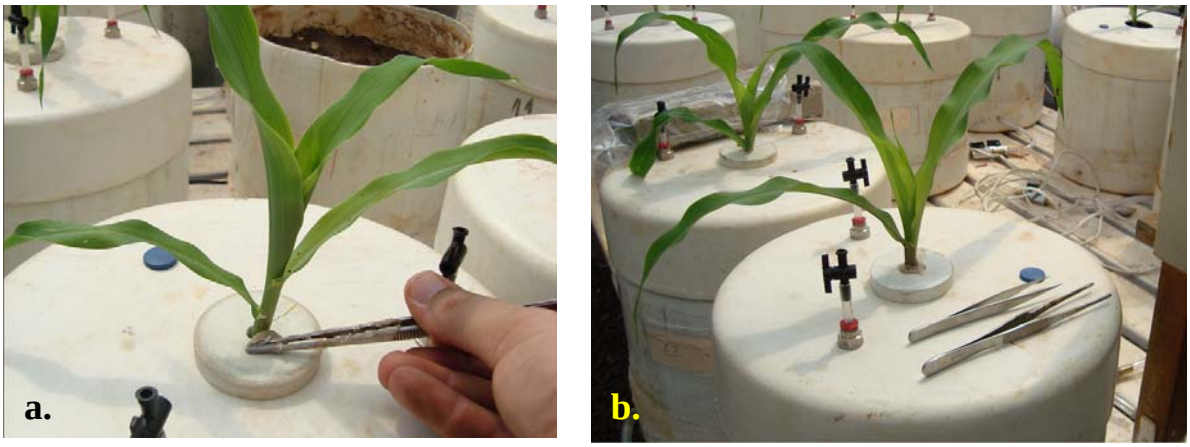


Figura 6 – Instalação do experimento. a. Detalhe da cera de abelha sendo aplicada ao redor do caule da planta de milho, sobre o anel de borracha com auxílio de uma pinça; b. Detalhe caule vedado pronto para amostragem

Estes doze microcosmos foram alocados em seis CCC´s para o início das coletas. Cada CCC recebeu duas plantas de milho em seu respectivo microcosmo (Figura 7a). As testemunhas (brancos) consistiram de seis microcosmos construídos, manipulados, adubados e irrigados exatamente da mesma forma que aqueles com plantas de milho, sem, no entanto, receberem plantas cultivadas (Figura 7b). Desta forma, cada CCC utilizada como "branco" recebeu dois microcosmos sem plantas de milho no qual o orifício destinado ao caule foi vedado unicamente com cera de abelhas.

Figura 7 – Câmara de Crescimento e Coleta com plantas de milho e testemunha. a. Plantas de milho (estádio de crescimento "V10") alocadas no interior das "câmaras de crescimento e coleta" (8 e 9 ao fundo respectivamente), momentos antes da vedação e início da décima segunda coleta (10 de dezembro de 2012, sete semanas após a emergência das plantas); b. Detalhe da CCC número 2 (branco) vedada, durante o período de coleta

A disposição das nove CCC's, seis com plantas e três brancos, dentro da casa de vegetação foi determinada por sorteio de forma totalmente aleatória na sequência final que segue (Figura 8).

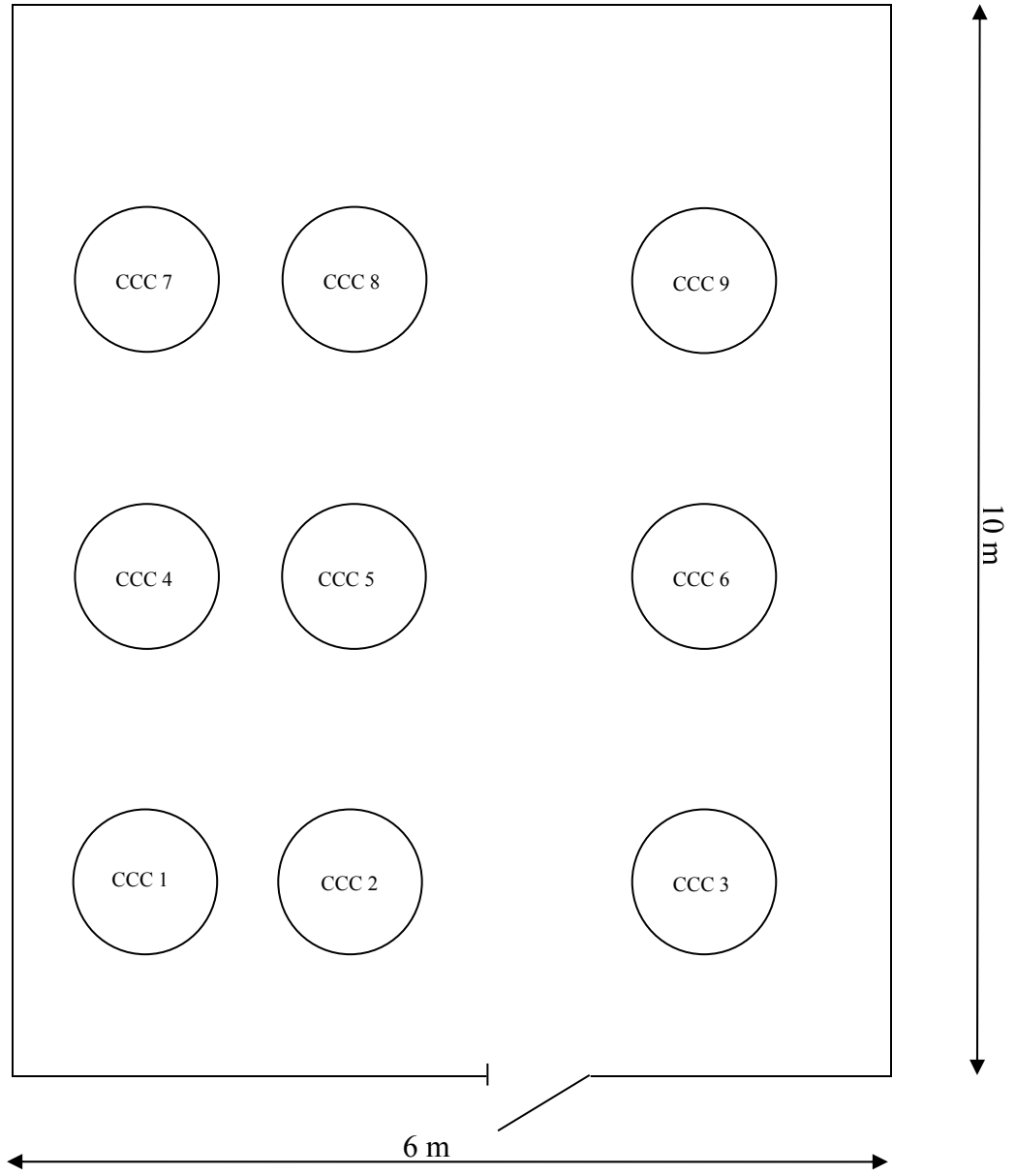


Figura 8 – Layout do experimento na casa de vegetação da FFCLRP/USP, onde: CCC = é a câmara de crescimento e coleta, cada qual possui 1m de diâmetro. CCC's: 1, 2 e 4 contêm os microscosmos sem as plantas de milho (brancos); CCC's: 3, 5, 6, 7, 8 e 9 contêm os microcosmos com plantas de milho

5.7. Amostragem de gases emitidos pela parte aérea das plantas de milho

As amostragens de gases emitidos pela transpiração das plantas de milho tiveram início dia 03 de novembro de 2012, antecedendo em seis dias a aplicação da adubação de cobertura. No dia 09 de novembro de 2012, foram aplicados 0,707 gramas do fertilizante

nitrogenado “ureia” (dose equivalente a 50 kg de N ha^{-1}) por microcosmo na superfície do solo.

As coletas foram realizadas semanalmente às segundas e quintas-feiras (com exceção do período entre 17 a 31 de dezembro de 2012). As amostragens foram realizadas pela manhã em intervalos regulares de 30 minutos, com início às 9:00 horas e término às 11:30 horas, totalizando o período de 150 minutos de confinamento. No momento das amostragens, as CCC’s foram vedadas com um filme de polipropileno bi-orientado coberto com adesivo acrílico (marca Adelbras 48 mm x 50 m) de maneira a isolar o ambiente interno do externo.

Em cada período, duas amostras de 20 mL foram manualmente retiradas de cada uma das nove CCC’s, utilizando seringas de nylon do tipo BD através de uma válvula localizada na lateral de cada câmara (Figura 9b). As amostras de gases foram então imediatamente transferidas para frascos de vidros de 20 mL pré-evacuados e selados com uma rolha do tipo “butyl rubber stoppers” para armazenamento e transporte até o Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (CENA/USP) para análise.

Durante a coleta das amostras, o interior das câmaras foi mantido a 28ºC ± 1 °C e a umidade relativa abaixo do ponto de saturação por meio da circulação forçada do ar interno das CCC através de um “trap” contendo gelo (Figura 9 d).

A concentração de dióxido de carbono (CO_2) foi monitorada pelo equipamento “IRGA modelo Testo 535 gas analyzer” e em intervalos regulares foi injetado CO_2 (100 %), afim de manter a concentração interna de CO_2 entre 300 e 400 ppmv.

As amostragens foram realizadas até um estado de senescência adiantada verificado na décima quarta semana após a emergência no dia 28 de janeiro de 2013. A morte das plantas de milho, foi determinada na décima quinta semana após emergência (04 de fevereiro de 2013) no estádio reprodutivo “R4” (Figura 9a e 9c) e foi determinada pela ausência de atividade trocas gasosas (taxa de fotossíntese, transpiração e condutância estomática) determinada pelo analisador de gases IRGA LCPro+ (ADC, UK), instalado para determinar os fluxos de CO_2 e água em cada CCC.

Figura 9 – Amostragem e final do experimento. a. Plantas senescentes de milho ao final do experimento na décima quinta semana após emergência (04 de fevereiro de 2013); b. Amostra de 20 mL coletada manualmente, na seringa de nylon do tipo BD, através da válvula localizada na lateral da CCC; c. Detalhe do caule da planta excisado ao lado do pendão. As folhas foram utilizadas para determinação da área foliar total final das plantas de milho; d. Detalhe da caixa térmica com circulação forçada de ar utilizada simultaneamente como "trap" para o vapor d'água e controle da temperatura

5.8. Amostragem de gases emitidos pelos solos contidos nos microcosmos

As amostragens de gases emitidos pelos solos contidos nos microcosmos tiveram início dia 03 de novembro de 2012. Após a coleta inicial, foram realizadas amostragens nos

dias 05, 07, 09, 12, 14, 16, 18 e 26 de novembro, 06 e 16 de dezembro. Quatro coletas adicionais foram realizadas em janeiro nos dias 05, 14, 21 e 28. As amostragens foram realizadas na parte da manhã, em intervalos regulares de 30 minutos, com início às 7 horas e 30 minutos e término às 8 horas e 30 minutos. No momento das amostragens, as válvulas coletoras localizadas no topo dos microcosmos, válvula de drenagem e orifício para reposição de água foram vedados de maneira a isolar o ambiente interno do externo e início da contagem do tempo de incubação e amostragem.

5.9. Determinação da área foliar

A medição de área foliar foi efetuada nos dias 03 (12 DAE) e 13 (22 DAE) de novembro, 09 (48 DAE) e 18 (57 DAE) de dezembro, 15 (85 DAE) e 28 (98 DAE) de janeiro de 2013. Em cada ocasião, foram utilizadas duas plantas dentre as doze não sorteadas para compor o experimento principal de avaliação dos fluxos de N_2O no interior das CCC's. A área foliar de cada folha foi obtida através do Medidor de área foliar AM300 (ADC BioScientific, Ltd., UK), utilizando-se as folhas que apresentavam pelo menos 50% de sua área verde. A área foliar por indivíduo foi calculada somando-se as áreas de todas as folhas da planta.

5.10. Cálculo do fator de emissão de óxido nitroso do fertilizante nitrogenado

O fator de emissão do óxido nitroso proveniente do fertilizante nitrogenado foi calculado de acordo com a metodologia proposta pelo IPCC (2006) (Equação 2).

$$FE_{fertilizante} = \left(\frac{\sum_{N_2O} - \sum_{testemunha}}{N_{aplicado}} \right) \qquad (2)$$

Onde: $\sum_{N_2O}$ são as emissões cumulativas dos microcosmos ou parte aérea das plantas que receberam o fertilizante nitrogenado; $\sum_{testemunha}$ são as emissões cumulativas do controle; $N_{aplicado}$ é montante de fertilizante nitrogenado aplicado.

5.11. Análise das amostras

O equipamento utilizado para a análise das amostras foi um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC 2014) equipado com um detector de captura de elétrons (ECD). As amostras gasosas injetadas foram arrastadas por N_2 5.0 em uma coluna empacotada (Porapack Q® de 80-100 mesh) operando a 80ºC e a concentração de N_2O determinada por diferença de potencial entre um ânodo e um catodo de um detector de captura de elétrons (ECD), com uma fonte de ^{63}Ni (meia vida de 100,1 anos) operando a 325ºC.

Os fluxos de N_2O foram calculados pela alteração linear da concentração em função do tempo de incubação nas câmaras (Equação 3):

$$Fluxo = \left(\frac{\delta[N2O]}{\delta t}\right) * \left(\frac{Vh}{A}\right) * \left(\frac{\left(\frac{1-e}{P}\right)}{Vm}\right) \qquad (3)$$

Onde: $(\delta[N_2O]/\delta t)$ é a alteração da concentração de N_2O em função do tempo (mol N_2O mol^{-1} s^{-1}); V_h é o volume da câmara utilizada na amostragem (m^3); A é a área da câmara (m^2); (1-e)/P é o potencial de pressão de água pela pressão atmosférica na câmara (kPa kPa^{-1}); V_m é o volume molar da câmara (m^3 mol^{-1}).

5.12. Análise estatística dos dados

Os resultados foram submetidos à análise de variância com o propósito de conhecer as diferenças significativas entre os tratamentos pelo procedimento ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, para caracterizar as diferenças entre os tratamentos. As correlações entre as variáveis foram aplicadas o Teste t ($p<0,05$). Estas análises estatísticas foram realizadas pelo software estatístico SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina do Norte, EUA).

6. RESULTADOS

6.1. Desenvolvimento das plantas e determinação da área foliar

Após a emergência ocorrida no dia 22 de outubro de 2012, as plântulas de milho tiveram rápido crescimento, apresentando a primeira aurícula totalmente visível da primeira folha emitida e expandida (estádio V1) 4 dias após a emergência (4 DAE) (Figura 10a).

Figura 10 – Determinação da área foliar da planta no estádio V3. a. Início do período amostral. b. Plantas de milho em V3; c. Visão geral dos microcosmos com as plantas de milho; d. Vista aproximada de um microcosmo com destaque para os anéis de vedação com a cera para o isolamento da parte superficial

No dia 03 de novembro (12 DAE), com as plantas alcançando o estádio V3, foi realizada a primeira medição da área foliar (Gráfico 1) momentos antes do fechamento do topo do microcosmo com o "cap" superior (Figura 10b), vedando em seguida o caule das plantas com os anéis de borracha e cera de abelhas para início das coletas (Figuras 10c e 10d).

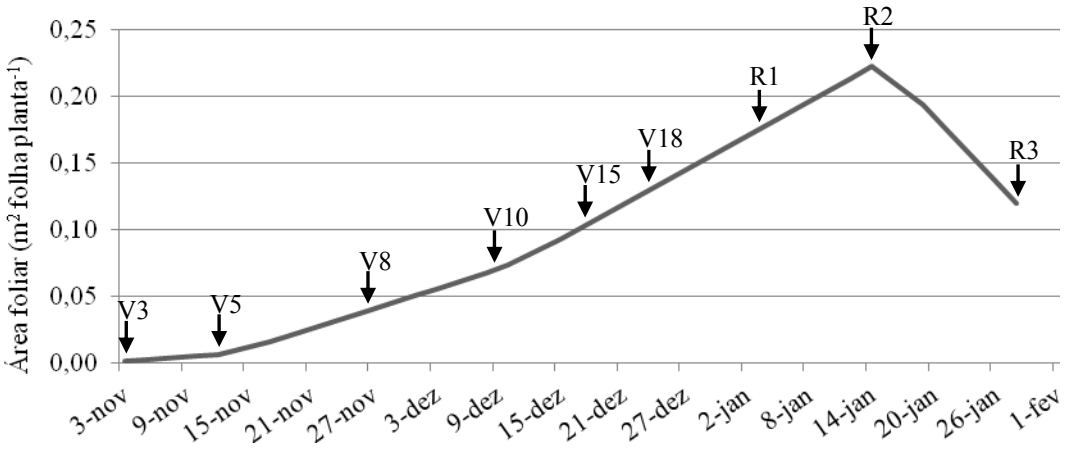


Gráfico 1 – Evolução da área foliar de uma planta de milho durante o período amostral de N_2O nas câmaras de crescimento e coleta localizadas na casa de vegetação da FFCLRP/USP. Setas indicam os diferentes estádios das plantas de milho: V3-V18 estádios vegetativos; R1-R3 estádios reprodutivos

A segunda determinação da área foliar foi realizada no dia 13 de novembro (22 DAE), com as plantas no estádio V5 (Figura 11a).

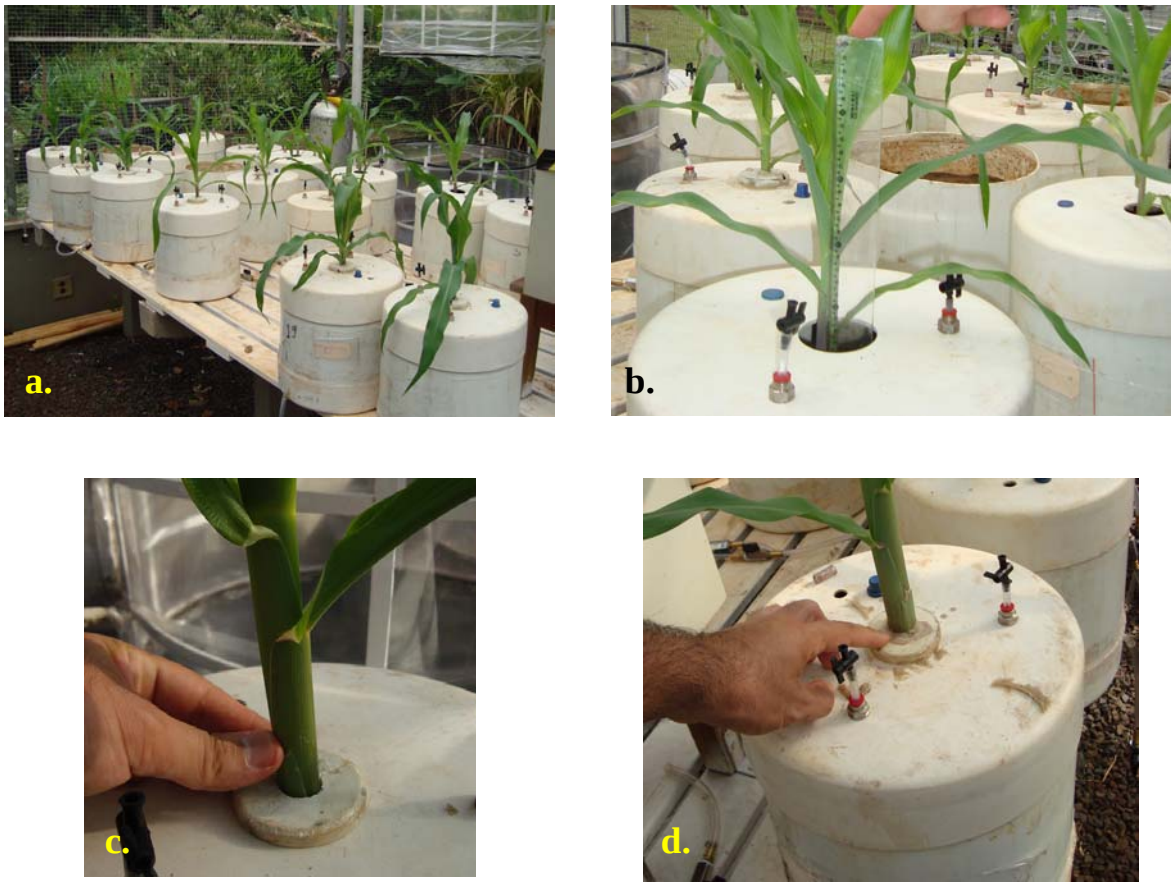


Figura 11 – Determinação da área foliar da planta no estádio V5. a. Microcosmos prontos para amostragem e para serem transferidos às CCC's; b. Retiradas dos anéis de vedação e determinação do crescimento; c. Detalhe do aumento dos orifícios nos anéis de vedação; d. Detalhe do selamento com cera dos anéis de vedação

Com o desenvolvimento das plantas e consequente aumento do diâmetro dos caules, houve a necessidade periódica de retirada dos anéis de borracha que vedavam o caule das plantas (Figura 11b), expansão do orifício interno dos anéis de borracha (Figura 11c) e recolocação no entorno das plantas (Figuras 11d).

A terceira determinação da área foliar foi realizada no dia 09 de dezembro (48 DAE), com as plantas atingindo o estádio V10 (Figura 12a), sendo realizada a quarta determinação nove dias depois (57 DAE), com as plantas atingindo o estádio V15. A partir deste estádio, tornou-se impossível a retirada das plantas do interior das CCC's para manejo e adaptação das borrachas de vedação no entorno dos caules das plantas como prevenção de danos mecânicos às partes aéreas (Figura 12b).

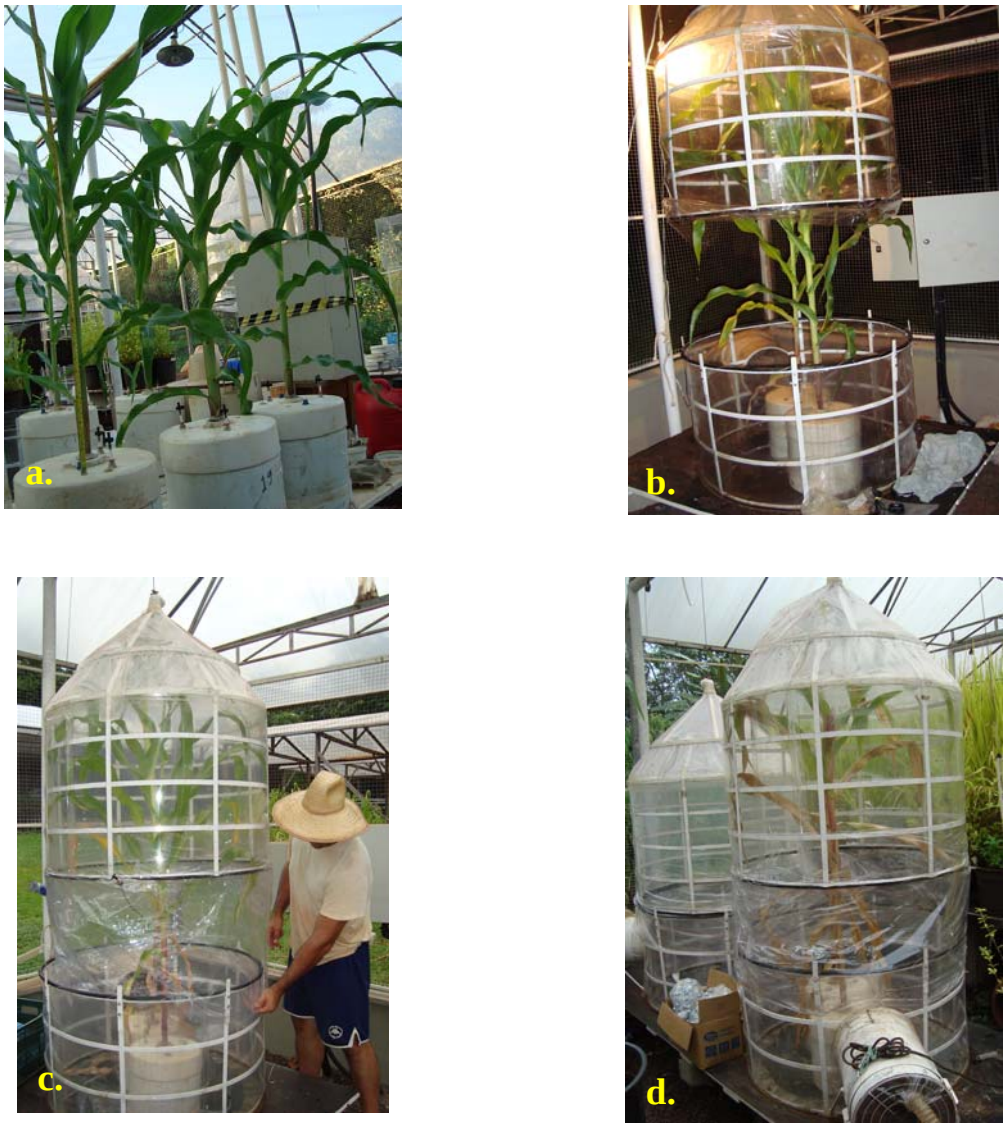


Figura 12 – Evolução dos estádios ao longo do experimento. a. Detalhes das plantas de milho em V10; b. Detalhe das plantas de milho em V15; c. Vedação da CCC número três momentos antes da coleta de gases; d. Detalhe da planta de milho no estádio R2

No dia 23 de dezembro, as plantas, ao atingir o estádio V18 (62 DAE, Figura 12c), tem indício de pendão visível, porém não exposto ainda. O terço médio inferior das plantas apresenta morte foliar pronunciada.

O início do florescimento, ou seja, estádio reprodutivo "R1", determinado pela exposição dos estilo-estigmas nas inflorescências femininas (sabugo), teve início no dia 03 de janeiro aos 73 DAE, com clímax apresentado no dia 05 de janeiro aos 75 DAE. Neste ponto, as plantas apresentavam severa senescência foliar no terço inferior (Figura 12d).

A quinta determinação da área foliar foi realizada dia 15 de janeiro (85 DAE) com o início do estádio reprodutivo R2 (estimativa do estádio com base no florescimento quando 50% ou mais das plantas apresentavam estilo-estigmas visíveis).

A última determinação da área foliar foi realizada dia 28 de janeiro (98 DAE) em conjunto com a última coleta de gases. Aqui, apenas as folhas terminais do terço superior das plantas alocadas no interior das CCC's apresentava aspecto visual saudável (Figura 13a).

Figura 13 – Período final de coleta de gases e finalização do experimento. a. Coleta final de gases realizada no dia 28 de janeiro; b. Detalhes das plantas de milho senescentes; c. Detalhe no anel de vedação após o corte da parte aérea das plantas de milho; d. Detalhe da parte aérea da planta de milho

A retirada das plantas de milho do interior das CCC's foi realizada após a determinação da morte fisiológica, constatada na décima quinta semana após emergência (04 de fevereiro de 2013, 105 DAE) no estádio reprodutivo "R4" (Figura 13b a 13d), verificada pela ausência de atividade fotossintética e/ou respiratória determinada pelo analisador de gases Testo 535, instalado para determinar os fluxos de CO_2 em cada CCC.

6.2. Fluxos de N-N_2O

A importância deste trabalho pode ser reportada como o pioneirismo do estudo ao quantificar o potencial de emissão de uma planta em todos os estádios de seu ciclo, submetida a condições fisiológicas normais, ou seja, estabilidade de CO_2, temperatura e umidade relativa do ar (UR).

Os resultados de trabalhos anteriores realizados por períodos mais curtos do ciclo vegetal (PIHLATIE et al., 2005), utilizando tecidos excisados do vegetal (CHANG et al., 1998) ou ainda sem o controle das variáveis CO_2, temperatura e UR (BARUAH et al., 2012), prognosticaram perfeitamente a existência da rota alternativa às emissões de N_2O do solo, via, principalmente, fluxo transpiratório.

Contudo, estes trabalhos não resolvem o problema da real, ou mesmo potencial, influência exercida pelo conteúdo de N_2O no solo na totalidade das emissões da parte aérea ao longo dos diversos estádios de desenvolvimento de um cultivo.

Os dados aqui apresentados representam os fluxos de N-N_2O emitidos pela parte aérea das plantas de milho desde o período que antecede a fertilização nitrogenada até a senescência das plantas, utilizando as câmaras de crescimento e coleta (CCC's), nas quais o CO_2, a temperatura e a UR foram controlados e devidamente estabilizados, de forma a manter homogêneo o ambiente durante as amostragens.

Os resultados mostraram a existência de uma estreita correlação entre as emissões ocorridas no microcosmo do solo (Gráfico 2a) e aquelas oriundas da parte aérea das plantas (Gráfico 2b), ambos com padrão de respostas similares à fertilização nitrogenada de cobertura realizada no dia 09 de novembro.

A partir do dia 09 de novembro, como se pode observar pelo Gráfico 2a, houve uma tendência de aumento do fluxo de emissão de N-N_2O do solo (μg microcosmo^{-1} h^{-1}), sendo que depois do dia 26 de novembro houve uma redução, mantendo esta tendência até o dia 28

de janeiro. Os dados de fluxo de emissão de N-N_2O da planta foram categorizados da seguinte maneira conforme análise de variância e do teste Tukey: 03 de novembro a 09 de novembro, 17 de novembro a 19 de novembro e 26 de novembro a 28 de janeiro.

No Gráfico 2b, depois da aplicação do fertilizante nitrogenado, o fluxo de emissão de N-N_2O da planta (µg planta^{-1} h^{-1}) elevou-se, sendo que no dia 19 de novembro houve uma redução. Posteriormente, foi mantida a elevação do fluxo de emissão de N-N_2O pela planta a qual pode ser caracteriza em dois grupos de acordo com suas médias por meio da análise de variância e o teste Tukey: 24 de novembro a 15 de dezembro e 5 de janeiro a 28 de janeiro.

Após a fertilização nitrogenada, as condições impostas ao solo no interior dos microcosmos (elevada umidade e ausência de perdas de N por lixiviação) favoreceram a permanência de elevadas emissões de N-N_2O após o período sob influência do fertilizante nitrogenado. Este fato possibilitou não só determinar de modo mais preciso o potencial emissor da parte aérea ao longo do ciclo das plantas, como também, averiguar este comportamento de emissão em relação à expansão da área foliar como um dos fatores principais a influenciar na totalidade das emissões provenientes de uma planta.

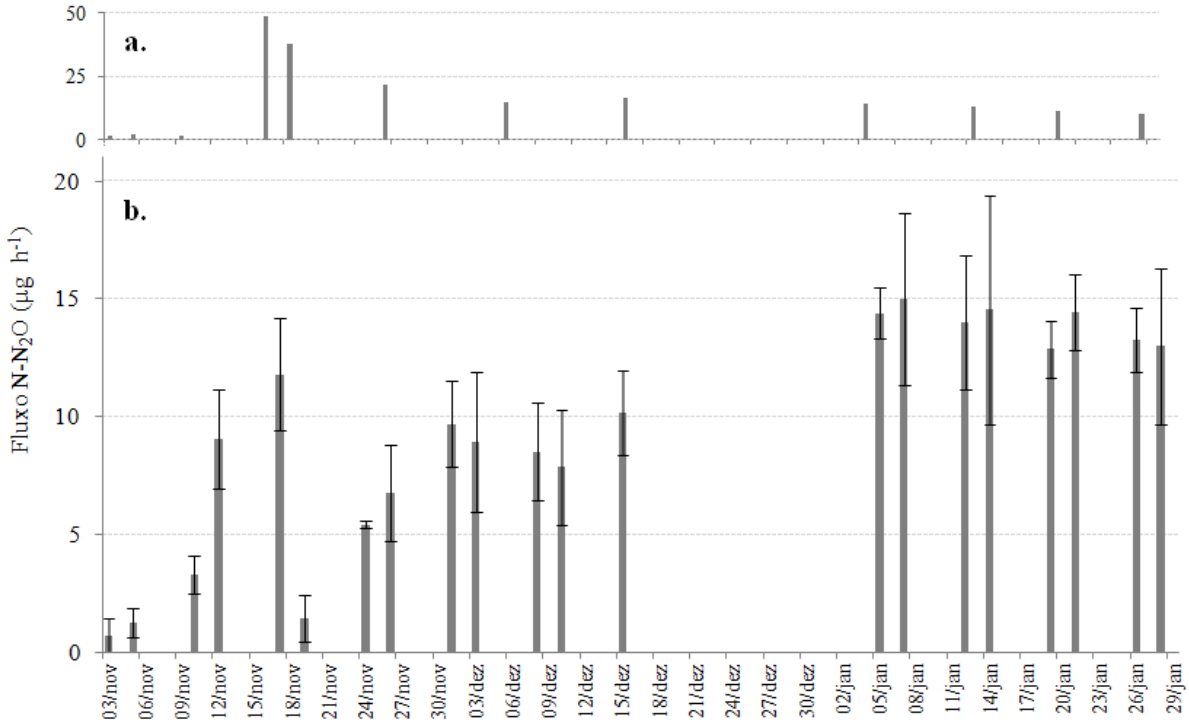


Gráfico 2 – Fluxos de N-N_2O em µg h^{-1}. a. Fluxo de N-N_2O do solo (µg microcosmo^{-1} h^{-1}) de um microcosmo; b. Fluxo de N-N_2O (µg planta^{-1} h^{-1}) das plantas de milho. Barras verticais representam o desvio padrão (n = 6)

6.3. Emissões de N_2O pelos microcosmos

Todas as amostragens de fluxos de N-N_2O do solo foram positivas, demonstrando que os microcosmos não atuaram como drenos. Este fato pode ser atribuído à manutenção da constante e elevada umidade do solo e redução das perdas de nitrogênio por volatilização/lixiviação, como mencionado anteriormente.

Os fluxos variaram entre o valor mínimo de 0,73 a 49,04 µg de N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (10,4 a 693,8 µg de N-N_2O m$^{-2}_{solo}$ h^{-1} respectivamente - Gráfico 3), sendo apresentados no Gráfico 2a. No período que antecedeu a fertilização nitrogenada, os fluxos observados estiveram próximos à média de 2 µg de N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (30 µg de N-N_2O m^{-2} $_{solo}$ h^{-1}). Em resposta à adubação nitrogenada realizada no dia 09 de novembro, o fluxo determinado nos microcosmos sofreu elevação acentuada e sua ocorrência pode ser observada até o dia 19 de novembro.

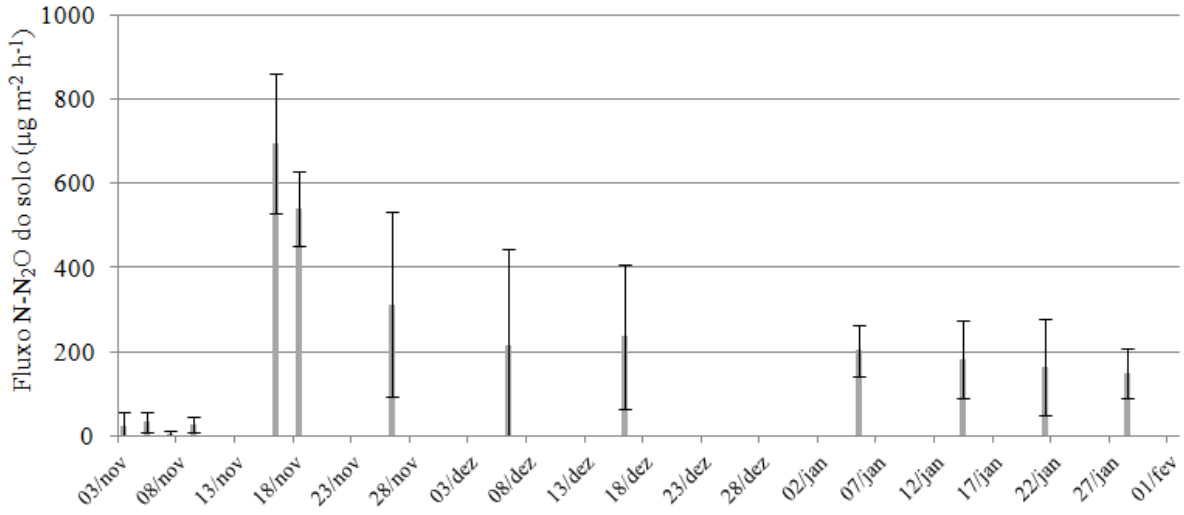


Gráfico 3 – Fluxo de N-N_2O (µg m$^{-2}_{solo}$ h^{-1}). Barras verticais representam o desvio padrão (n = 6)

Durante as amostragens das emissões do solo, duas leituras, integrantes do pico de resposta e ocorridos nos dia 12 e 14 de novembro, não foram determinadas por excederem o limite de detecção do cromatógrafo Shimadzu GC 2014. A primeira leitura integrante do pico máximo de resposta à adubação, considerado aqui como fluxo máximo, foi observado sete dias após a aplicação da ureia. A média deste período foi determinada em 32 µg de N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (428 µg de N-N_2O m$^{-2}_{solo}$ h^{-1}).

A redução gradual dos fluxos apresentou, a partir do dia 20 de novembro, forte tendência de estabilização em valores próximos à média de 19 μg de N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (272 μg de N-N_2O m^{-2}_{solo} h^{-1}) até a amostragem do dia 16 de dezembro. De 17 de dezembro até a última coleta em 28 de janeiro, fluxos abaixo dos 13,5 μg de N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (191 μg de N-N_2O m^{-2}_{solo} h^{-1}) marcaram o período.

6.4. Emissões de N_2O pela parte aérea das plantas de milho

O fluxo de N_2O emitido pela parte aérea das plantas de milho, durante o ciclo, variou de 65,5 a 1444,9 μg de N-N_2O m^{-2} $_{folha}$ h^{-1} (Gráfico 4), não sendo identificados períodos de fluxos negativos que indicassem algum consumo predominando sobre a produção em dado momento.

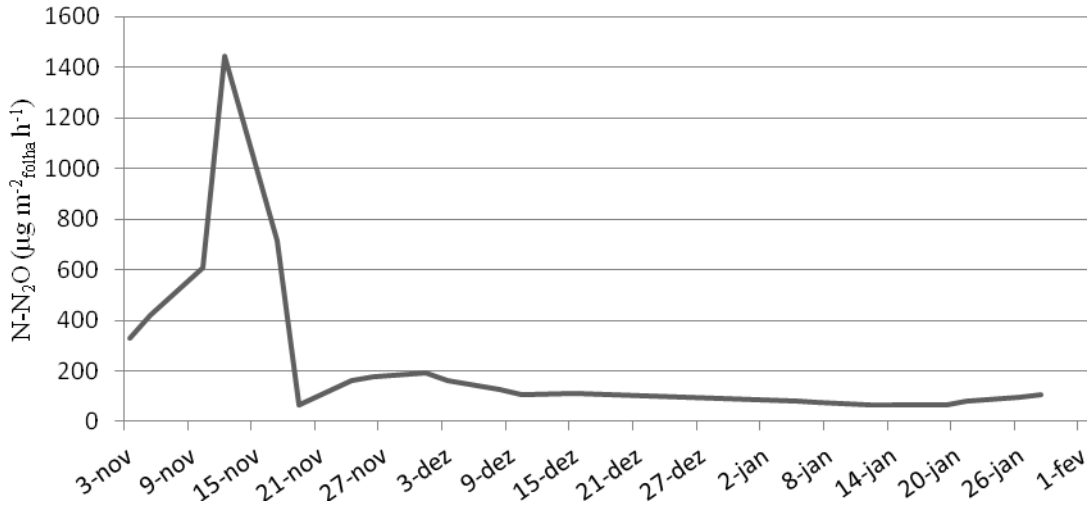


Gráfico 4 – Fluxo de N-N_2O (μg m^{-2}_{folha} h^{-1}) determinado por metro quadrado de folha

Durante o ciclo de crescimento das plantas de milho, os fluxos determinados foram caracterizados pela existência de três eventos distintos ocorridos sucessivamente: i) primeiro evento - do inicio das amostragens até a aplicação do N-fertilizante em cobertura; ii) segundo evento - efeito direto do N-fertilizante em cobertura e iii) terceiro evento - estabilização dos fluxos em função do aumento da área foliar.

Primeiro evento

O primeiro evento, com início no dia 03 de novembro, teve ocorrência determinada até o dia 09 de novembro, apresentando elevados fluxos variando de 301,00 a 608,88 μg de $N\text{-}N_2O\ m^{-2}\ _{folha}\ h^{-1}$, verificados durante as três primeiras leituras (Gráfico 4).

Cabe salientar que os valores dos fluxos emitidos pela parte aérea das plantas de milho assumem escala diferenciada quando se considera a diminuta área foliar de uma planta existente momentos antes da fertilização nitrogenada de cobertura (i.e. e estádios vegetativos V2-V3).

Desta forma, a apresentação e posterior discussão dos resultados serão realizados, também, considerando-se a estimativa das emissões de uma planta cultivada em seu respectivo microcosmo (Gráfico 2b). Esta metodologia foi adotada com o objetivo principal de facilitar a comparação e equiparação destas emissões com àquelas oriundas de uma área de solo contendora destes indivíduos sem, no entanto, deixar de apresentar os dados em um padrão de comparação internacional, ou seja, micrograma de óxido nitroso por metro quadrado de folha por hora (μg de $N\text{-}N_2O\ m^{-2}\ _{folha}\ h^{-1}$).

Portanto, os fluxos anteriormente descritos, provenientes de uma planta, variaram de 0,7 a 3,3 μg de $N\text{-}N_2O\ planta^{-1}\ h^{-1}$ ao longo do primeiro evento com média calculada de 1,7 μg de $N\text{-}N_2O\ planta^{-1}\ h^{-1}$ (452,87 μg de $N\text{-}N_2O\ m^{-2}\ _{folha}\ h^{-1}$).

Segundo evento

Os fluxos determinados nos dias que sucederam a fertilização nitrogenada responderam rapidamente à aplicação de ureia realizada no dia 09 de novembro de 2012. O fluxo máximo de 1442,9 μg de $N\text{-}N_2O\ m^{-2}\ _{folha}\ h^{-1}$ pôde ser determinado três dias após a fertilização nitrogenada.

De forma idêntica ao primeiro evento, são apresentadas as emissões determinadas por planta equivalente a um microcosmo.

Neste caso, fica evidente que o elevado fluxo, anteriormente descrito, tem sua correspondência inferior a 12 μg de $N\text{-}N_2O$ emitido por planta em uma hora, enfatizando o baixo potencial emissor das plantas nos estádios iniciais de cultivo. A média deste evento é de aproximadamente 7,4 μg de $N\text{-}N_2O\ planta^{-1}\ h^{-1}$ (741,89 μg de $N\text{-}N_2O\ m^{-2}\ _{folha}\ h^{-1}$).

O final do segundo evento foi determinado pela súbita redução observada nas emissões ocorrida no dia 19 de novembro de 2012.

Terceiro evento

O terceiro evento, com ocorrência até o final das coletas, teve por padrão uma estabilização em torno de dois valores médios principais nos fluxos medidos por metro quadrado de folha.

As primeiras quatro amostragens realizadas de 24 de novembro a 15 de dezembro apresentaram valores médios próximos a 147 μg de $N\text{-}N_2O$ m^{-2} $_{folha}$ h^{-1}. A partir de 05 de janeiro, com a redução de mais de 45% nos valores médios das primeiras leituras deste evento, até 28 de janeiro de 2013, os valores amostrados oscilaram pouco em torno da média de 80 μg de $N\text{-}N_2O$ m^{-2} $_{folha}$ h^{-1} (Gráfico 4).

Desta forma, foi possível observar que a redução e a estabilização nas emissões determinadas por metro quadrado de folha existente, após o período sob influência da fertilização nitrogenada, são compensadas pelo aumento de área foliar. Com isso, ocorre diariamente um incremento médio, quase constante, das emissões desta planta, ocupante de um microcosmo. O valor mínimo de 5,4 μg de $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1}, amostrado no dia 24 de novembro, marca o ponto inicial do terceiro evento. O incremento diário às emissões é determinado até o valor máximo de 15 μg de $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1} amostrado no dia 07 de janeiro de 2013, data que marca o início da sutil, porém perceptível, redução nos valores amostrados até o final das leituras realizado no dia 28 de janeiro de 2013. Durante o terceiro evento as emissões médias registradas por plantas são de aproximadamente 11 μg de $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1}.

6.5. Emissão acumulada de N_2O e Fator de emissão do fertilizante aplicado

O $N\text{-}N_2O$ (μg) acumulado emitido pelo microcosmo, de 03 de novembro de 2012 a 28 de janeiro de 2013, apresentou uma dinâmica adequada ao modelo de regressão quadrática, constatado pelo seu coeficiente de determinação (R^2) de 0,9971. Já para o acumulado de $N\text{-}N_2O$ (μg) emitido pela parte aérea da planta durante o mesmo período, demonstrou comportamento em consonância ao modelo de regressão linear e simples, obtendo um R^2 de 0,9799 (Gráfico 5).

Os fatores de emissão foram calculados com base na totalidade de fertilizante nitrogenado aplicado (base + cobertura) nos microcosmos. O fator total de emissão total foi estimado em torno de 9%, sendo os fluxos provenientes do solo somados aos das plantas.

A emissão total acumulada (planta + microcosmo) (Gráfico 5) ao longo do ciclo foi de 42144,34 μg de N-N_2O. Considerando este valor, as plantas foram responsáveis por aproximadamente 20% destas emissões, ou seja, 8225 μg de N-N_2O planta^{-1} emitidos de 03 de novembro a 28 de janeiro.

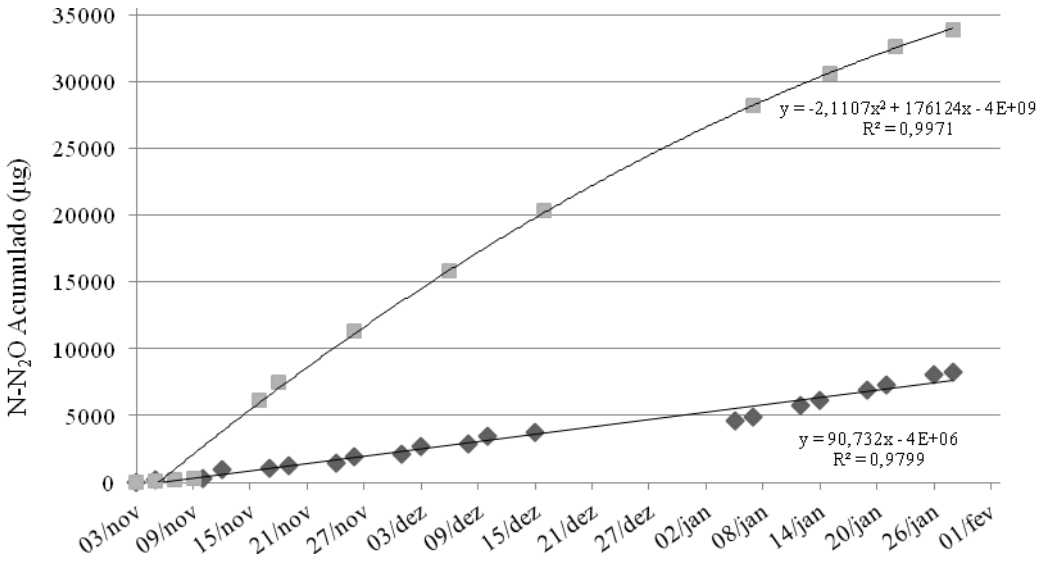


Gráfico 5 – Emissões acumuladas de N_2O por microcosmo ( ) e pela parte aérea ( ) das plantas de milho no período de 03 de novembro de 2012 a 28 de janeiro de 2013

7. DISCUSSÃO

7.1. Fluxos de N_2O do solo

Grande tem sido a discussão no meio científico acerca do real impacto exercido pelos fatores como temperatura, umidade, teor de matéria orgânica, pH, concentração de nitrogênio na solução do solo, textura e estrutura do solo sobre os fluxos de N_2O nas diversas classes de solos existentes. Contudo, o efeito positivo de fatores como temperatura, adubação nitrogenada e umidade do solo exercem sobre o aumento das emissões de N_2O é exposta em diversas pesquisas (BOWDEN; STEUDLER; MELILLO, 1980).

Com estes parâmetros e na busca pela indução da síntese de N_2O, favorecendo não só a ocorrência de um pico de resposta à fertilização nitrogenada clara e definida, como também maximizando o período com fluxos positivos elevados ao longo do ciclo, adotamos três medidas em particular.

A primeira medida teve como foco reduzir as perdas de N por volatilização na forma de NH_3, sabendo que estas, sob certas condições podem ultrapassar 60% do total do fertilizante aplicado (CANTARELLA, 2007). Assumiu-se como medida preventiva a irrigação de cada microcosmo com 1,3 litros de água (volume equivalente à lâmina de 20mm – HARGROVE, 1988) logo após a aplicação do fertilizante nitrogenado.

A segunda medida teve por objetivo manter a umidade do solo próxima a 60% da capacidade de campo (CC) por todo o período amostral. Isto porque as perdas de N decorrentes do processo de desnitrificação podem variar de menos de 1% (LIU et al., 2010) a mais de 50% (MOSIER et al., 1986) influenciadas principalmente pelo teor de umidade do solo. No entanto, condições de solo com umidade de até 60% da CC são eficientes em induzir as emissões de N_2O (SCHEER et al., 2008). Esta resposta é esperada devido à redução gradual da disponibilidade de oxigênio no perfil do solo com o enchimento dos poros com água. Nestas condições de hipóxia, a desnitrificação induz o nitrato a tornar-se um possível aceptor de elétrons (BREMNER, 1997), sendo reduzido a N_2O. Situações de umidade do solo superiores a 60% da CC podem gerar um ambiente anóxico que tem como produto final da desnitrificação o N_2.

A terceira medida objetivou reduzir as perdas de NO_3^- por lixiviação, uma vez que os solos dos microcosmos não foram irrigados em excesso evitando a percolação de água e solutos nela dissolvidos pelos drenos.

O resultado final previsível e quase óbvio tem na totalidade dos fluxos positivos de N_2O emitidos pelos microcosmos a resposta almejada.

Portanto, os elevados fluxos de N-N_2O provenientes dos microcosmos, determinados ao longo desta pesquisa, tem na comparação com a vastidão de resultados de pesquisa disponível a equiparação de valores necessária para fundamentá-lo.

O fluxo máximo de 49 μg N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (693 μg N-N_2O m$^{-2}_{solo}$ h^{-1}) observado sete dias após a aplicação de ureia e a média das leituras subsequentes ao período sob influência do fertilizante nitrogenado em 16,22 μg N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (230 μg N-N_2O m$^{-2}_{solo}$ h^{-1}) são significativamente maiores que as iniciais de 2 μg N-N_2O microcosmo^{-1} h^{-1} (30 μg N-N_2O m$^{-2}_{solo}$ h^{-1}).

Estes fluxos podem ser comparados com resultados de outras pesquisas (LIU et al., 2010; BARUAH et al., 2012; LISBOA et al., 2011), onde fluxos superiores a 500 μg m$^{-2}_{solo}$ h^{-1} são, comumente, observados nos primeiros dias após a aplicação do fertilizante nitrogenado. Por exemplo, em trabalho desenvolvido pela equipe de Sans-Cobena et al. (2012), fluxos observados integrantes do pico de resposta do fertilizante nitrogenado ureia foram, em alguns casos, superiores a 800 μg m$^{-2}_{solo}$ h^{-1}. É importante ressaltar que estes fluxos, em muitos casos concentrados em curtos períodos, podem ser responsáveis por emissões equivalentes a mais de 70% do total de uma área ao longo de um ano (SCHEER et al., 2008; WOLF et al., 2010).

7.2. Fluxos de N_2O das plantas

A estreita correlação entre os elevados fluxos emitidos pelo solo e plantas durante o ciclo do milho tem duas causas claras. A primeira refere-se à influência do conteúdo de N_2O do solo sobre a emissão de quantias substanciais desse gás pela parte aérea das plantas. E a segunda ao aumento da área foliar ser um fator que eleva o fluxo final das plantas.

Antes de iniciar a discussão dos resultados em maior nível de detalhamento, é importante salientar que as emissões de N_2O pela parte aérea das plantas durante este trabalho são oriundas de três mecanismos distintos, ou seja, fluxo de massa via transpiração vegetal,

difusão pelas paredes celulares de células constituintes do caule das plantas e formação nas folhas (BARUAH et al., 2012; PIHLATIE et al., 2005; RUSH; RENNENBERG, 1998; SMART; BLOOM, 2001).

No entanto, os elevados fluxos determinados logo após a aplicação do fertilizante nitrogenado no solo permite que se considere um meio de transporte mais dinâmico que a difusão, uma vez que a ausência de uma estrutura especializada no transporte de gases, como aerênquima, tornaria esta via demasiadamente morosa. Além disso, o aumento nas emissões foliares ao longo do ciclo, mesmo com a redução nos fluxos totais emitidos pelo solo, possibilita considerar uma maior significância do fluxo transpiratório nos valores diários emitidos que possíveis emissões provenientes do processo reducional do nitrato. Desta forma, assumimos o fluxo transpiratório como principal mecanismo responsável e capaz de manter os fluxos observados nos níveis determinados.

O fluxo máximo de 1442 μg $N\text{-}N_2O$ m^{-2} $_{folha}$ h^{-1} aqui determinado durante o pico de resposta ao fertilizante nitrogenado no segundo evento é duas vezes maior que os encontrados em trabalhos anteriores (CHEN et al., 1999; BARUAH et al., 2012). De maneira simplista, esta variação poderia ser atribuída apenas às diferenças existentes entre espécies utilizadas nas diversas pesquisas. No entanto, sabe-se que mesmo plantas de uma única variedade (e mesmo um único indivíduo) podem apresentar elevadas variações em seus fluxos transpiratórios ao longo de um dia, culminando em montantes hídricos requeridos pelas plantas consideravelmente distintos ao longo de um ciclo.

Esta necessidade hídrica é diretamente influenciada por fatores como umidade do solo, vento, temperatura e umidade relativa do ar. Mas, não é de se esperar que o fluxo transpiratório seja o único responsável pelas emissões totais de uma folha. Neste sentido, o N_2O presente na solução do solo (PIHLATIE et al., 2005) parece exercer influência predominante aos fatores anteriormente citados nos fluxos provenientes por unidade de área. Neste caso, a hipótese mais plausível para explicar as diferenças entre este estudo e a literatura é a influência do conteúdo de N_2O na solução do solo sobre a emissão total de um centímetro quadrado de folha.

Após o período diretamente influenciado pela aplicação do fertilizante nitrogenado, é observada a estabilização das emissões em valores próximos a 172 e 89 μg $N\text{-}N_2O$ m^{-2} $_{folha}$ h^{-1} no início e final do terceiro evento, respectivamente. Estes valores são próximos aos observados por Chen et al. (2002) e Zou et al. (2005). Neste caso, continua a divergência de espécies, porém o aporte nitrogenado em todas as culturas trabalhadas e os elevados fluxos observados ao longo do ciclo possibilitam a equiparação dos resultados. Este fluxo

considerável emitido ao longo do ciclo por área foliar indica o claro efeito de que qualquer alteração no conteúdo do solo repercutirá quase que instantaneamente nas emissões da parte aérea das plantas.

Contudo, os valores quando expressos em *"quantidade emitida por metro quadrado de folha"* em um dado período nem sempre expressam o real significado das emissões provenientes de uma população. Isto, pois como mencionado anteriormente, os valores emitidos por um indivíduo assumem escala diferenciada em função da variação de seu tamanho e claro, área foliar. Com este direcionamento, pressupõe-se que uma planta de milho apresentando 20 centímetros quadrados de área foliar nas primeiras semanas após o plantio, coincidentemente período da fertilização nitrogenada, poderá apresentar facilmente mais de meio metro quadrado de área foliar em sua entrada no período reprodutivo (SANGOI; SCHMITT; ZANIN, 2007).

Simultâneo ao aumento da área foliar existirá o aumento da demanda de água pelas plantas. Esta água translocada pelo xilema, carreando nutrientes, gases dissolvidos e controlando a temperatura, poderá facilmente ultrapassar 10 milímetros necessários a partir da floração, dependendo das condições de disponibilidade de água no solo, temperatura e umidade relativa do ar. Desta forma, esta única planta propensa a emitir a valores tão altos quanto 1442 μg $N\text{-}N_2O$ por metro quadrado de folha em uma hora, momentos após a fertilização nitrogenada, tem na sua diminuta área foliar (e fluxo transpiratório) o fator limitante a emissão de elevados valores totais de N_2O. Assim, o fluxo anteriormente referido por área foliar é equivalente a pouco mais de 3 μg $N\text{-}N_2O$ emitido por planta no período de uma hora (μg $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1}).

Isto significa que, ao considerar os fluxos médios dos microcosmos e das plantas durante o primeiro evento ocorrido de 03 a 09 de novembro de 2012, o valor médio dos fluxos emitidos por metro quadrado de folha de 453 μg de $N\text{-}N_2O$ (i. e. 1,7 μg $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1}) representa pouco mais de 44% do total emitido pelo somatório microcosmo + planta (i. e. 3,7 μg $N\text{-}N_2O$ h^{-1}).

Durante o segundo evento, esta diminuta área foliar tem ainda influência sobre o padrão de emissões totais no somatório final. Logo, a média das emissões registrada por metro quadrado de folha, superior a 740 μg $N\text{-}N_2O$ m^{-2} $_{folha}$ h^{-1}, tem na equivalente média de 7,4 μg $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1} o registro do baixo potencial emissor que um indivíduo (planta de milho) apresenta no início do cultivo. Este fato pode ser constatado ao se verificar uma participação das emissões provenientes da parte aérea de uma planta inferior a 25% do total emitido pelo somatório microcosmo + planta (39,4 μg $N\text{-}N_2O$ h^{-1}).

Com a progressão do ciclo, expansão da área foliar e consequente maior fluxo transpiratório, eleva-se também o potencial emissor de uma planta. Porém, com a rápida redução na síntese de N_2O por organismos nitrificadores e desnitrificadores no solo dias ou mesmo semanas após o pico induzido pela fertilização nitrogenada, este incremento na área foliar de uma planta não seria acompanhado por um aumento proporcional nas emissões foliares.

No entanto, situações que favoreçam sínteses tardias de N_2O somadas ao incremento da parte aérea ao longo do ciclo aumentarão o total emitido por uma planta ao longo do ciclo. Este aspecto pode ser claramente exemplificado ao se analisar as emissões provenientes do solo e das plantas no período de 20 de novembro a 16 de dezembro. Enquanto as emissões dos microcosmos tiveram decréscimo com tendência de estabilização a valores próximos a 19 μg $N\text{-}N_2O$ microcosmo^{-1} h^{-1} (272 μg $N\text{-}N_2O$ m^{-2}_{solo} h^{-1}), as emissões médias deste indivíduo alocado no microcosmo apresentam tendência de aumento em suas emissões, passando de aproximadamente 5,4 μg $N\text{-}N_2O$ planta^{-1} h^{-1} para mais de 10 μg $N\text{-}N_2O$ planta^{-1} h^{-1}, acompanhando a expansão foliar do período. Considerando a emissão média por planta de 8,2 $N\text{-}N_2O$ h^{-1} (147 μg $N\text{-}N_2O$ m^{-2}_{folha} h^{-1}), pode-se inferir 30 % das emissões totais do período provenientes das plantas (i. e. 27,3 μg $N\text{-}N_2O$ h^{-1}).

Ainda durante o segundo evento é possível constatar a redução de mais de 45% nos valores médios dos fluxos determinados por metro quadrado de folha (i. e. de 147 para 80 μg $N\text{-}N_2O$ m^{-2}_{folha} h^{-1}) até o final das coletas dia 28 de janeiro de 2013. No entanto, esta redução comporta-se de forma inversa nas emissões determinadas por indivíduo e com um incremento diário às emissões o fluxo máximo emitido por planta é determinado no dia 07 de janeiro de 2013. Esta escalada nas emissões por indivíduo resulta numa participação de mais de 50% no total do somatório das médias do período.

Este aumento percentual na participação das emissões pela parte aérea das plantas exemplifica bem como o potencial emissor das plantas está latente (à espera) e pequenas elevações no conteúdo do solo podem culminar em significativos valores emitidos em conjunto com o processo transpiratório.

7.3. Emissão acumulada de N_2O e Fator de emissão do fertilizante aplicado

O fator de emissão total estimado para o total emitido por solo + parte aérea das plantas foi de aproximadamente 9% do montante total de nitrogênio aplicado na cultura.

De acordo com o IPCC (2001), 1,25% ±1,00 do fertilizante nitrogenado aplicado ao solo é emitido como N_2O para a atmosfera. O fator de emissão calculado por microcosmo de 6,2% durante esta pesquisa é mais elevado que este valor estimado, porém é consistente com outros resultados em condições na qual a umidade e as elevadas concentrações de N favoreceram a síntese de N_2O (SCHEER et al., 2008). Além disso, é comum na literatura a citação de fatores de emissão desde pouco mais de 0,03% a mais de 6% do fertilizante nitrogenado aplicado ao milho (SANS-COBENA et al., 2012).

Com relação ao N_2O emitido pela parte aérea das plantas, a inexistência de metodologia padronizada para estimar as emissões alia-se a escassos trabalhos disponíveis, o que dificulta qualquer tipo de comparação.

No entanto, o montante total de N_2O proveniente da parte aérea das plantas (μg de $N\text{-}N_2O$) corresponde a 20% do total das emissões de microcosmo + planta, valor próximo aos 21% e 25% relatadas por Chen et al. (1999) e Zou et al. (2005) respectivamente. A divergência existente, metodologias adotadas (falta de controle de variáveis ambientais e adoção de métodos destrutivos) e período amostral permitem entender que os resultados aqui apresentados estão em conformidade com as dinâmicas de fluxos quotidianas.

Além disso, os elevados fluxos observados tanto na parte aérea das plantas quanto nos microcosmos após o período sob influência do fertilizante nitrogenado possibilitam considerar a elevada pressão do solo nos valores finais dos fluxos com plantas apresentando áreas foliares expandidas. Este fato deve ser considerado como de baixa ocorrência em condições de campo, uma vez que períodos restritos, geralmente relacionados com fertilizações nitrogenadas, são responsáveis pela quase totalidade das emissões.

O resultado direto deste aspecto na prática serão determinações de contribuições foliares inferiores a 20%, como apresentado nesta pesquisa. Isto pode ser explicado pela pequena contribuição das plantas no montante final das emissões nos períodos seguintes à adubação nitrogenada em virtude de sua diminuta área foliar.

Desta forma, o elevado potencial emissor de uma planta, aqui determinado ao longo desta pesquisa e influenciado, principalmente, pelo conteúdo do solo, deve ser cuidadosamente analisado, pois as elevadas concentrações de N_2O observadas nos cultivos tem períodos de duração restritos.

Com isso, o fator de emissão aqui determinado, superior aos 2%, deverá com certeza apresentar valores inferiores em determinações diretas a campo.

Este fato não diminui a adoção de práticas que minimizem os impactos gerados pelo uso de fertilizantes nitrogenados (SNYDER et al., 2009). Mesmo inferior ao valor estimado neste estudo, é superior ao do IPCC (2001) apenas para uma das fontes, ou seja, o solo. A descrição do potencial desta via emissora aqui apresentada, quantificada e atualmente desconsiderada, expõe a complexidade dos inventários de fluxos de N_2O. Neste sentido, a adoção de técnicas padronizadas para as plantas que refinem as atuais estimativas e balanços globais devem ser urgentemente adotadas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As dificuldades de se conduzir experimentos em condições controladas para avaliar alterações de concentração de uma molécula próximas ao limite de detecção do analisador puderam ser resolvidas através da adoção de técnicas simples e de baixo custo no aprimoramento das câmaras de crescimento e coleta (CCC's). Neste sentido é possível concluir que, este projeto de pesquisa utilizou eficientemente as CCC's e com ampla margem de confiança. Desta forma, sua adoção na determinação das emissões de N_2O oriundas da parte aérea de diversas espécies vegetais conduzirá a dados mais precisos nas estimativas regionais e nacionais.

Com o uso das CCC's e com a determinação dos fluxos provenientes da parte aérea de plantas de milho oscilando entre 0,7 e 15 μg $N\text{-}N_2O$ $planta^{-1}$ h^{-1} durante todo o período amostral, os resultados aqui apresentados indicam que as atuais estimativas de emissão de N_2O em uma área sob cultivo estão subestimados.

Fluxos de N_2O provenientes do solo e da parte aérea das plantas apresentam padrões semelhantes de resposta ao fertilizante nitrogenado, sendo que o conteúdo do solo é apontado como o principal fator a influenciar o total das emissões de um indivíduo.

A redução nas emissões provenientes dos microcosmos observada no período posterior à influência do fertilizante nitrogenado e por esta redução não acompanhar as emissões totais de um indivíduo, permite considerar o aumento da área foliar como outro fator determinante das emissões totais de uma planta.

Desta forma, as emissões de um indivíduo são limitadas pela diminuta área foliar nas fases iniciais de cultivo. Com a redução de N_2O no solo, passado o período de influência do fertilizante nitrogenado, o aumento da área foliar (e consequentemente seu potencial emissor) não exercerá influência sobre o montante final emitido.

Contudo, situações de síntese e disponibilidade de N_2O no solo em momentos avançados do ciclo das plantas (e elevadas áreas foliares) resultarão no aumento exponencial do montante final emitido por um indivíduo.

Portanto, é possível determinar o primeiro período crítico real vinculado à adubação nitrogenada e os demais períodos críticos passíveis de ocorrência em qualquer fase do ciclo de uma planta. Contudo, com a progressão do ciclo da planta, existirá a elevação do potencial emissor de um indivíduo com seu inerente aumento de área foliar.

Cada planta em conjunto com seu microcosmo emitiu ao longo dos 105 dias de coletas mais de 42 mg de N-N_2O. Aproximadamente 20 % deste valor (8,2 mg N-N_2O) foram provenientes unicamente da parte aérea das plantas de milho.

Com este montante emitido, estimou-se o fator de emissão das plantas de milho e dos microcosmos de 2 % e 6,2 % respectivamente.

Por fim, é importante salientar que, o potencial emissor desta via aqui descrito e quantificado expõe a complexidade a que inventários de fluxos de N_2O estão sujeitos. Sendo que diferenças nas metodologias mensuradoras das fontes emissoras (i. e. solo ou parte aérea vegetal) podem induzir a discrepâncias nos fluxos totais acumulados de N_2O estimados de uma região. Estes erros só poderão ser reduzidos com a adoção de técnicas padronizadas que refinem as atuais estimativas e balanços globais. Esta nova sistemática, englobando esta poderosa fonte emissora, deve ser urgentemente implementada como forma de buscar e propor novas estratégias mitigadoras de N_2O.

REFERÊNCIAS

AMADO, T. J. C.; MIELNICZUK, J.; FERNANDES, B. S. Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, p. 179-189, 2000.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, p. 105-121, 2009.

ANDRADE, F. H.; VEGA, C.; UHART, S. O. Kernel number determination in maize. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 453-459, 1999.

ARAUJO, L. A. N.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 771-777, 2004.

ASSIS, J. P. **Modelo estocástico para estimação da produtividade potencial de milho em Piracicaba, SP**. 2004. 168 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BARUAH, K. K.; GOGOI, B.; BORAH, L.; GOGOI, M.; BORUAH, R. Plant morphophysiological and anatomical factors associated with nitrous oxide flux from wheat (*Triticum aestivum*). **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 125, p. 507-516, 2012.

BAZYLINSKI, D. A.; SOOHOO, C. K.; HOLLOCHER, T. C. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* on nitrous oxide. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 51, p. 1239-1246, 1986.

BERGONCI, J. I.; BERGAMASCHI, H.; SANTOS, A. O.; FRANÇA, S.; RADIN, B. Eficiência da irrigação em rendimento de grãos e matéria seca de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 7, p. 949-956, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 15 abr. 2013.

BREMNER, J. M. Sources of nitrous oxide in soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems,** Dordrecht, v. 49, p. 7-17, 1997.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.

BUSTAMANTE, M. M. C.; MARTINELLI, L. A.; SILVA, D. A.; CAMARGO, P. B.; KLINK, C. A.; DOMINGUES, T. F.; SANTOS, R. V. ^{15}N natural abundance in woody plants and soils of central Brazilian Savannas (Cerrado). **Ecological Applications,** Washington, DC, v. 14, p. 200-213, 2004.

BUTTERBACH-BAHL, K.; BREUER, L.; GASCHE, R. Exchange of trace gases between soils and the atmosphere in Scots pine forest ecosystems of the northeastern German lowlands: 1. Fluxes of N_2O, NO/NO_2 and CH_4 at forest sites with different N-deposition. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 167, p. 123-134, 2002.

CAI, Y.; DING, W.; LUO, J. Spatial variation of nitrous oxide emission between interrow soil and interrow plus row soil in a long-term maize cultivated sandy loam soil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 181-182, p. 2-10, 2012.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CARVALHO JUNIOR, V. N. Deposição atmosférica e composição química da água de chuva. **Tecnologia**, Fortaleza, v. 25, p. 61-71, 2004.

CHANG, C.; JANZEN, H. H.; CHO, C. M. ; NAKONECHNY, E. M. Nitrous oxide emission through plants. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 62, p. 35-38, 1998.

CHAPUIS-LARDY, L.; WRAGE, N.; METAY, A.; CHOTTE, J. Soils, a sink for N_2O? A review. **Global Change Biology**, Oxford, v.13, p. 1-7, 2007

CHEN, X.; BOECKX, P.; SHEN, S.; CLEEMPUT, O. van. Emission of N_2O from rye grass (*Lolium perenne* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.28, p. 393-396, 1999.

CHEN, X.; CABRERA, M. L.; ZHANG, L.; WU, J.; SHI, Y.; YU, W. T.; SHEN, S. M. Nitrous oxide emission from upland crops and crop-soil systems in northeastern China. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 62, p. 241-247, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, nono levantamento, junho 2012. Brasília, DF: Conab, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 15 abr. 2013.

CRUTZEN, P. J.; MOSIER, A. R.; SMITH, K. A.; WINIWARTER, W. N_2O release from agro-biofuel production negates global warming reduction by replacing fossil fuels. **Atmospheric Chemistry and Physics**, Göttingen, v. 8, p. 389-395, 2008.

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

DAKER. A. **Irrigação e drenagem**. 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria Freitas Bastos, 1970. 453 p. (Água na Agricultura, 3).

DENTENER, F.; CRUTZEN, P. J. A Three-dimensional model of the global ammonia cycle. **Journal of Atmospheric Chemistry**, Dordrecht, v. 19, n. 4, p. 331-369, 1994.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A. H. **Efeito da água no rendimento das culturas.** Tradução de H. R. Gheyi. Paraíba: Editora da UFPB, 1994. 307 p.

EICHNER, M. J., Nitrous oxide emissions from fertilized soils: summary of available data. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 19, n. 2, p. 272-280, 1990.

FANCELLI, A. L. Fenologia e exigências climáticas do feijoeiro. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (Ed.). **Feijão irrigado**. 3. ed. Piracicaba: ESALQ/USP, 1992. p. 5-22.

FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: < http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 05 abr. 2013.

FERREIRA, V. M.; MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M., Produtividade de genótipos de milho (*Zea mays L.*) sob manejo diferenciado de irrigação e adubação. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 24, n. 3, p. 663-670, 2000.

FRANÇA, S.; BERGAMASCHI, H.; ROSA, L. M. G. Modelagem do crescimento do milho em função da radiação fotossinteticamente ativa e do acúmulo de graus-dia, com e sem irrigação. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria. v. 7, n. 1, p.59-66, 1999.

FREITAS, F. O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays,* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris,* L.)**. 2001. 125 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

GALLOWAY, J. N.; DENTENER, F. J.; CAPONE, D. G.; BOYER, E. W.; HOWARTH, R. W.; SEITZINGER, S. P.; ASNER, G. P.; CLEVELAND, C. C.; GREEN, P. A.; HOLLAND, E. A.; KARL, D. M.; MICHAELS, A. F.; PORTER, J. H.; TOWNSEND, A. R.; VOROSMARTY, C. J. Nitrogen cycles: Past, present, and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153-226, 2004.

GHOSH, S.; MAJUMDAR, D.; JAIN, M.; Nitrous oxide emission from kharif and rabi legumes grown on an alluvial soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 473-478, 2002.

GOODMAN, M. História e origem do milho. In: PATERNIANI, E (Ed.). **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 1-38.

GOSHIMA, N.; MUKAI, T.; SUEMORI, M.; TAKAHASHI, M.; CABOCHE, M.; MORIKAWA, H. Emission of nitrous oxide (N_2O) from transgenic tobacco expressing antisense NIR mRNA. **The Plant Journal**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 75-80, 1999.

HARGROVE, W. L. Soil, environmental, and management factors influencing ammonia volatilization under field conditions. In: BOCK, B. R.; KISSEL, D. E. (Ed.). **Ammonia volatilization from urea fertilizers**. Muscle Shoals: National Fertilizer Development Center, Tenessee Valley Authority, 1988. p. 17-36. (Bulletin, Y-206).

HARPER, J. E. Evolution of nitrogen oxide(s) during in vivo nitrate reductase assay of soybean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, p. 1493-1499, 1981.

HEINCKE, M.; KAUPENJOHANN, M. Effects of soil solution on the dynamics of N_2O emissions: a review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v.55, p. 133-157, 1999.

HENCKEL, P. A. Physiology of plants under drought. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 15, p. 363-86, 1964.

HUANG, Y.; ZOU, J.; ZHENG, X.; WANG, Y.; XU, X. Nitrous oxide emissions as influenced by amendment of plant residues with different C:N ratios. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 973-981, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 15 abr. 2013.

INTERNATIONAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Technical summary: Climate change**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2001. 398 p.

INTERNATIONAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories.** Hayama, Kanagawa, Japan: Institute for Global Environment Strategies, 2006. v. 4.

KRISTENSEN, H. L.; DEBOSZ, K.; MCCARTY, G. W. Short-term effects of tillage on mineralization of nitrogen and carbon in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford**,** v. 35, p. 979-986, 2003.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531 p.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, C. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 1202 p.

LI, N.; CHEN, G. N_2O emission by plant and influence of fertilization. **Chinese Journal of Applied Ecology**, Beijing, v. 4, p. 295-298, 1993.

LISBOA, C. C.; BUTTERBACH-BAHL, K.; MAUDER, M.; KIESE, R. Bioethanol production from sugarcane and emissions of greenhouse gases – known and unknowns. **Global Change Biology Bioenergy**, Oxford, v. 3, p. 277-292, 2011.

LIU, C.; ZHENG, X.; ZHOU, Z.; HAN, S.; WANG, Y.; WANG, K.; LIANG, W.; LI, M.; CHEN, D.; YANG, Z. Nitrous oxide and nitric oxide emissions from an irrigated cotton field in Northern China. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 332, p. 123-134, 2010.

MATSON, P. A.; VITOUSEK, P. M. Ecosystem approach to a Global Nitrous Oxide Budget. **BioScience**, Washington, DC, v. 40, n. 9, p. 667-672, 1990.

MATZENAUER, R.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M. A.; RIBOLD, J. Modelos agrometeorológicos para a estimativa do rendimento do milho, em função da disponibilidade hídrica no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 225-241, 1995.

MCCLINTOCK, B. Chromosome constitutions of Mexicans and Guatemalan races of maize. **Annual Report of Department of Genetics of Carnegie Institute of Washington**, Washington, DC, v. 59, p. 461-472, 1959.

MONSON, R. K.; LERDAU, M. T.; SHARKEY, T. D.; SCHIMEL, D. S.; FALL, R. Biological aspect of constructing volatile organic compound emission inventories. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 29, n. 21, p. 2989-3002, 1995.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MOSIER, A. R.; GUENZI, W. D.; SCHWEIZER, E. E. Soil losses of dinitrogen and nitrous oxide from Irrigated Crops in Northeastern Colorado. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 50, n. 2, p. 344-348, 1986.

MOSIER, A.; KROEZE, C.; NEVISON, C.; OENEMA, O.; SEITZINGER, S.; CLEEMPUT, O. van; Closing the global N_2O budget: nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. **Nutrient Cycling in Agroecossystems**, Dordrecht, v. 52, p. 225-248, 1998.

MOSIER, A. R.; MOHANTY, S. K.; BHADRACHALAM, A.; CHAKRAVORTI, S. P. Evolution of dinitrogen and nitrous oxide from soil to atmosphere through rice plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, p. 61-67, 1990.

MOSIER, A. R. ; PARTON, W. J.; HUTCHINSON, G. L. Modeling nitrous oxide evolution from cropped and native soils. **Ecological Bulletins**, Lund, Sweden, v. 35, p. 229-241, 1983.

MUNDSTOCK, C. M.; BREDEMEIER, C. Dinâmica do afilhamento afetada pela disponibilidade de nitrogênio e sua influencia na produção de espigas e grãos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 26, p. 141-149, 2002.

NOVAIS, M. V.; NOVAIS, R. F.; BRAGA, J. M. Efeito da adubação nitrogenada e seu parcelamento sobre a cultura do milho em Patos de Minas. **Revista Ceres,** Viçosa, v. 21, n. 115, p. 193-202, 1974.

NYSTROM, R. A. **Membrane Physiology**. New Jersey: Englewood Cliffs, 1973. 252 p.

OKEREKE, G. U. Growth yield of denitrifiers using nitrous oxide as a terminal electron acceptor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, p. 59-62, 1993.

OTEGUI, M.; ANDRADE, F. H. New relationships between light interception, ear growth, and kernel set in maize. In: WESTATE, M. E.; BOOTE, K. J. **Physiology and modeling kernel set in maize**. Madison: Crop Science Society of America, 2000. p. 89-102.

PAVINATTO, P. S.; CERETTA, C. A.; GIOTTO, E.; MOREIRA, I. C. L. Nitrogênio e potássio em milho irrigado: análise técnica e econômica da fertilização. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 358-364, 2008.

PIHLATIE, M.; AMBUS, P.; RINNE, J.; PILEGAARD, K.; VESALA, T. Plant-mediated nitrous oxide emissions from beech (*Fagus sylvatica*) leaves. **New Phytologist**, London, v. 168, p. 93-98, 2005.

PROUS, A. O povoamento da América visto do Brasil: uma perspectiva crítica. **Revista USP**, São Paulo, n. 34, p. 8-21, 1989.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (Ed.). **Recomendação de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. p. 56-57. (Boletim Técnico, 100).

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análise de solos para fins de fertilidade.** Campinas: Instituto Agronômico, 1983. 31 p. (Boletim Técnico, 81).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 928 p.

REICHARDT, K. **Processos de transferências no sistema solo-planta-atmosfera.** 4. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1985. 466 p.

REICHARDT, K.; LIBARDI, P. L.; VICTÓRIA, R. L.; VIEGAS, G. Dinâmica do Nitrogênio num solo cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 3, p. 17-20, 1979.

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J.; BENSON, J. B. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1993. 26 p. (Special Report, 48).

ROSENKRANZ, P.; BRÜGGERMANN, N.; PAPEN, H.; XU, Z.; SEUFERT, G.; BUTTERBACH-BAHL, K. NO_2, NO and CH_4 exchange, and microbial N turnover over a Mediterranean pine forest soil. **Biogeosciences Discussions**, Göttingen, Germany, v. 3, p. 121-133, 2006.

RUSCH, H.; RENNENBERG, H. Black alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) trees mediate methane and nitrous oxide emission from the soil to the atmosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 201, n. 1, p. 1-7, 1998.

SANGOI, L.; SCHMITT, A.; ZANIN, C. G. Área foliar e rendimento de grãos de híbridos de milho em diferentes populações de plantas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 6, n. 3, p. 263-271, 2007.

SANS-COBENA, A.; SÁNCHEZ-MARTÍN, L.; GARCÍA-TORRES, L.; VALLEJO, A. Gaseous emissions of N_2O and NO and NO_3^- leaching from urea applied with urease and nitrification inhibitors to a maize (*Zea mays*) crop. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 149, p. 64-73, 2012.

SCHEER, C.; WASSMANN, R.; KIENZLER, K.; IBRAGIMOV, N.; ESCHANOV, R. Nitrous oxide emissions from fertilized, irrigated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in the Aral Sea Basin, Uzbekistan: influence of nitrogen applications and irrigation practices. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 290-301, 2008.

SCHLESINGER, W.H. **Biogeochemistry:** An analysis of global change. New York: Academic Press, 1997.

SHARKEY, T. D. Emission of low molecular mass hydrocarbons from plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 1, n. 3, p. 78-82, 1996.

SHOUN, H.; KIM D.; UCHIYAMA, H.; SUGIYAMA, J. Denitrification by fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 94, p. 277-282, 1992.

SIERRA, J.; MARBÁN, L. Nitrogen mineralization pattern of an oxisol of Guadeloupe, French West Indies. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 2002-2010, 2000.

SILVA, S. C. **Relação entre o tamanho das sementes de milho (*Zea mays* L.) com a germinação, o vigor e os componentes da produção de grãos**. 2000. 69 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) –Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2000.

SKIBA, U.; SMITH, K. A.; FOWLER, D. Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 11, p. 1527-1536, 1993.

SMART, D. R.; BLOOM, A. J. Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 98, n. 14, p. 7875-7878, 2001.

SNYDER, C. S.; BRUULSEMA, T. W.; JENSEN, T. L.; FIXEN, P. E. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 133, p. 247-266, 2009.

STEUDLER, P. A.; MELILLO, J. M.; BOWDEN, R.; CASTRO, M.; LUGO, A. The effects of natural and human disturbances on soil nitrogen dynamics and trace gas fluxes in a Puerto Rican wet forest. **Biotropica**, Washington, DC, v. 23, p. 356-363, 1991.

STEVENS, R. J.; LAUGHLIN, R. J. Measurement of nitrous oxide and di-nitrogen emissions from agricultural soils. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 52, n. 2, p. 131-139, 1998.

STEVENSON, F. J. Origin and distribution of nitrogen in soil. In: STEVENSON, F. J. (Ed.). **Nitrogen in agricultural soil**. Madison: ASA, 1982. p. 1-42.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TERAZAWA, K.; ISHIZUKA, S.; SAKATA, T.; YAMADA, K.; TAKAHASHI, M. Methane emissions from stems of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* trees in a floodplain forest. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v. 39, n. 10, p. 2689-2692, 2007.

THOMSEN, I. K.; OLESEN, J. E.; SCHJONNING, .; JENSEN, B.; CHRISTENSEN, B.T. Net mineralization of soil N and ^{15}N-ryegrass residue in differently textured soils of similar mineralogical composition. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v. 33, p. 277-285, 2001.

TRINSOUTROT, I.; RECOUS, S.; BENTZ, B.; LINE`RES, M.; CHE`NEBY; NICOLARDOT, B. Biochemical quality of crop residues and carbon and nitrogen mineralization kinetic under nonlimiting nitrogen conditions. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 918-926, 2000.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. Disponível em:< http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome >. Acesso em: 15 abr. 2013.

VANECKO, S.; VARNER, J. E. Studies on nitrite metabolism in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 30, p. 388-390, 1955.

WATSON, R. T.; RODHE, H.; OESCHGER, H.; SIEGENTHALER, V. Greenhouse gases and aerosols. In: HOUGHTON, J. T.; JENKINS, G. T.; EPHRAUMS, J. J. (Ed.). **Climate chance**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 1-40. (The IPCC Scientific Assessment).

WEISKE, A.; BENCKISER, G.; HEBERT, T.; OTTOW, J. C. G. Influence of the nitrification inhibitor 3,4 Dimethylpyrazole Phosphate (DMPP) in comparison to Dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, n. 2, p. 109-117, 2001.

WOLF, B.; ZHENG, X.; BRÜGGEMANN, N.; CHEN, W.; DANNENMANN, M.; HAN, X.; SUTTON, M. A.; WU, H.; YAO, Z.; BUTTERBACH-BAHL, K. **Nature**, London, v. 464, p. 881-884, 2010.

YANG, L.; CAI, Z. The effect of growing soybean (*Glycine max*. L.) on N_2O emission from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1205-1209, 2005.

YU, K.; CHEN, G.; STRUWE, S. Production and reduction of nitrous oxide in agriculture and forest soils. **Chinese Journal of Applied Ecology**, Beijing, v. 11, p. 385-389, 2000.

ZOU, J.; HUANG, Y.; SUN, W.; ZHENG, X.; WANG, Y. Contribution of plants to N_2O emissions in soil-winter wheat ecosystem: pot and field experiments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 269, p. 205-211, 2005.