



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INTEGRAÇÃO DE CONHECIMENTOS PARA O USO EFICIENTE DO NITROGÊNIO NA AGRICULTURA

MANLIO SILVESTRE FERNANDES

Setembro/2014

Aumento populacional: previsão de 9 bilhões de pessoas em 2050
levantaram dúvidas quanto à nossa segurança alimentar, isso somado a dois anos de seca nas principais regiões produtoras do mundo, provocou um início de pânico nos últimos anos e tornou imperativo um esforço mundial para o aumento da produção e da produtividade.

As revistas *Plant Physiology* e *Plant Cell* preocupadas com essa perspectiva convocaram para julho de 2014, durante o Congresso anual da “American Society of Plant Biology”, em Portland no Oregon uma reunião sobre segurança alimentar, sob o título: “Feeding 9 billion”.

Aumento exponencial da produção de alimentos nos últimos 150 anos:

- Expansão da área cultivada
- Uso de fertilizantes (destaque = aplicação de N).

Em fazendas e estações experimentais :

- A produção de milho pulou de 3 para 14 t ha⁻¹
- Com uma variação de acúmulo de N na planta de 50 para 300 kg N ha⁻¹.

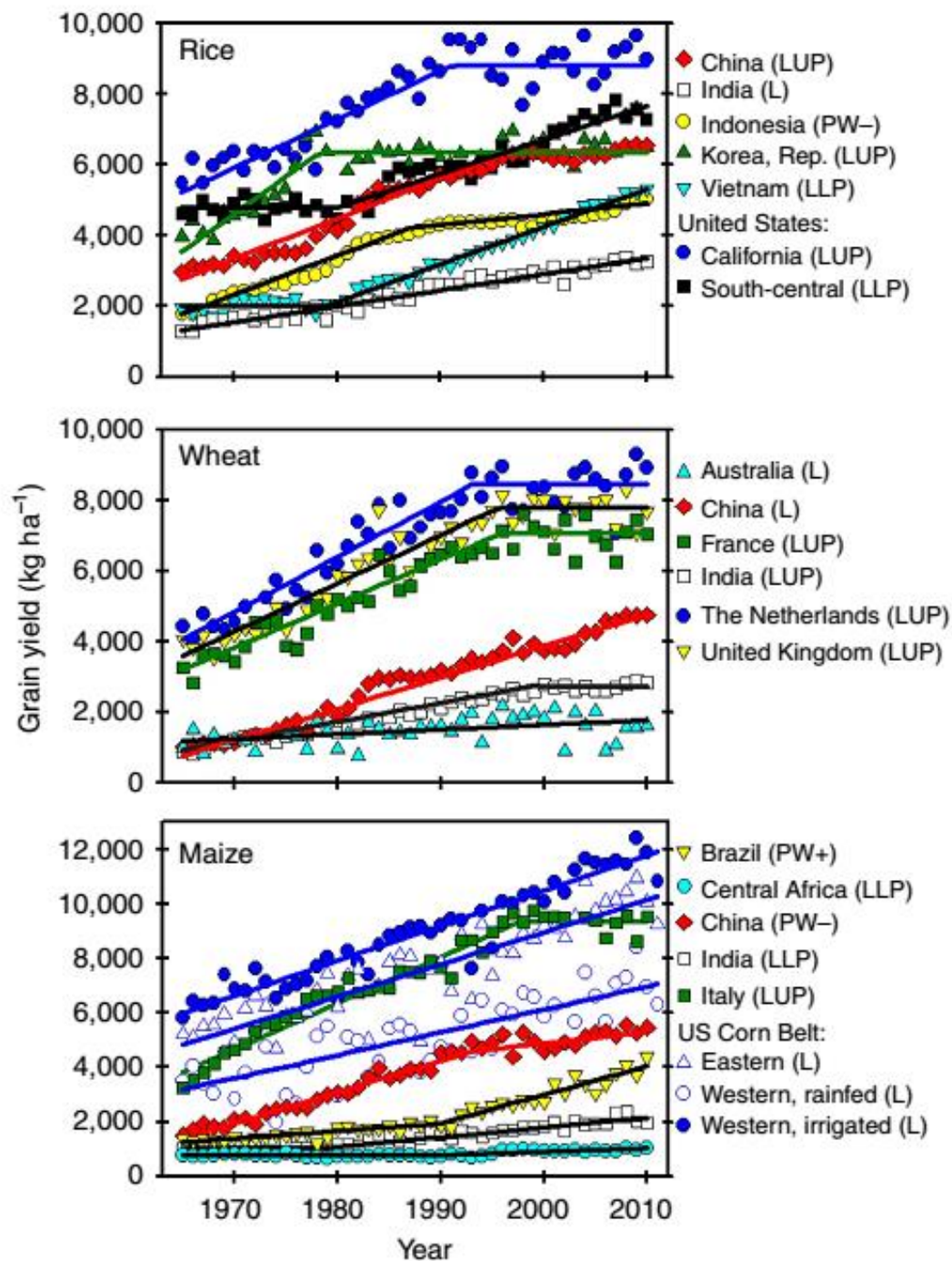
No caso do arroz a produtividade foi de 2 para 8T ha ano⁻¹, com variação no acúmulo de N de 25 para 200 kg ha⁻¹

Produção média de grãos e a retirada de N por algumas culturas

Cultura	Produção (MT ha⁻¹)	%N	N removido Grãos (Kg ha⁻¹)
Milho	10.0	2.6	260
Trigo	5.4	2.0	108
Arroz	7.9	1.8	142
Sorgo	9.0	3.0	270
Soja	2.8	6.3	176

(Adaptado de Robertson e Vitousek, 2009).

Soja	Produção	4 ton/ha
	Remove	250 Kg de N
	Deixa	7,7 ton resíduos com 70 Kg de N



**Tendências da produção de
grãos (cereais) desde o início
da revolução verde**

Recuperação do N aplicado pelas culturas é baixa:

➤ 50% a 30 %.

É um sistema ineficiente:

- pela baixa recuperação do N-fertilizante aplicado e
- pela possibilidade de contaminação dos cursos d'água.

Esta situação não é nova, os nossos livros-texto já apontam para esse problema (Fernandes, 2006), entretanto, continua-se a aplicar N-fertilizante em larga escala e, como observou Good (2004) a tendência é aumentar.

Good et al (2004) consideram a:

Eficiência de uso de N (NUE) como: **Produção de grãos ou massa seca por unidade de N na planta,**

que são o produto da

Eficiência de absorção (NupE) pela eficiência de Utilização (NUtE),

que são uma combinação da:

Eficiência de assimilação (NAE) e de Remobilização (NRE).

Definições e fórmulas usadas para descrever a eficiência de uso de nutrientes em plantas

Term	Formula	Definition	Comments
Nitrogen use efficiency	$NUE = Sw \div N$	Sw, shoot weight (DW); N, nitrogen content of shoots (DW)	Does not account for biomass increases
Usage index	$UI = Sw \times (Sw \div N)$	Sw, shoot weight; N, nitrogen in shoots	Takes into account absolute biomass increase
Nitrogen use efficiency (grain)	$NUE = Gw \div Ns$	Gw, grain weight; Ns, nitrogen supply (g per plant)	Reflects increased yield per unit applied nitrogen
Uptake efficiency	$UpE = Nt \div Ns$	Nt, total nitrogen in plant; Ns, nitrogen supply (g per plant)	Measures efficiency of uptake of nitrogen into plant
Utilization efficiency	$UtE = Gw \div Nt$	Gw, grain weight; Nt, total nitrogen in plant	Fraction of nitrogen converted to grain
Agronomic efficiency	$AE = (Gw_F - Gw_C) \div N_F$	N_F , nitrogen fertilizer applied; Gw_F , grain weight with fertilizer; Gw_C , grain weight of unfertilized control	Measures the efficiency of converting applied nitrogen to grain yield
Apparent nitrogen recovery	$AR = (N_F \text{ uptake} - N_C \text{ uptake}) \div N_F \times 100$	N_F uptake = plant nitrogen (fertilizer); N_C uptake = plant nitrogen (no fertilizer); N_F = Nitrogen fertilizer applied	Measures the efficiency of capture of nitrogen from soil
Physiological efficiency	$PE = (Gw_F - Gw_C) \div (N_F \text{ uptake} - N_C \text{ uptake})$	Gw_F , grain weight (fertilizer); Gw_C , grain weight (no fertilizer)	Measures the efficiency of capture of plant nitrogen in grain yield

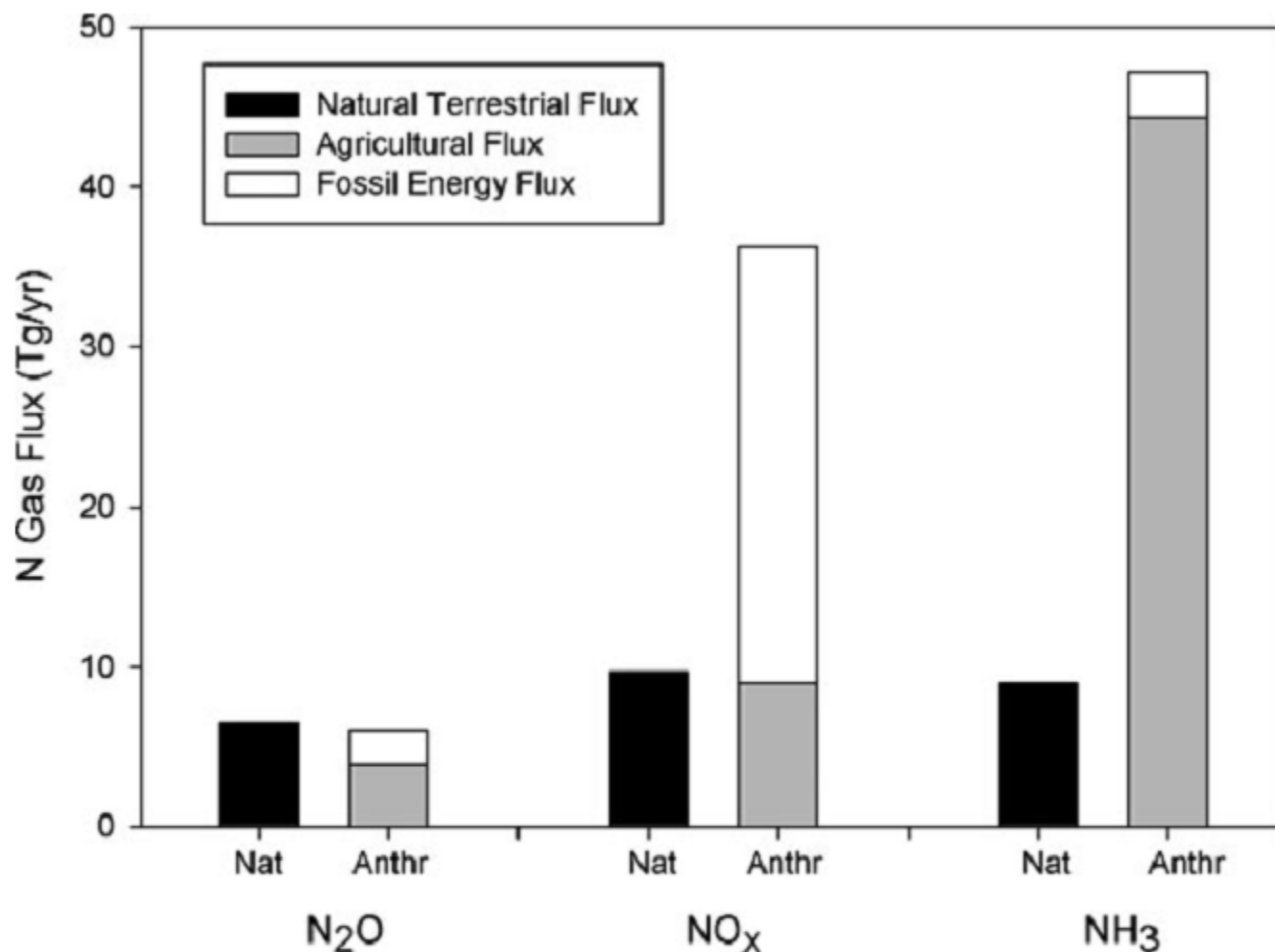
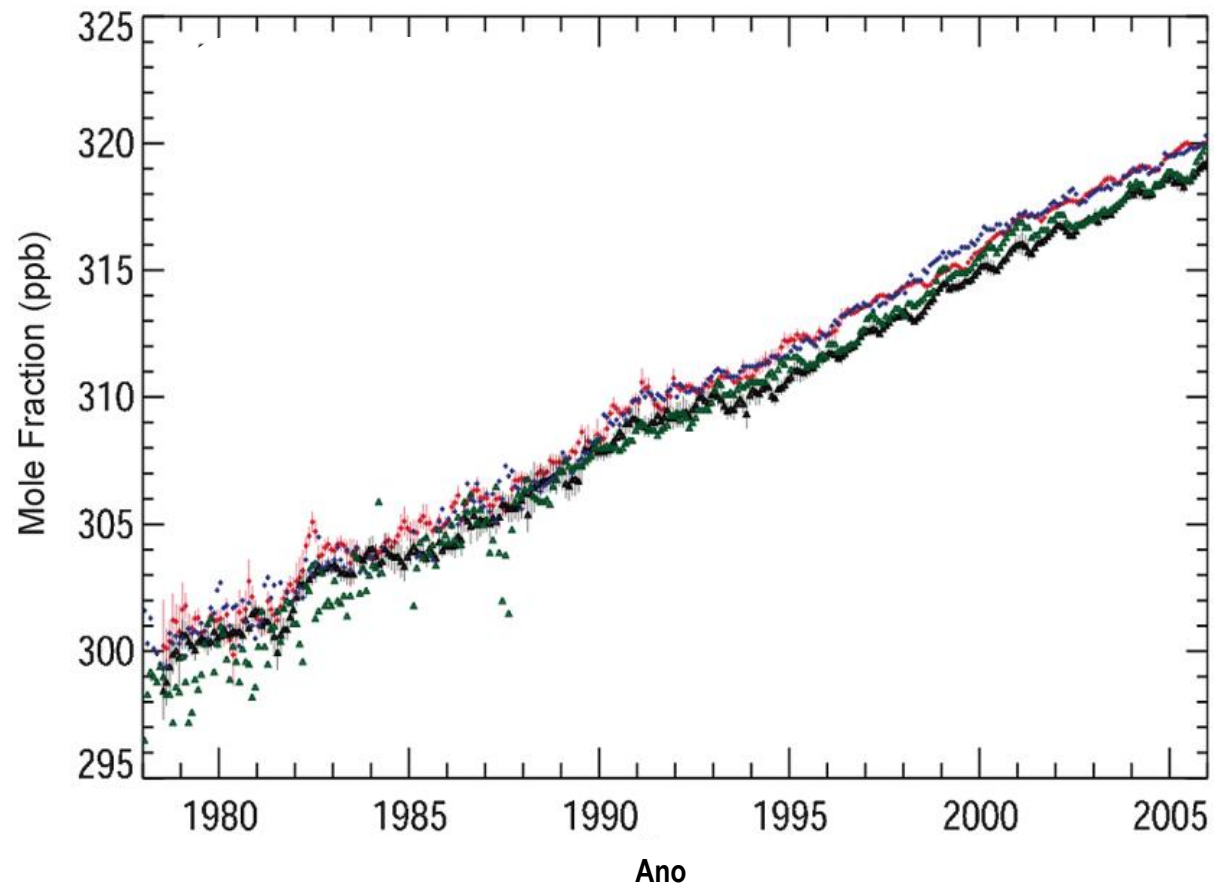


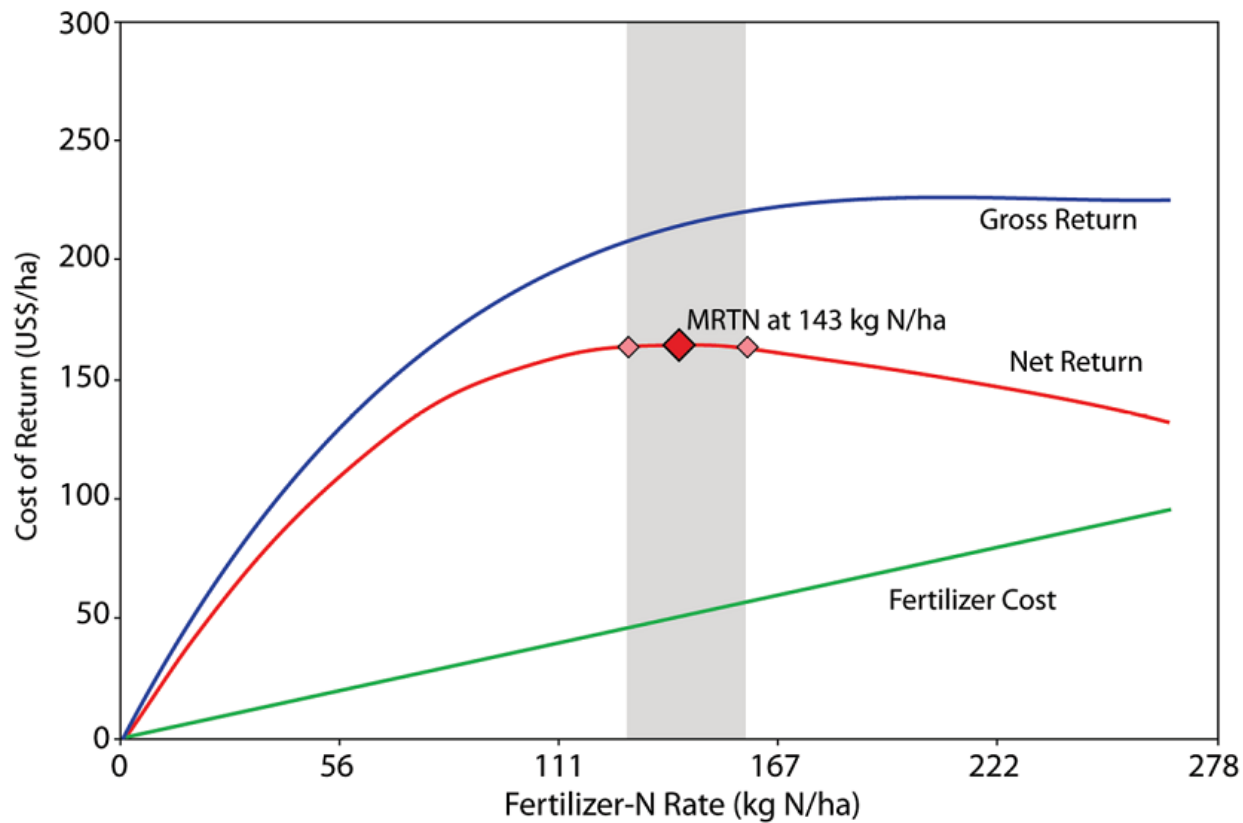
Figure 4

Natural (Nat) and anthropogenic (Anthr) sources of nitrogen (N)-containing trace gases from terrestrial ecosystems. Agriculture (broadly defined to include land clearing, agricultural burning, and animal operations) is responsible for most ammonia emitted to the atmosphere. Agriculture also produces about as much NO_x as all natural sources combined (though much less than fossil fuel sources), and it makes a substantial contribution to increasing concentrations of the greenhouse gas N₂O in the atmosphere. All fluxes as of the early 1990s, from Reference 13. Abbreviation: NH₃, ammonia.



Concentração de óxido nitroso (N₂O) na atmosfera, de 1980 a 2005
(ppb, partes por bilhão)

(adaptado de Robertson & Vitousek, 2009)



Retorno máximo de Nitrogênio (N) para cultivo de milho

(adaptado de Robertson & Vitousek, 2009)

O nitrogênio molecular:

- ligação curta (1,098 Å)
- potencial de ionização de 15,6 eV
- energia de dissociação de 224,5 Kcals

Os elétrons ficam em orbitais de baixa energia com um orbital S no centro da molécula. Nessas condições a reatividade química é muito baixa.

Segundo Chatt e Leigh (1968):

- Nenhum agente oxidante, nem mesmo fluoreto, é suficientemente forte para oxidar nitrogênio molecular em temperatura ambiente,
- E um agente redutor forte o suficiente para reduzir a molécula, em meio aquoso, reduziria a água preferencialmente. produzindo hidrogênio.

A produção de amônia pelo sistema Haber-Bosch consome 5% da produção mundial de gás. No total a produção de amônia usa 2% da energia mundial.

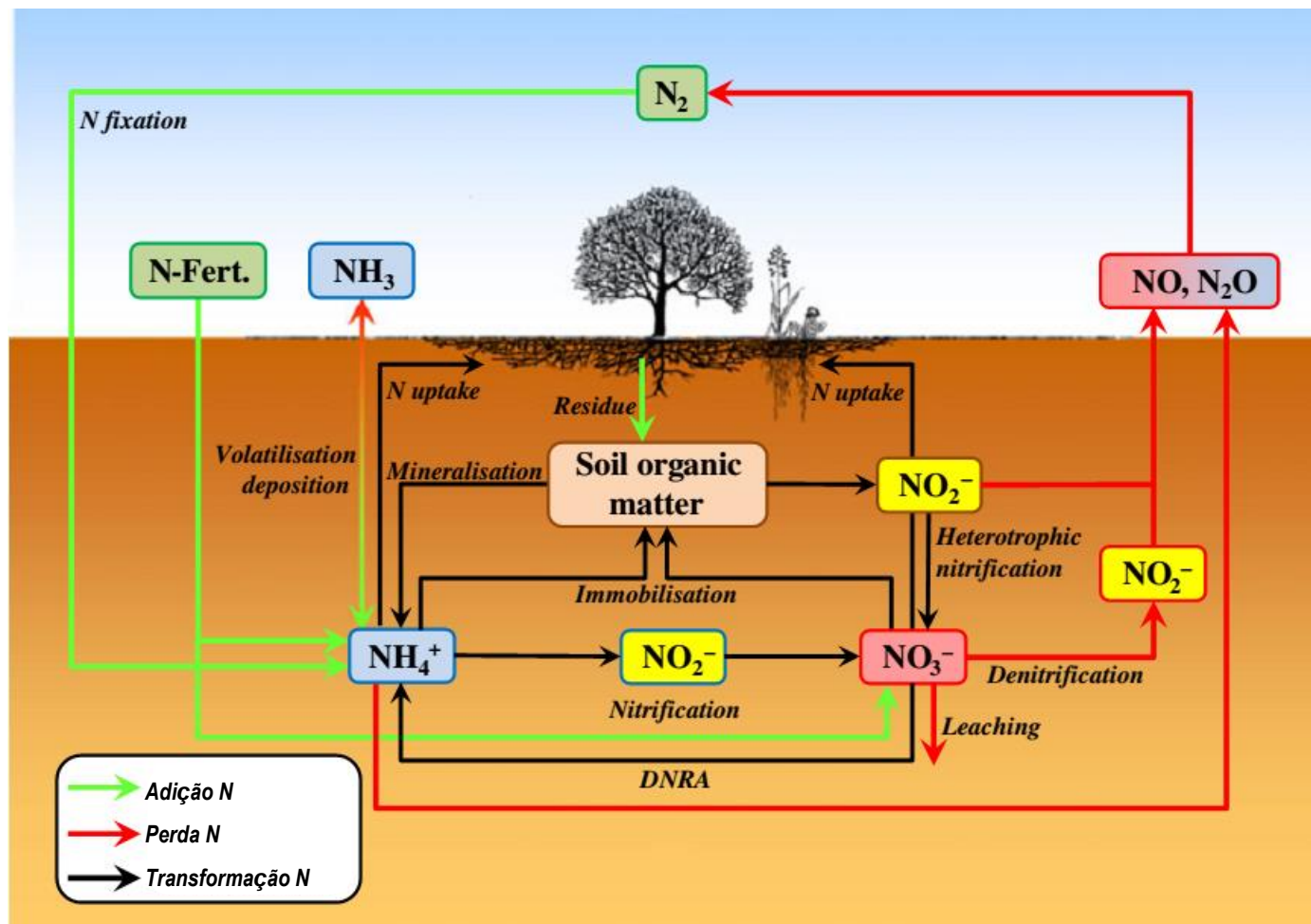
Uma tecnologia experimental, usando hidróxido de Sódio e hidróxido de Potássio fundidos; óxido de Ferro como catalisador e eletricidade, promete produzir amônia sem a produção simultânea de CO₂

Science, 2014

Principais formas de nitrogênio (N) no ambiente e seus estados de oxidação

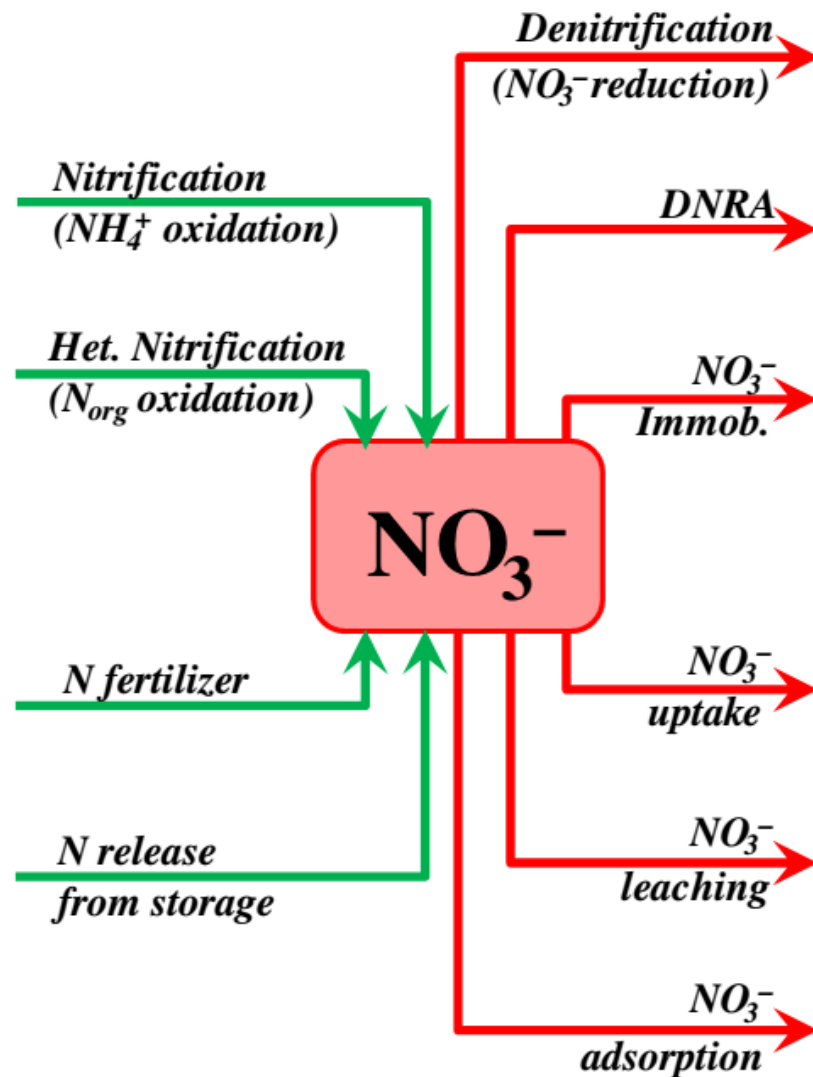
Nome	Espécie	Estado de Oxidação
N-orgânico	R_{NH3}	-3
Amônio	NH_4^+	-3
Amônia (g)	NH_3	-3
Dinitrogênio (g)	N_2	0
Óxido nitroso (g)	N_2O	+1
Óxido Nítrico (g)	NO	+2
Nitrito	NO_2^-	+3
Dióxido de Nitrogênio	NO_2	+4
Nitrato	NO_3^-	+5

(adaptado de Robertson & Vitousek, 2009)

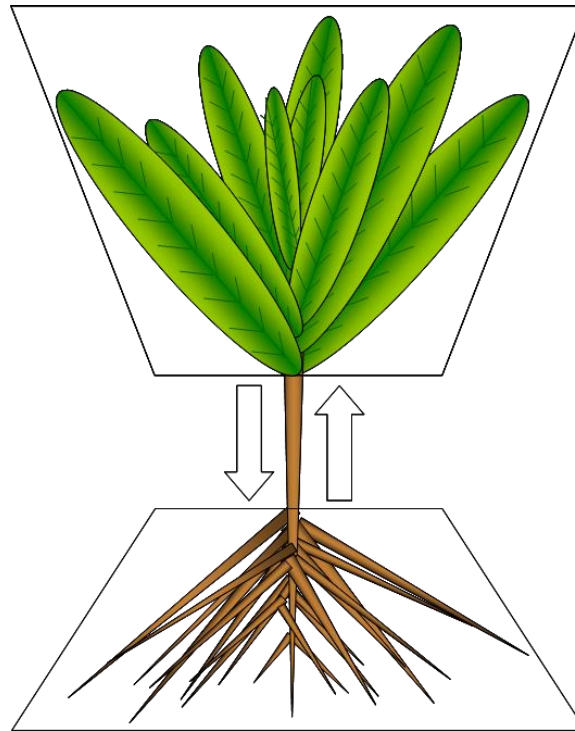


Ciclo do nitrogênio (N) com as principais adições (verde), perdas (vermelho) e transformações do N (preto)

(Adaptado de Muller e Clough, 2013)



Processos que afetam o tamanho dos “pools” de NO_3^- no solo (incluindo um componente hipotético)



As plantas superiores apresentam duas grandes superfícies que são como uma imagem especular uma da outra, e ligadas por um sistema de vasos condutores (xilema e floema) para comunicação entre elas.

(Fernandes e Souza, 2006)

Apenas **43% da radiação solar** fotossinteticamente ativa é aproveitada.

- Com uma intensidade média de **500 Cal. cm⁻² dia⁻¹** seria possível obter um acúmulo de **306,6 ton. ha⁻¹ ano.**

Produção Primária Líquida	
1) Florestas tropicais	2.160 g/m ² /ano
2) Florestas temperadas	1.300 g/m ² /ano
3) Pradarias tropicais	1.080 g/m ² /ano
4) Pradarias temperadas	500 g/m ² /ano
5) Savanas tropicais	890 g/m ² /ano
6) Cana	30.000 g/m ² /ano
7) Feijão	150 g/m ² /ano
Agricultura (cana = 300 t./ano)	

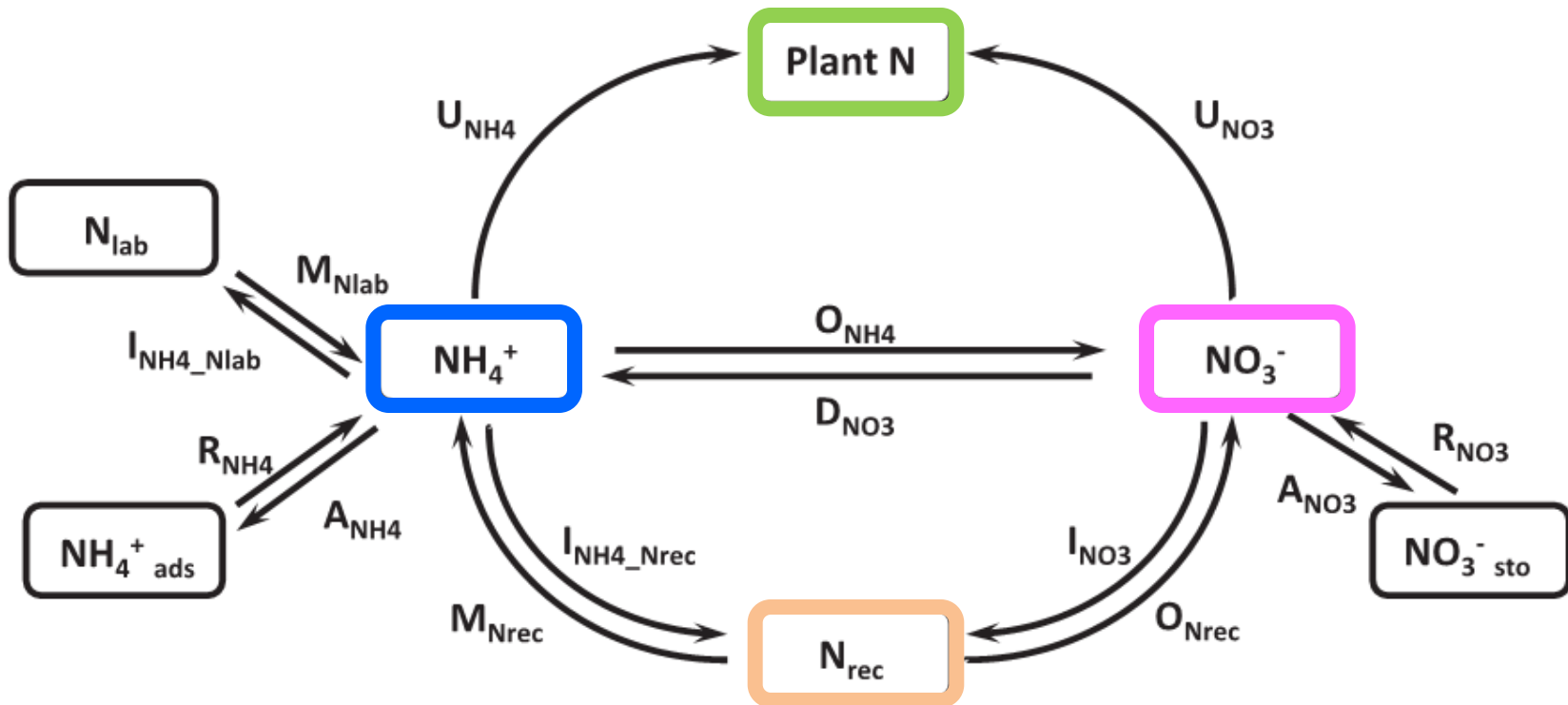
Para Boulding (1972) a aplicação fertilizantes:

é o uso de um *stock* não renovável de baixa entropia para captar uma determinada quantidade do fluxo externo de energia livre.

E é isto que dá a medida da eficiência da agricultura.

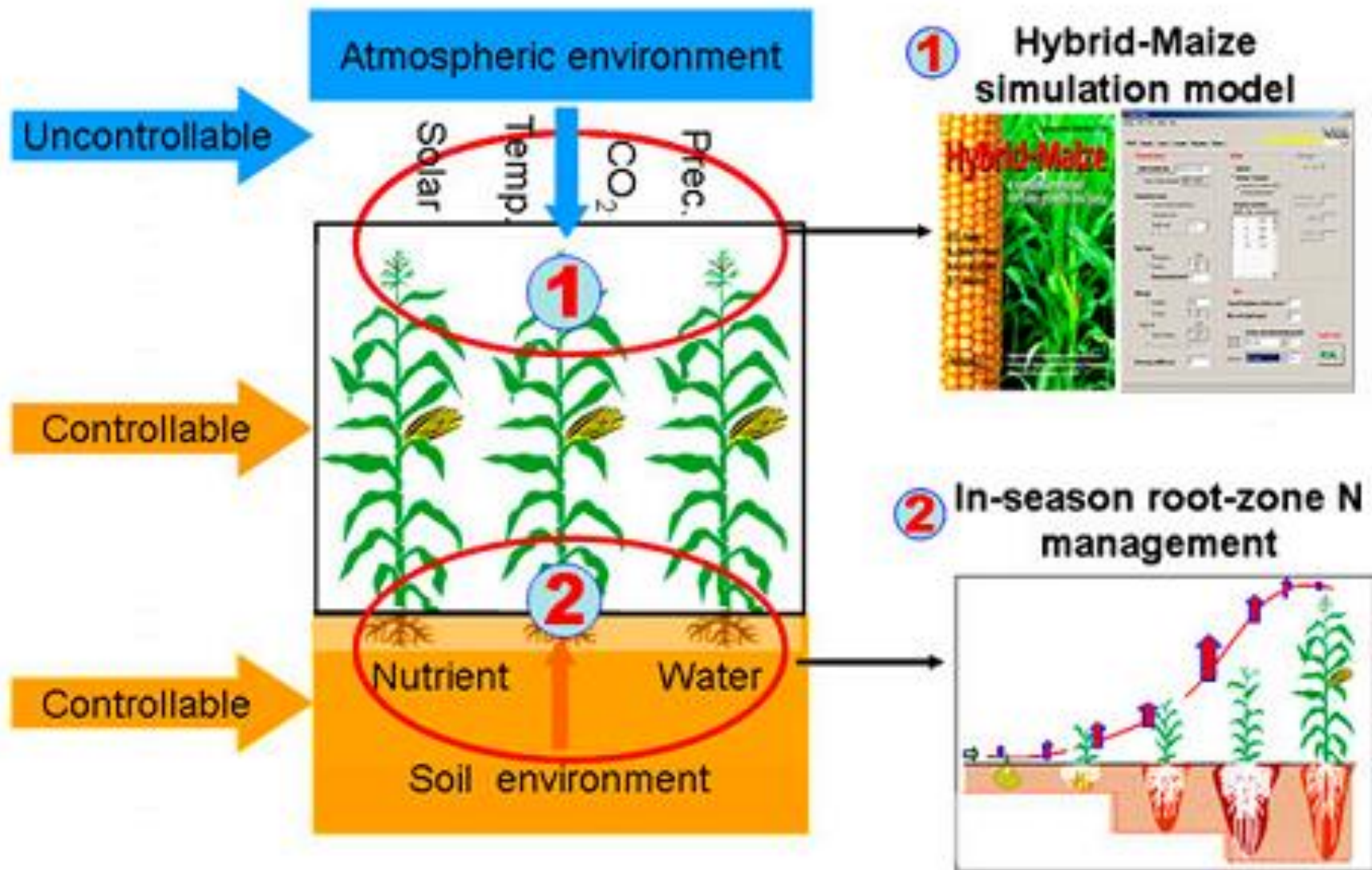
	Rendimento em (Kg/ha)	Rendimento em (Kcal 10 ⁶ / ha)	Energia Fóssil Usada (Kcal 10 ⁶ /ha)	Rendimento – Energia Usada (Kcal 10 ⁶ /ha)	Homens/Hora
Mandioca (México)	5.824	19,2	0,016	19,184	1,284
Couve de Bruxelas (USA)	12.320	5,5	8,492	-2,990	60

(Pimentel et al., 1975)



Modelo de “ ^{15}N tracing” para a análise das transformações de nitrogênio no solo

(Adaptado de Inselsbacher et al., 2013).



Modelo do sistema ISSM (manejo integrado de solo e planta)

Produção de grãos de milho, potencial de produção, balanço de N e N aplicado por unidade de grão produzido para diferentes sistemas de manejo:

ISSM (manejo integrado de solo e planta)

HY (agricultura de alto rendimento)

FP (método tradicional)

Variable	ISSM	HY	FP
Maize grain yield (t ha ⁻¹)	13.0 ± 1.6	15.2 ± 2.6	6.8 ± 1.6
Yield potential (t ha ⁻¹)	15.1 ± 1.9	16.8 ± 2.0	—
Yield potential (%)	86	91	—
N input from fertilizer and manure (kg ha ⁻¹)	237 ± 70	747 ± 179	257 ± 121
N removal in harvest (kg ha ⁻¹)	250 ± 31	292 ± 50	132 ± 31
Inputs minus harvest removals (kg ha ⁻¹)	-12 ± 56	457 ± 155	127 ± 42
Yield per unit fertilizer N applied (kg kg ⁻¹)	57 ± 13	21 ± 5	26 ± 20

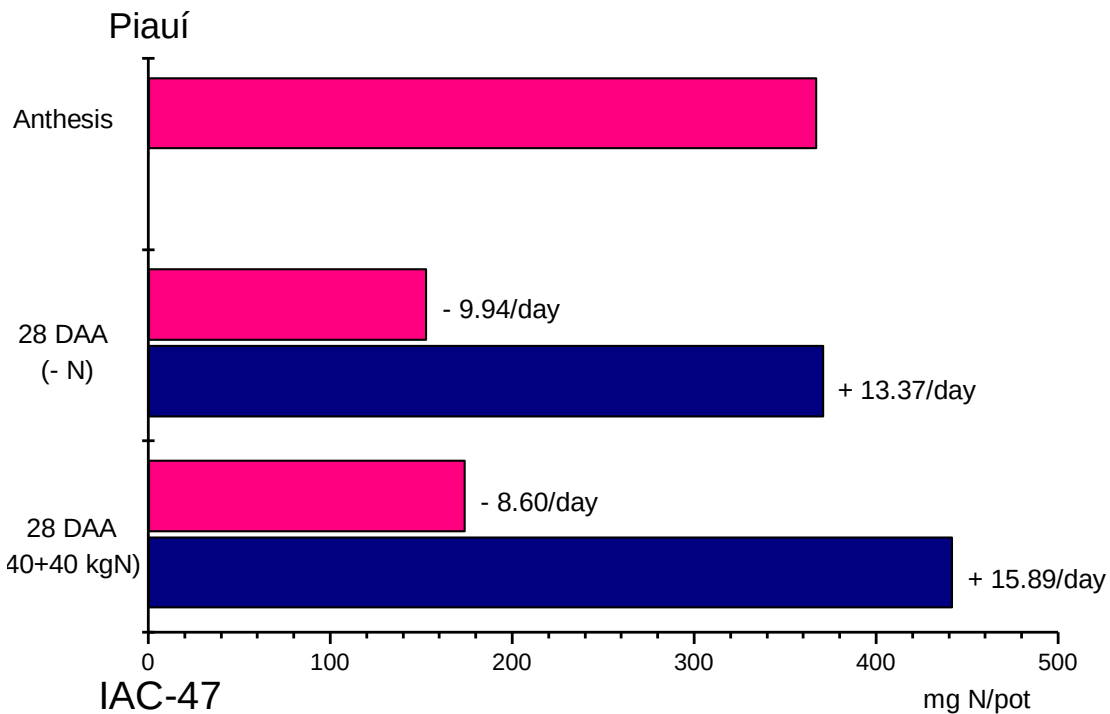
(Adaptado de Chen et al., 2011).

Estimativa da produção de grãos e parâmetros de uso de N para diferentes sistemas de cultivo de arroz (NUE: eficiência de uso de N)

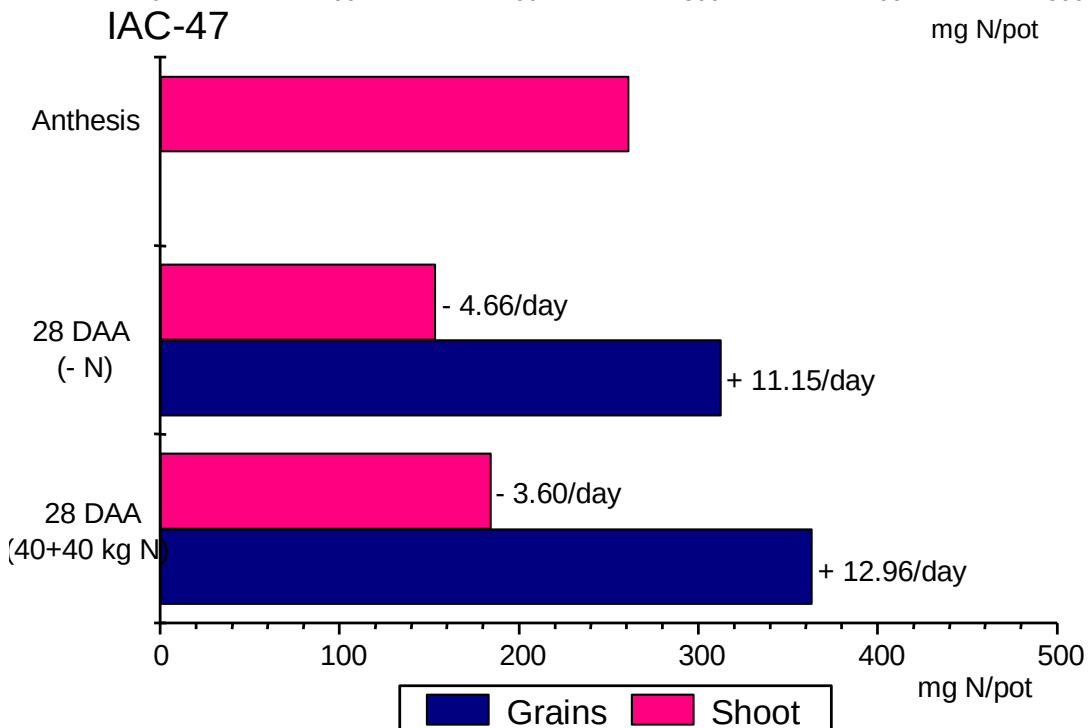
Parameters	Irrigated lowland rice ^a	Irrigated Rice – wheat systems ^b	Aerobic rice systems ^c	Rainfed rice systems ^d
1. Rice yield (kg. ha ⁻¹)	9–12.000	5–9.000	4–6.000	2–4.000
2. Grain N uptake (kg. ha ⁻¹)	100–150	60–100	50–85	30–60
3. Apparent N recovery (kg. kg ⁻¹)	0.30–0.40	0.25–0.40	0.30–0.50	0.40–0.60
4. Physiological NUE (kg. kg ⁻¹)	50–80	50–70	40–60	30–50
5. Agronomical NUE (kg. kg ⁻¹)	30–60	20–30	25–50	25–30
6. Crop N demand (kg. ha ⁻¹)	150–200	100–150	80–125	40–80
7. Recommended fertilizer N supply (kg. ha ⁻¹)	200–260	150–200	120–160	50–80

Plantas mais eficientes precisam ter a capacidade de:

- 1. Absorver o NO_3^- quando estiver disponível**
- 2. Armazenar o NO_3^- no vacúolo**
- 3. Remobilizar o NO_3^- do vacúolo**

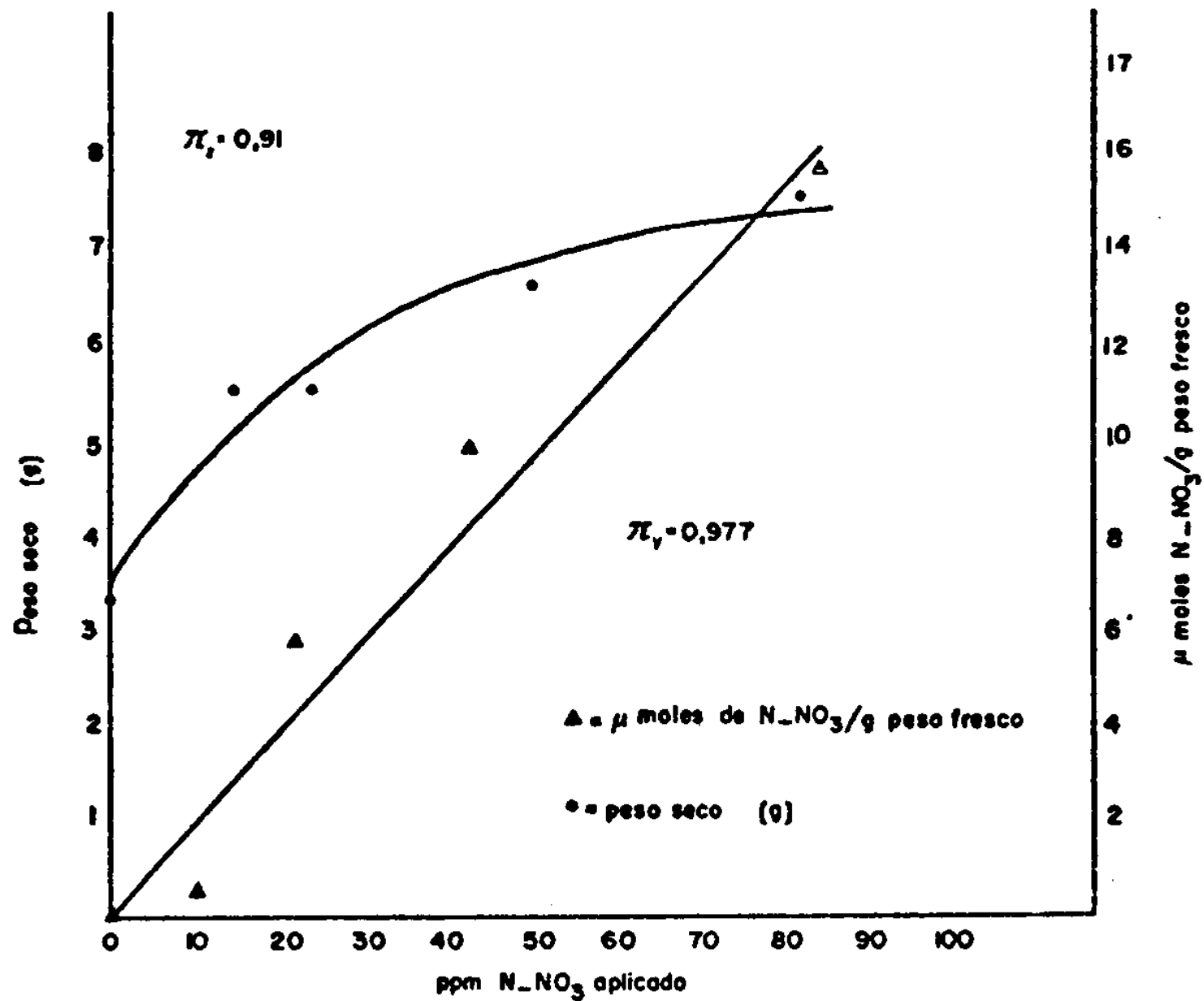


**Nitrogen in grains and shoot
between anthesis and 28 days after
anthesis (DAA).**



(with or without application of
supplemental nitrogen)

And daily rate of nitrogen gain or loss
during the period (mg N per day per pot)



Acúmulo de Nitrato em Arroz

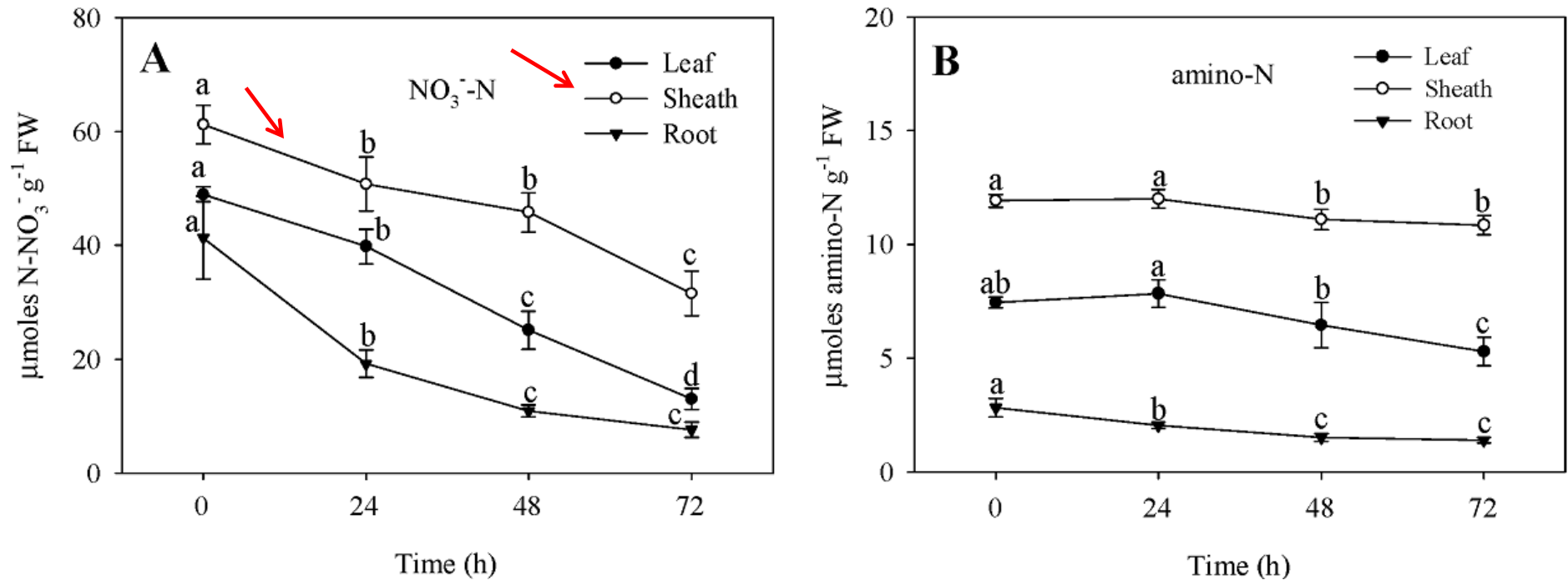


Figura. Teores de N-NO_3^- e N-amino em folhas, bainhas e raízes de plantas de arroz (Piauí) após a remoção do N da solução por 72h.

Santos LA et al. (2009)

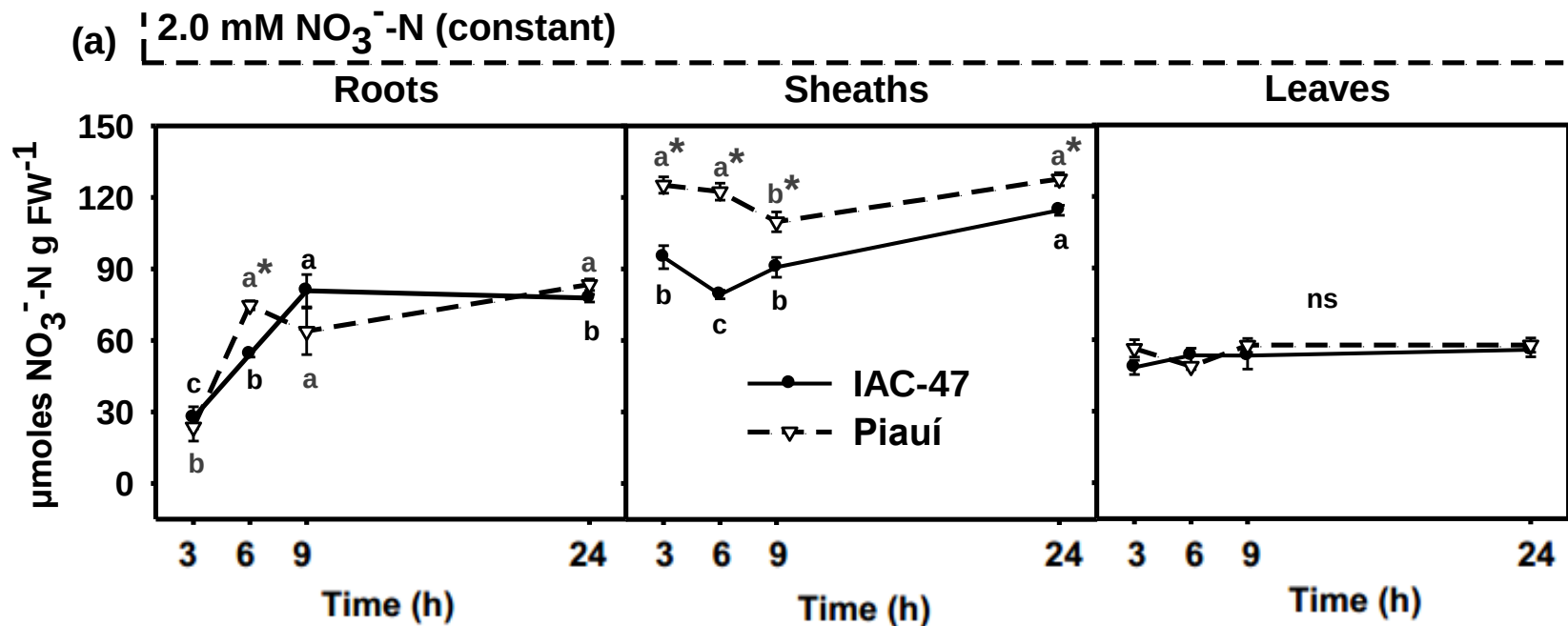


Figura. Teores de N-NO₃⁻ em folhas, bainhas e raízes de arroz (variedades IAC-47 e Piauí) sob suprimento constante com 2mM de N-NO₃⁻.

Teores de N-NO₃⁻ em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2mM de NO₃⁻ na solução nutritiva ou sob depleção de NO₃⁻ durante 72h.

<i>N-NO₃⁻ (μmoles de NO₃⁻.g⁻¹ de massa fresca)</i>						
FOLHA		RAIZ		BAINHA		
Coletas	0mM NO ₃ ⁻	2mM NO ₃ ⁻	0mM NO ₃ ⁻	2mM NO ₃ ⁻	0mM NO ₃ ⁻	2mM NO ₃ ⁻
0 h	8,78 Ab*	23,73 Aa	15,54 Ab	21,50 Ba	24,13 Ab	31,78 Ba
24 h	7,36 Ab	20,14 Aa	9,93 Ab	23,93 Ba	16,22 Bb	30,63 Ba
48 h	3,10 Bb	14,19 Ba	1,68 Bb	22,17 Ba	9,39 Cb	35,97 Ba
72 h	2,69 Bb	13,24 Ba	0,23 Bb	29,61 Aa	3,77 Cb	44,97 Aa
CV (%)	31,47		24,98		16,57	

* Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott Knott 5%.

Acúmulo de N-NO_3^- em dois genótipos contrastantes de arroz

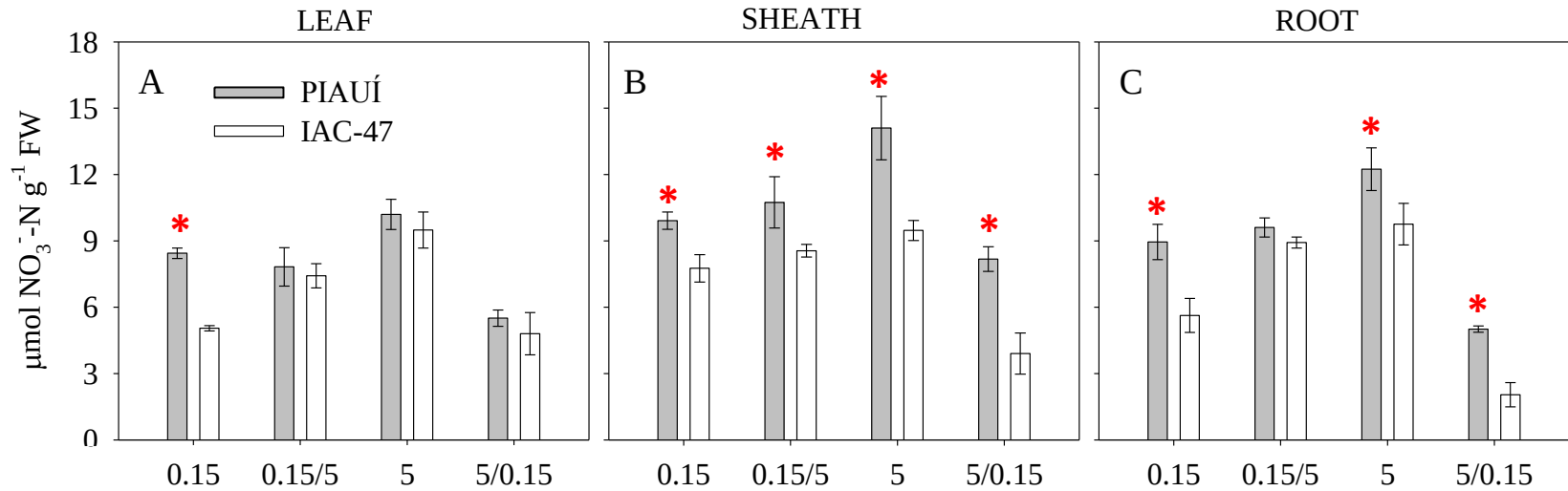
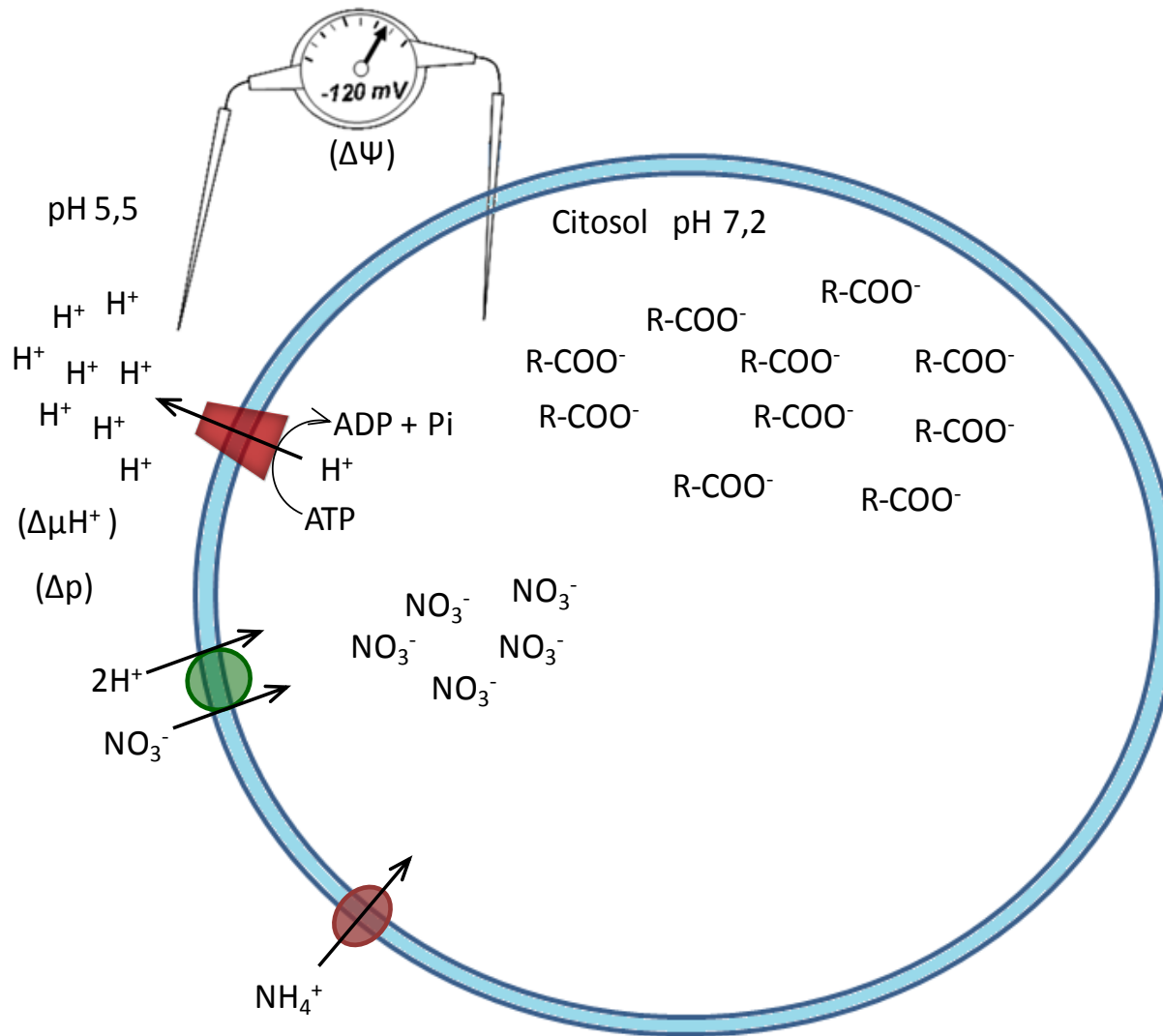
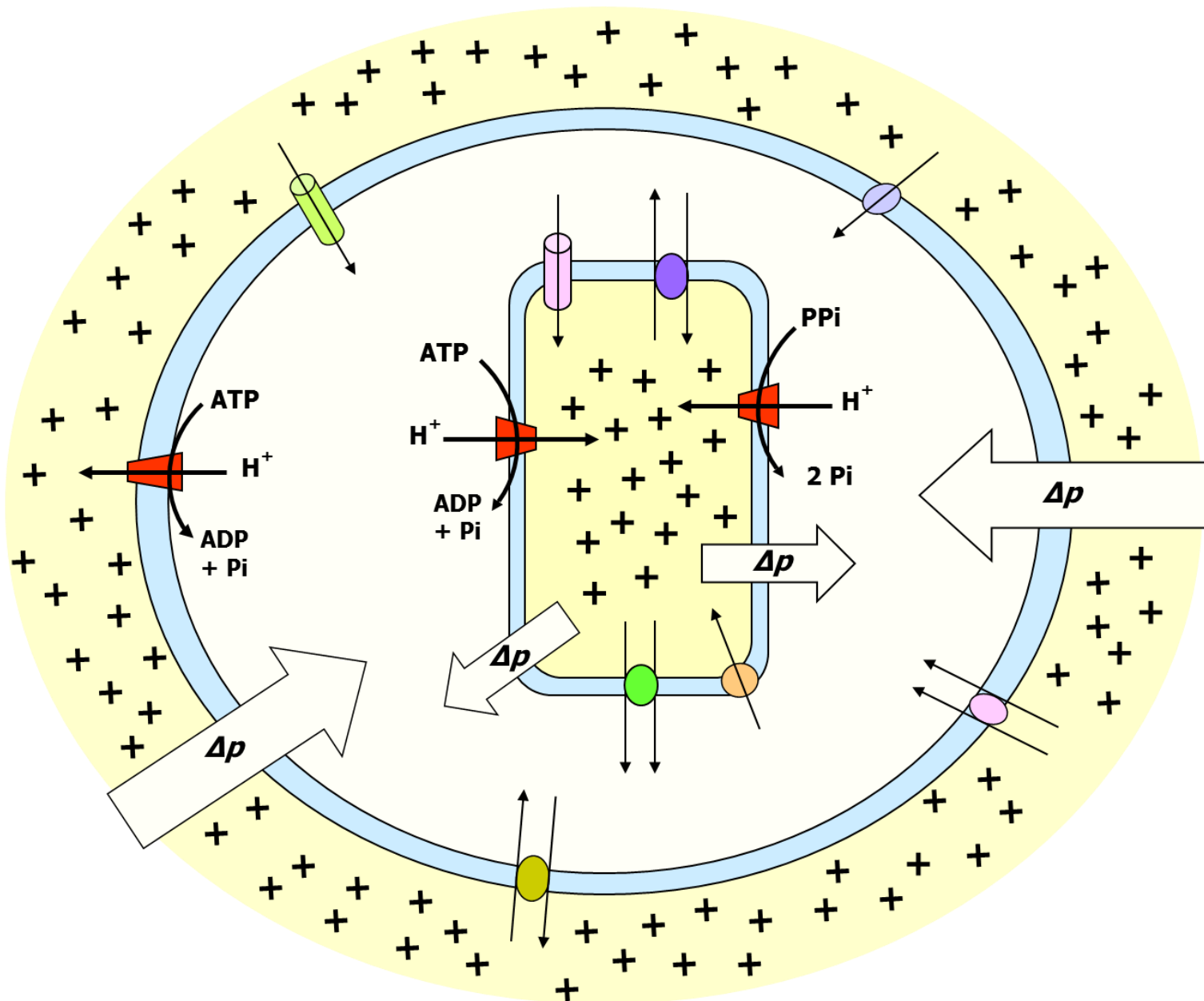
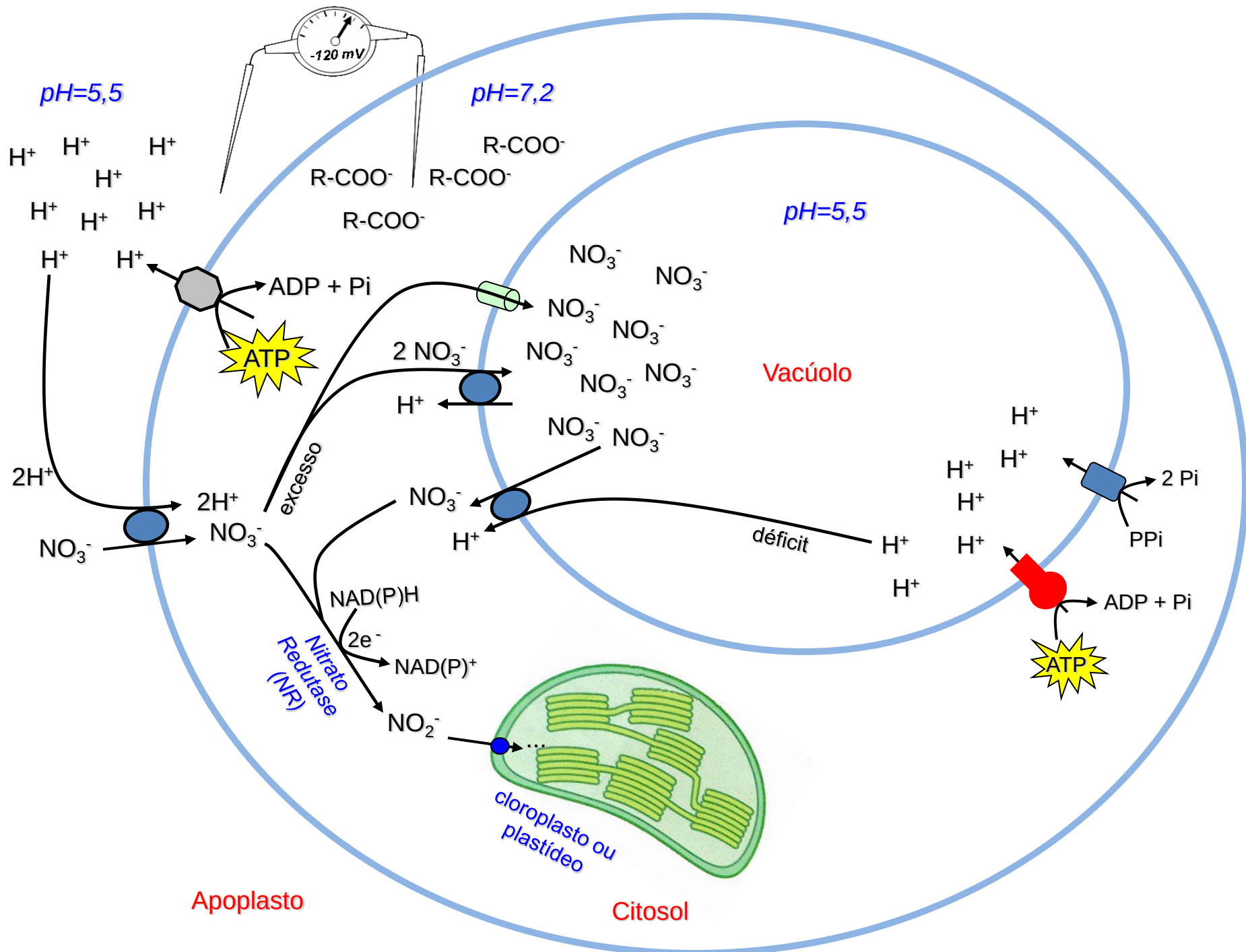


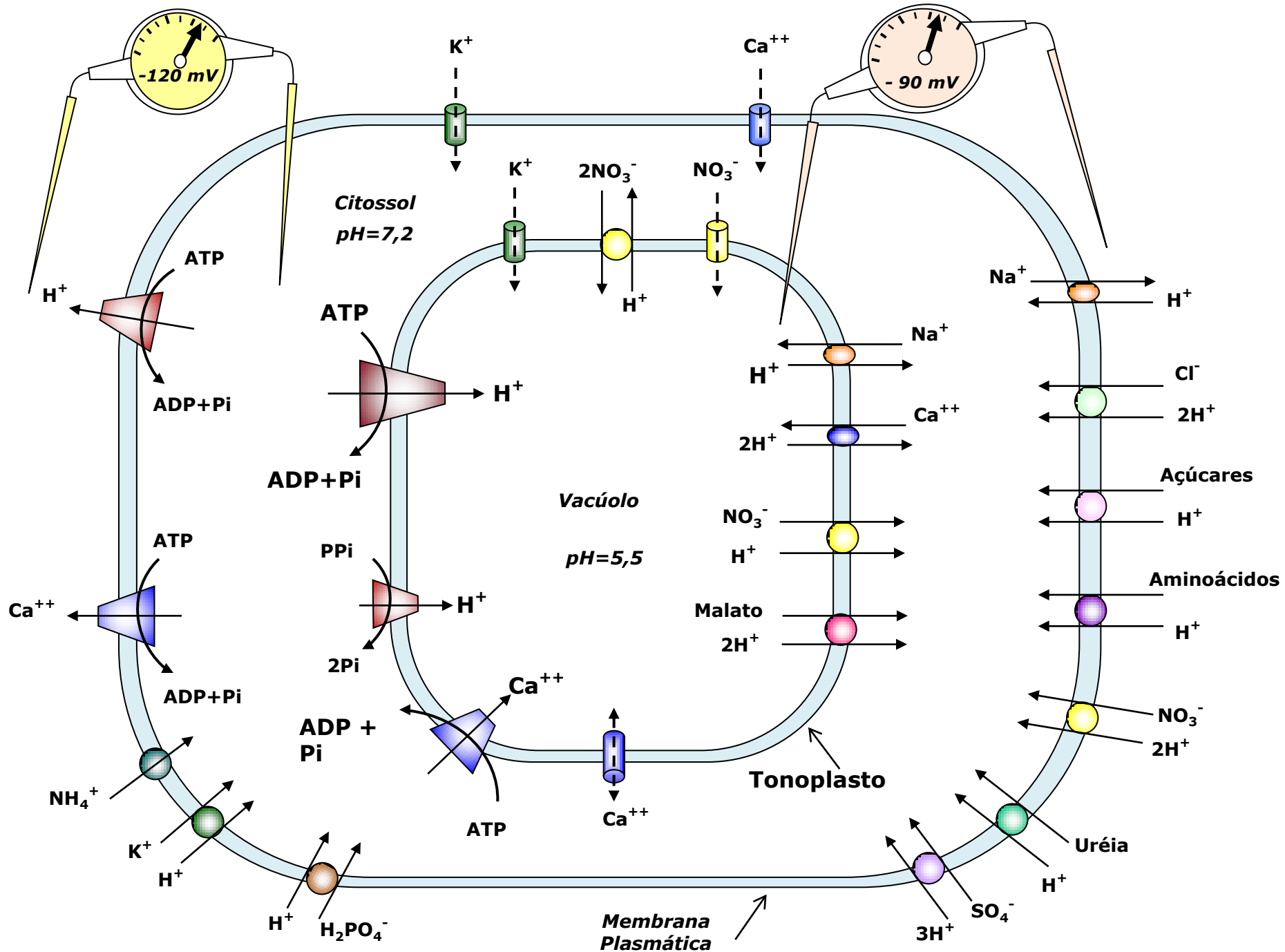
Figure 4: N-NO_3^- (A-C) content in leaves, sheaths and roots from the PiauÍ and IAC-47 varieties, cultivated in 0.15 and 5.0 mM N-NO_3^- and after their transfer from 0.15 to 5.0 mM N-NO_3^- solutions (0.15/5) and from 5 to 0.15 mM N-NO_3^- solutions, for 2 and 24 h, respectively





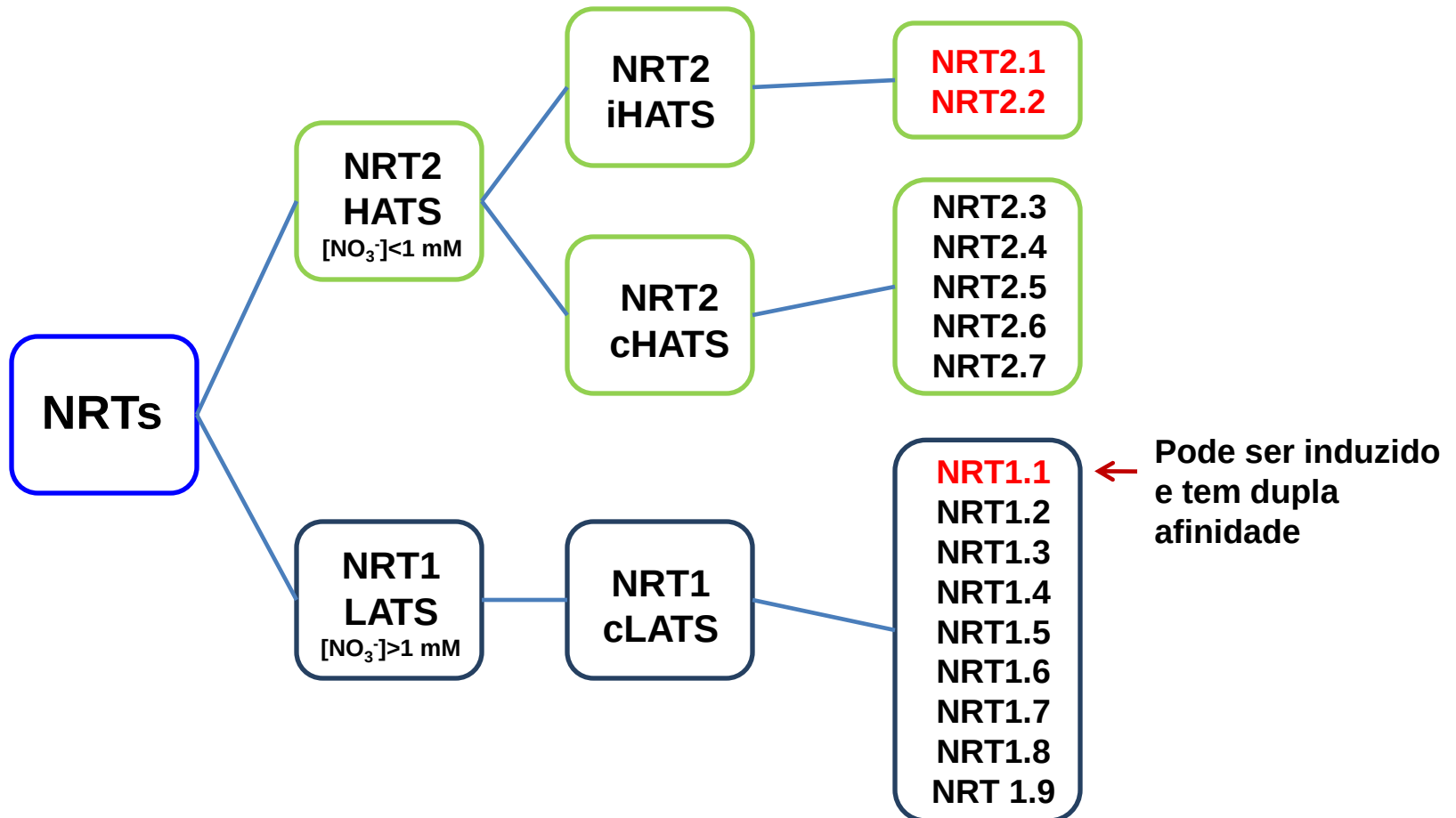
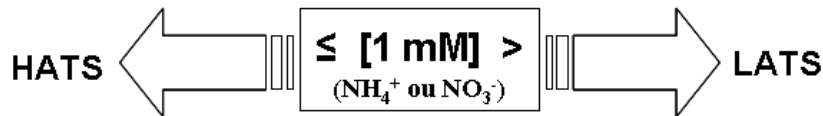
Geração de força prótonmotriz entre o apoplasma e citossol e lumen do vacúolo e citossol



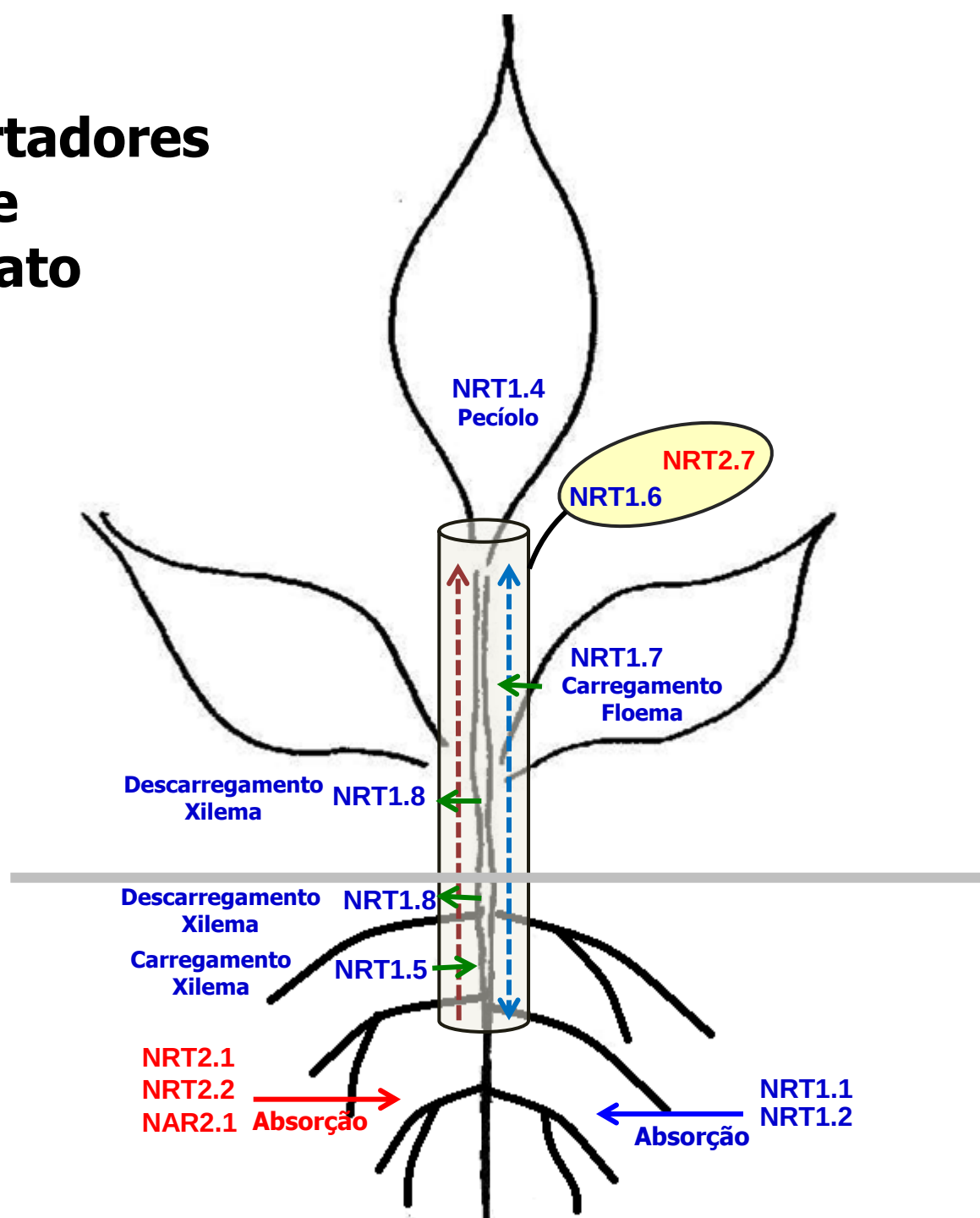


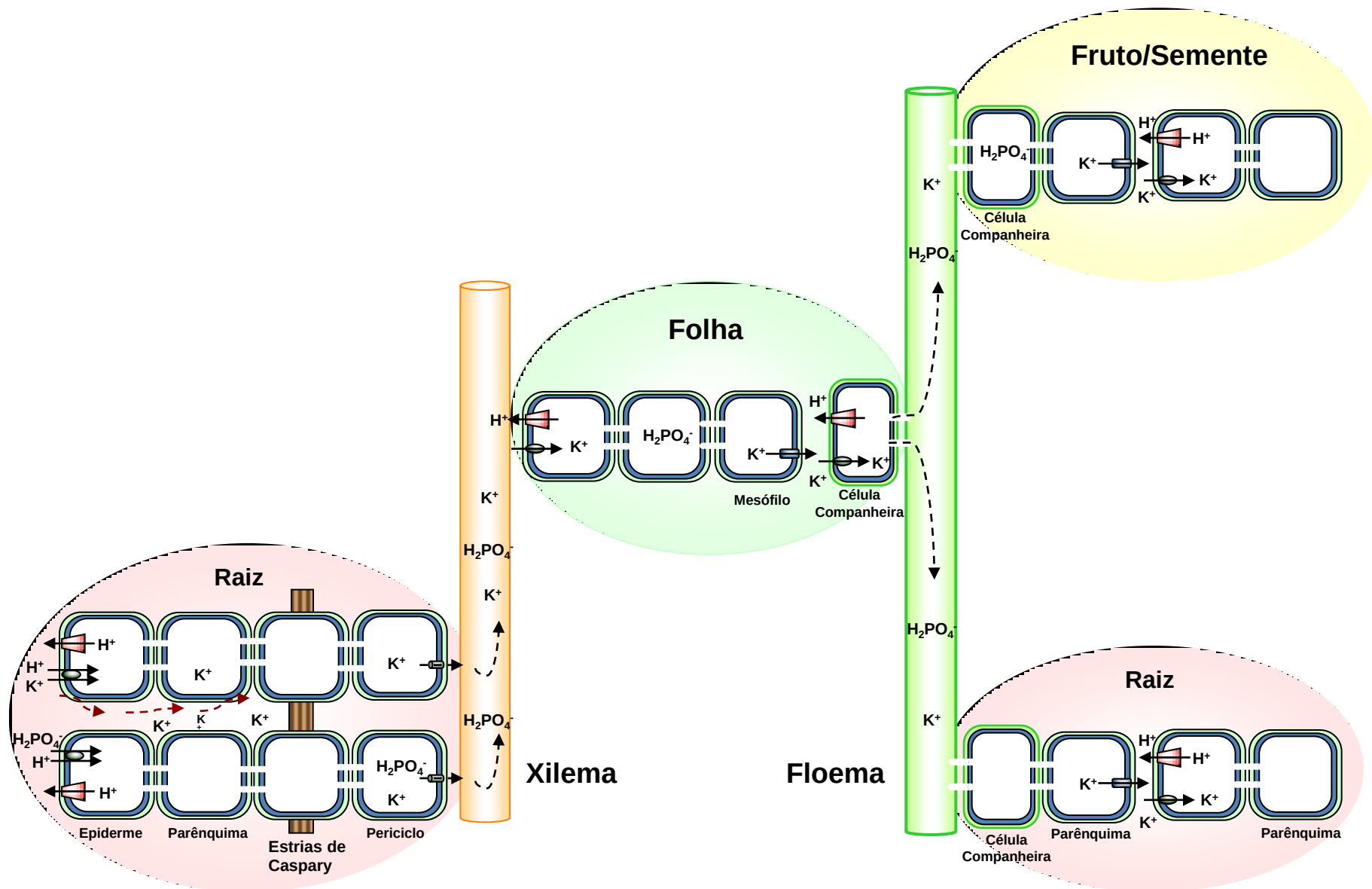
Transportadores de NO_3^- (NRT)

- ❖ Alta afinidade (*HATS*): constitutivos e induzíveis
- ❖ Baixa afinidade (*LATS*): constitutivos

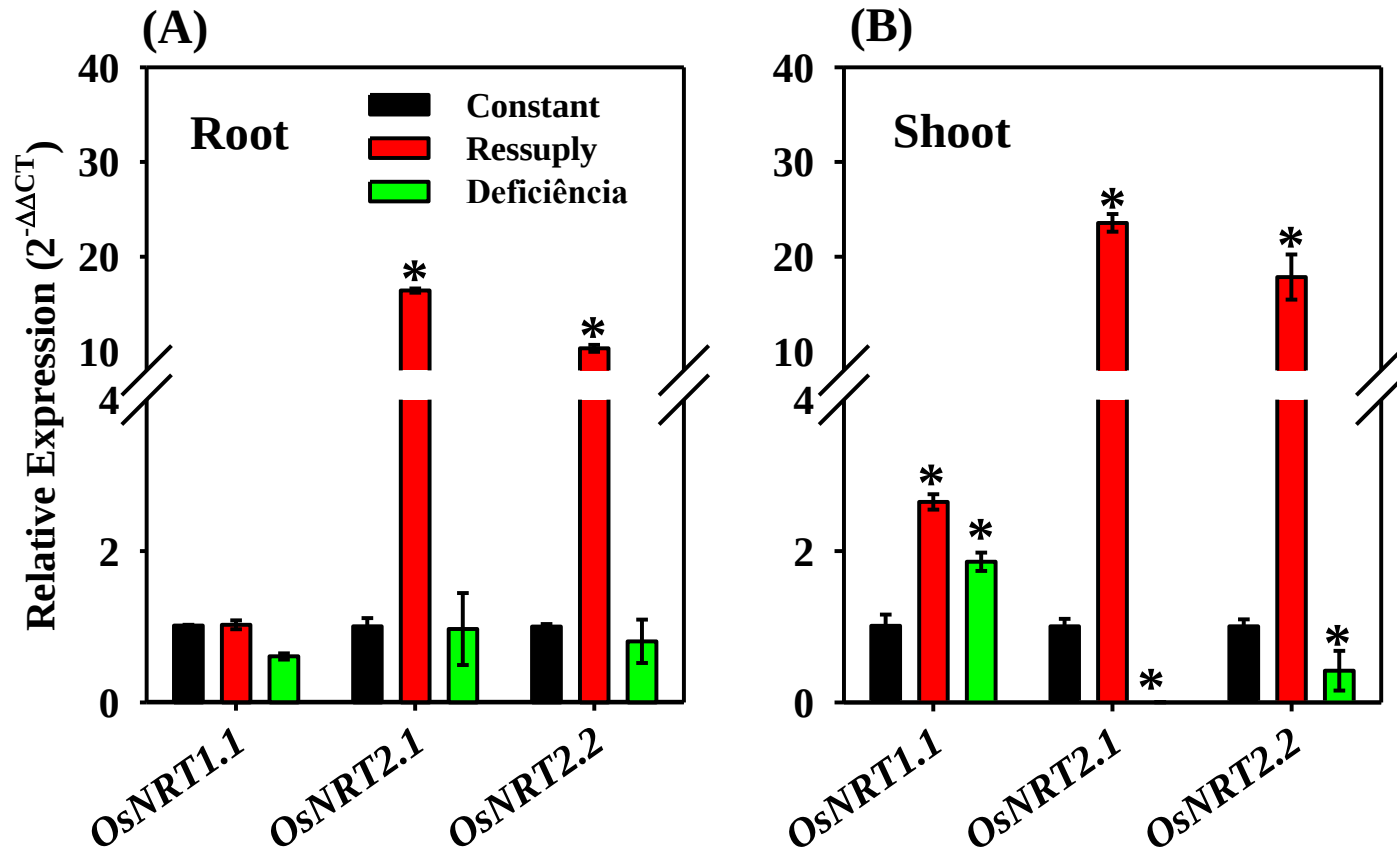


Transportadores de Nitrato





NO₃⁻-N Experiment



Relative gene expression of transporters of NO₃⁻
(*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* and *OsNRT2.2*) in rice (Nipponbare)

Expressão de PM-H⁺-ATPases em resposta à nutrição níttrica

NO₃⁻-N Experiment

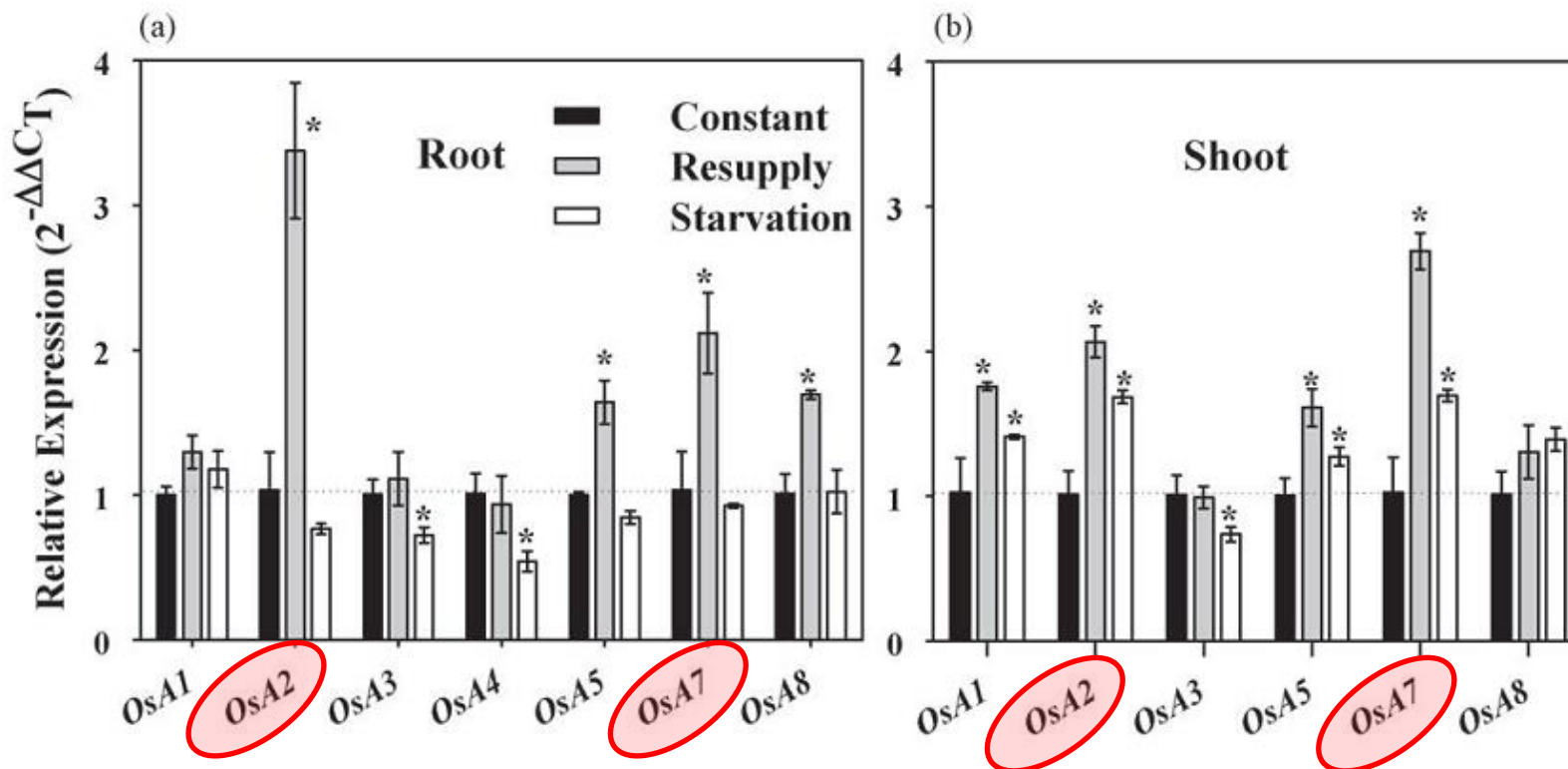
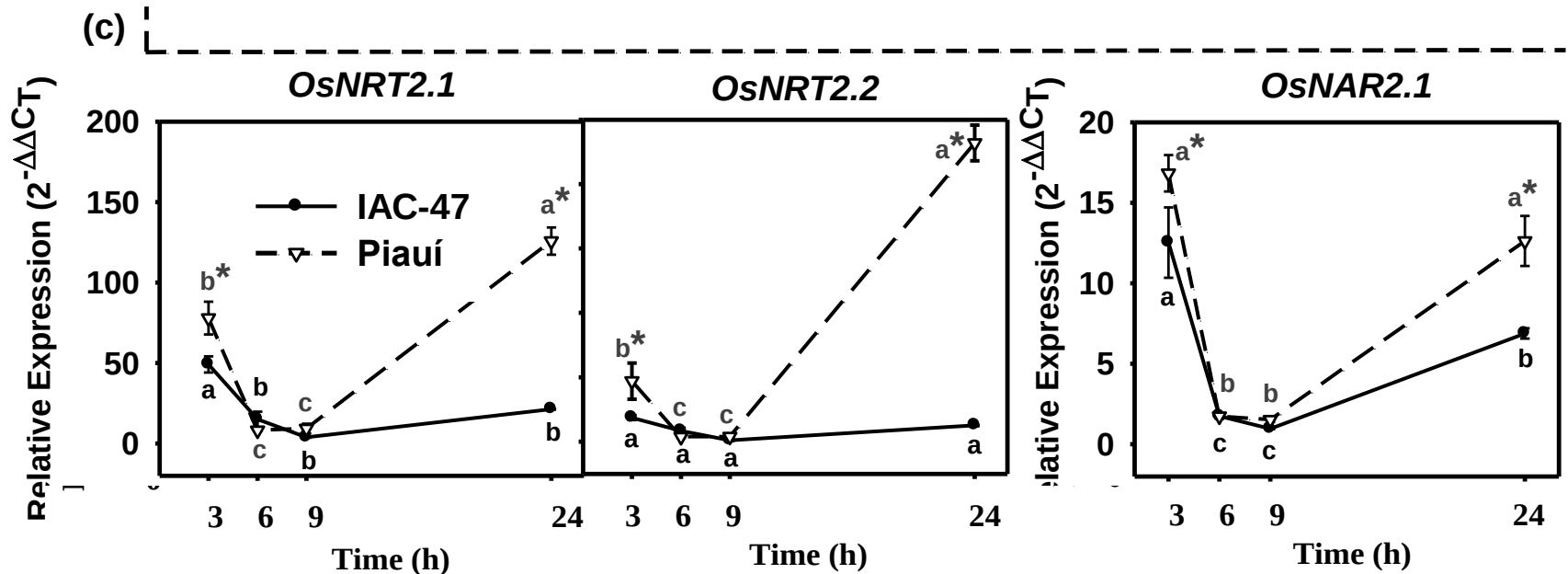


Figura. Expressão relativa de diferentes isoformas de PM-H⁺-ATPases em raiz e parte aérea de arroz (Nipponbare) em resposta ao suprimento constante com nitrato (2 mM), deficiência (72h) e ressuprimento (2 mM).

Expressão de Transportadores de Nitrato entre Variedades de arroz Contrastantes Quanto a Eficiência de Absorção de NO_3^-



Sperandio et al. (2014)

TABLE 1 Kinetic parameters $V_{\max}$ and K_M of Piauí and IAC-47 rice varieties, under two nitrate levels (0.2 and 2 mM) in the nutrient solution

Parameter	Nitrate level			
	0.2 mM		2 mM	
	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47
$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{h}$)	58.07 a	47.20 b	107,07 a	109.67 a
K_M ($\mu\text{mol/L}$)	12.95 a	27.46 b	1199,28 a	849,00 b

The values are means of four repetitions. Means followed by the same letter do not differ significantly by the F test ($P > 0.05$).

Santos et al. (2011)

Expressão de PM-H⁺-ATPases (OsA2 e OsA7) em variedades contrastantes de arroz após ressuprimento com baixa dose de N-NO₃⁻

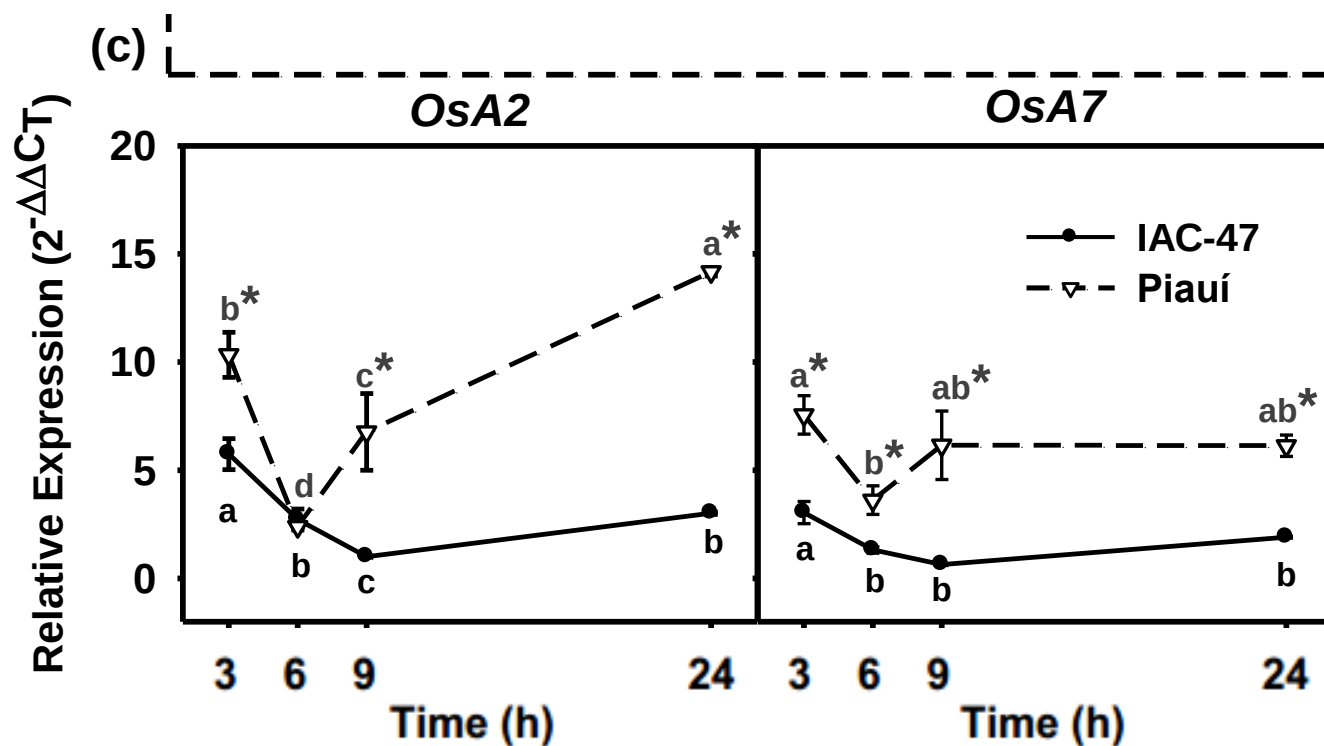


Figura. Expressão relativa de PM-H⁺-ATPases em raízes de variedades contrastantes de arroz (Piauí e IAC-47) após ressuprimento com baixa dose de N-NO₃⁻.

Nos solos tropicais, geralmente bem estruturados, e quando sem limitações químicas extremas:

- **os teores de nitrato** são em geral maiores do que os de amônio, oscilando em torno de **5 a 20 ppm (0,35 a 1,4 mmol L⁻¹)**,
- **os teores de amônio** variam entre **2 e 10 ppm (0,15-0,7 mmol L⁻¹)**.

Esses limites variam em áreas sob algumas gramíneas e sofrem variações periódicas (flush) em regiões tropicais com alternância marcada entre estações secas ou com excesso de chuvas.

Nestes casos podem ocorrer fluxos estacionais de nitrato variando de quase **zero a 200 ppm (14,3 mmol L⁻¹)** em períodos curtos de tempo, e voltando a decrescer à medida que o volume de precipitações aumenta.

Como mencionado acima, sob algumas gramíneas os valores se invertem, com os teores de **N-NH₄⁺ chegando a 20 ppm (1,4 mmol L⁻¹)** enquanto os de **N-NO₃⁻ giram em torno de 5 ppm (0,35 mmol L⁻¹)**.

Aminoácidos na solução do solo variam **de 0 a 150 uM**

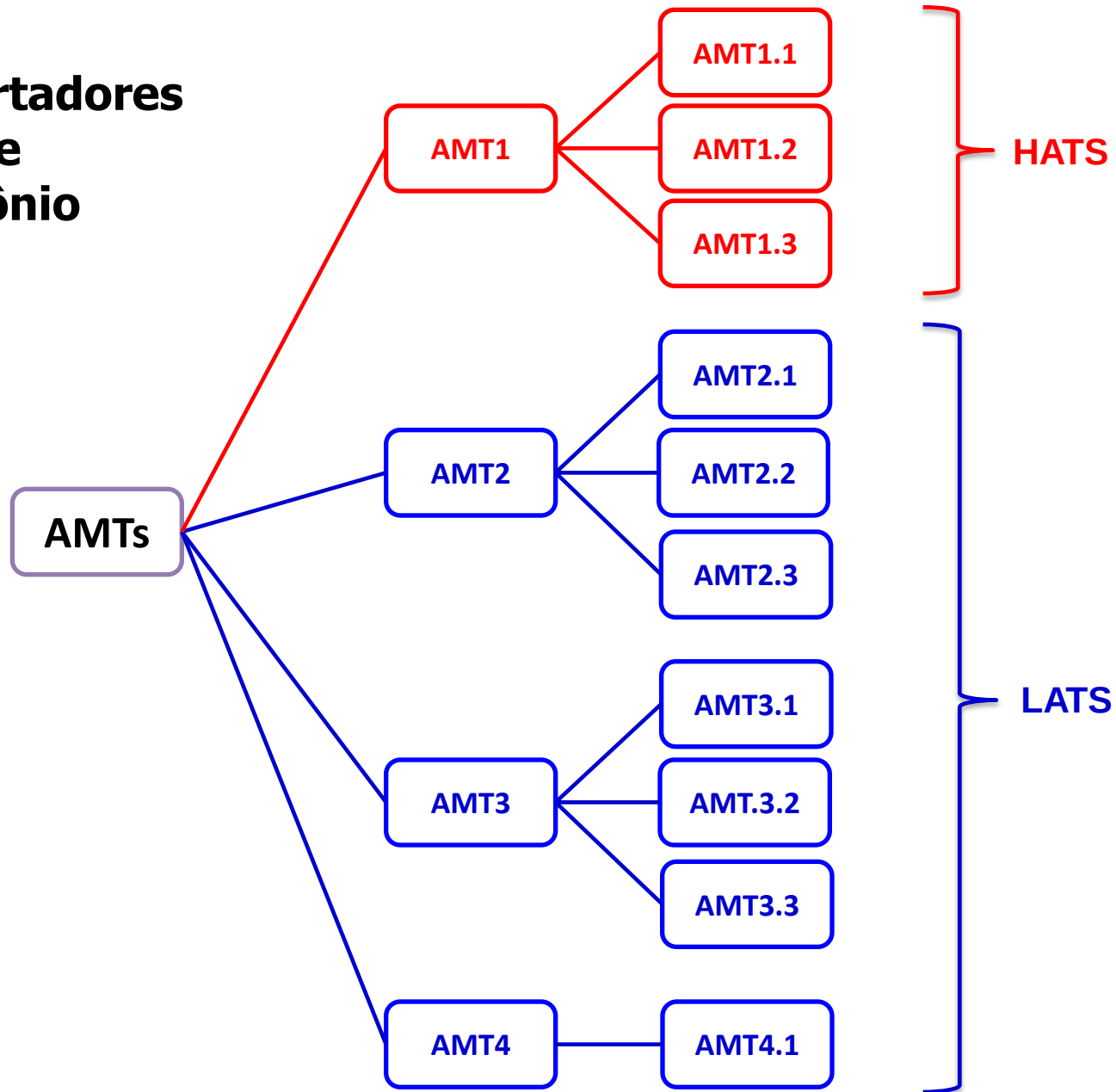
TABELA 6. Teores de N-nítrico (NO_3^-), em $\mu\text{moles/g}$ peso fresco da planta, durante o crescimento da alface, em resposta à adubação nitrogenada sem (SNS), e com (CNS) e inibidor de nitrificação.

Dias	Teste- munha	Uréia	Sulfato de amônio	Nitro- cálcio	Estercos de galinha	Efluente de biodigestor	Teste- munha	Uréia	Sulfato de amônio	Nitro- cálcio	Estercos de galinha	Efluente de biodigestor
SNS						CNS						
43	27,18	28,36	23,06	30,31	33,56	27,75	14,43	15,12	11,56	20,93	17,62	17,43
65	7,97	16,21	10,18	13,84	25,17	5,60	9,31	9,08	10,05	11,94	10,53	7,23
74	4,91	12,06	10,33	7,75	21,66	4,62	3,58	7,00	1,76	24,57	16,08	4,81
17,25						11,84						

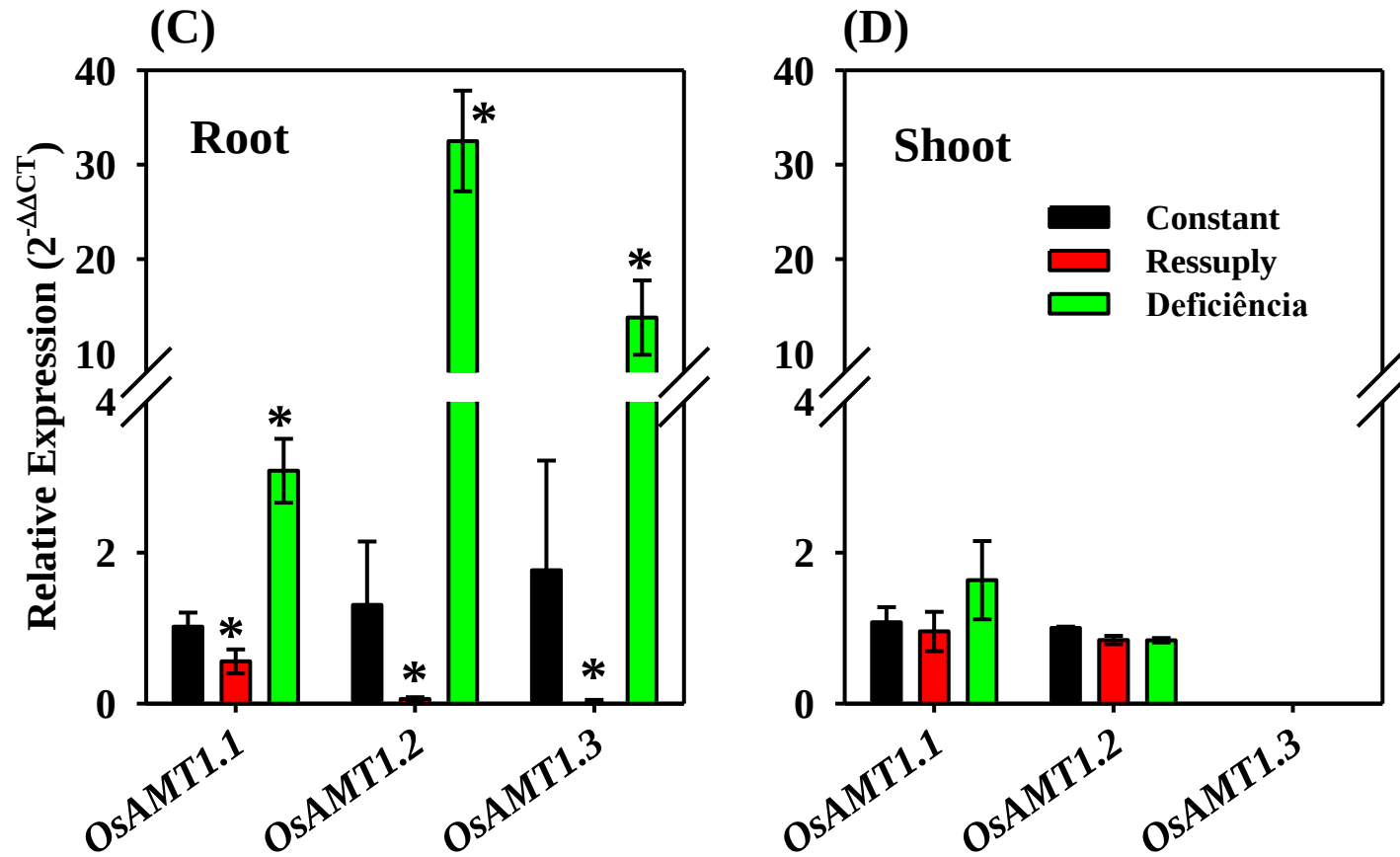
DMS trat = 3,4

DMS N-Serve = 0,32

Transportadores de Amônio

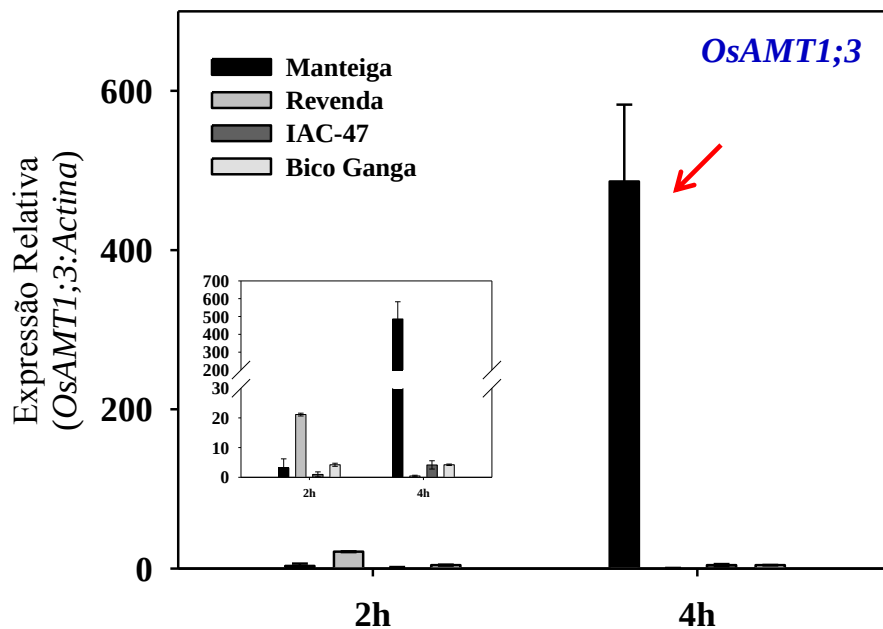
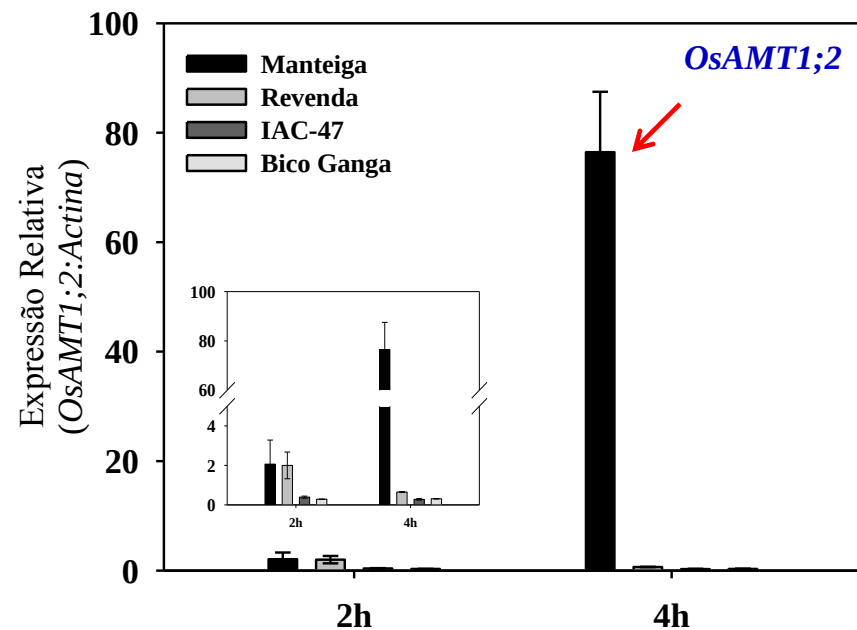
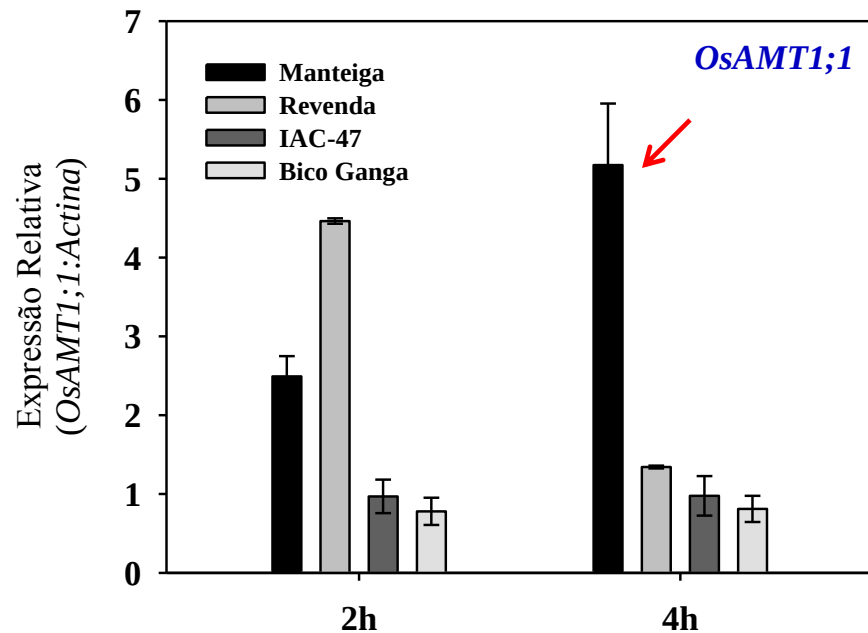


NH_4^+ -N Experiment



Relative gene expression of transporters of NH_4^+ (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* and *OsAMT1.3*) in rice (Nipponbare)

(Sperandio et al., 2010)



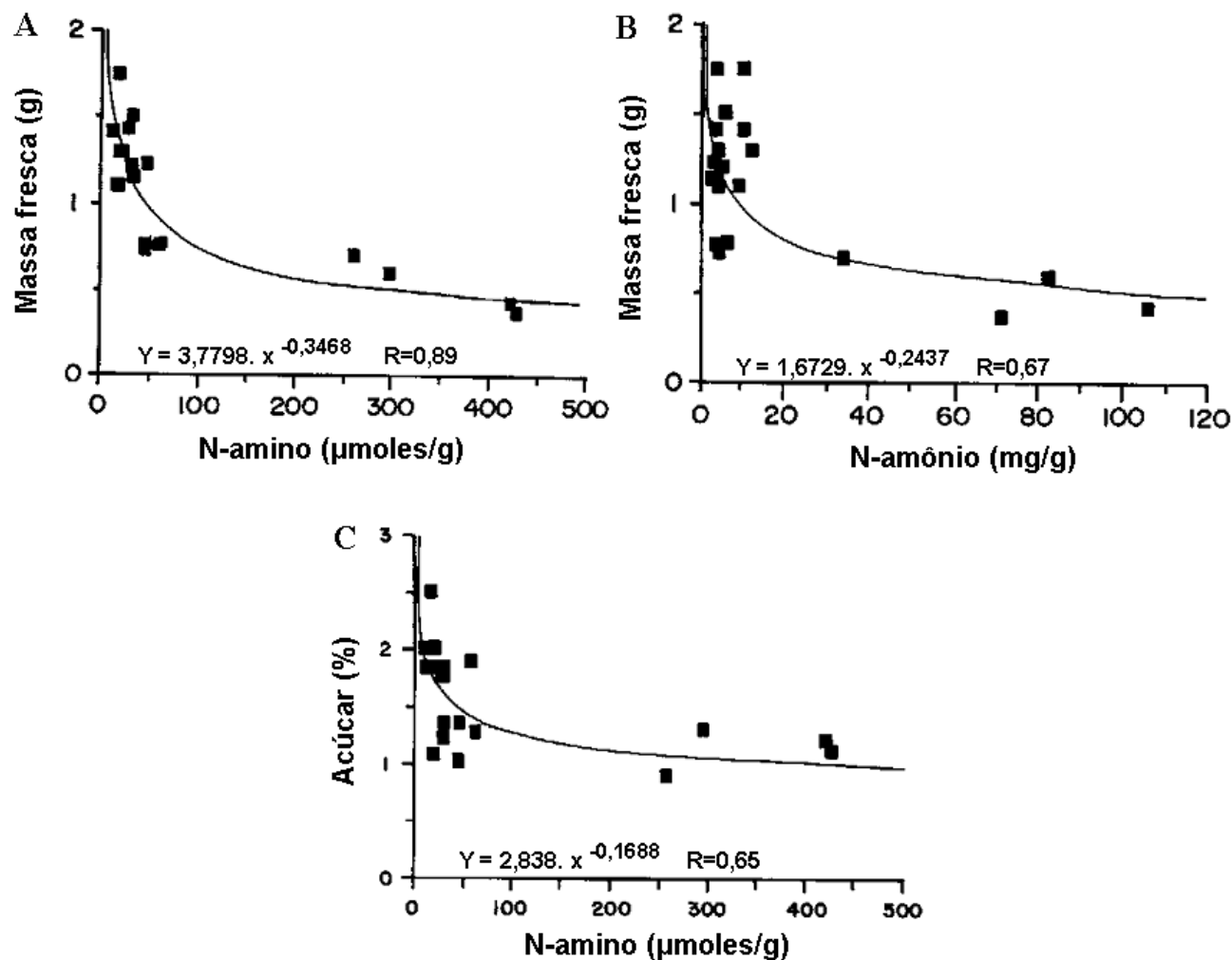
Expressão de transportadores de amônio (AMTs) de alta afinidade em quatro variedades de arroz.

Estudos com plantas superexpressando o OsAMT1.3 (UBIL:OsAMT1.3:3xHA)

Tabela 1. Parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M) da absorção de N-NH_4^+ de plantas de arroz da variedade Nipponbare: duas linhagens (L#2 e L#8) superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3*, e a planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 e 2,0 mmol L^{-1}) após 72 horas de privação de N.

Plantas cultivadas com N - NH_4^+						
Tratamento				Linhagens		
	WT	L#2	L#8	WT	L#2	L#8
	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)			K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
0,2 mM	9,28ab*	7,68b	9,39a	24,52a	18,04ab	11,68b
2,0 mM	27,14ab	35,60a	20,17b	1385,11a	1397,45a	1063,05b

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de significância.

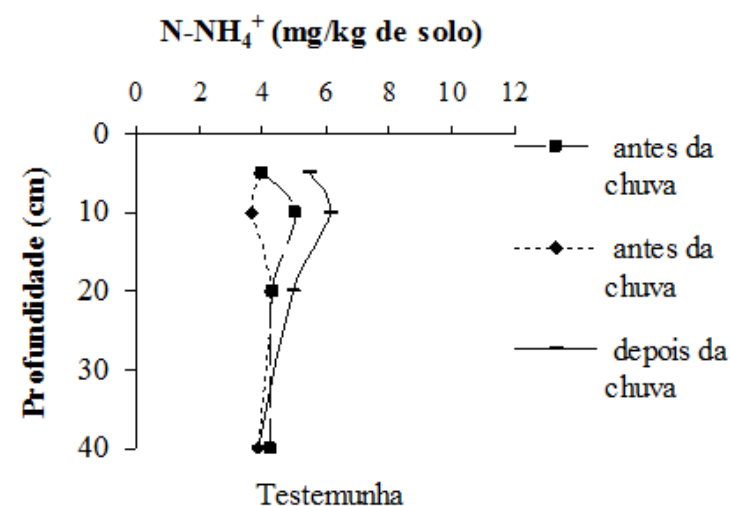
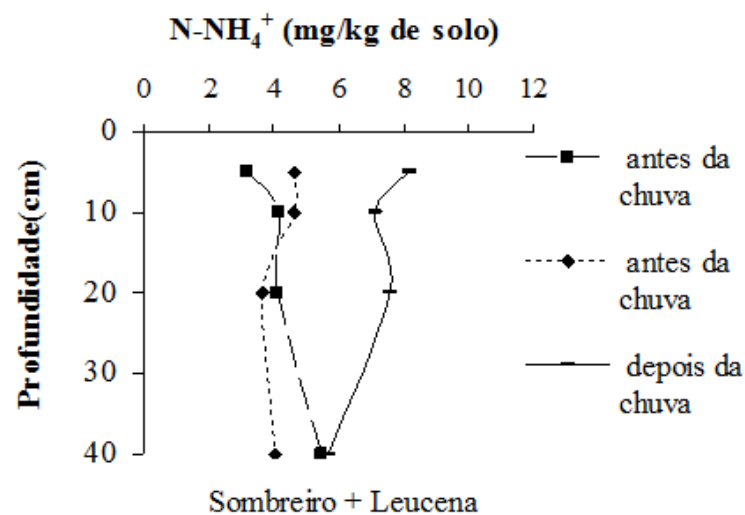
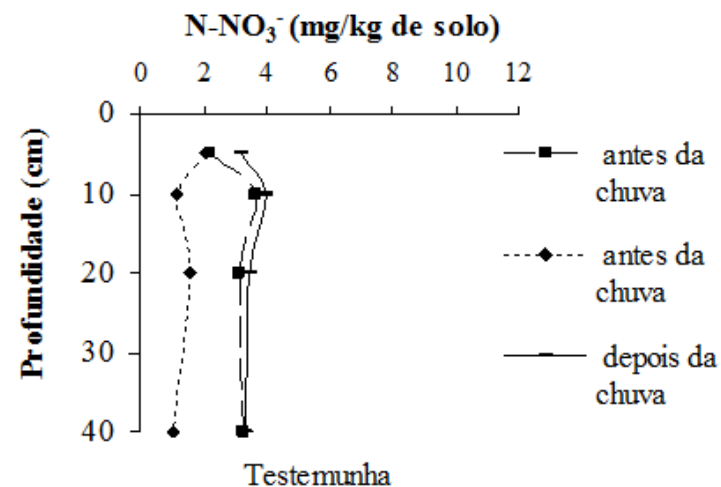
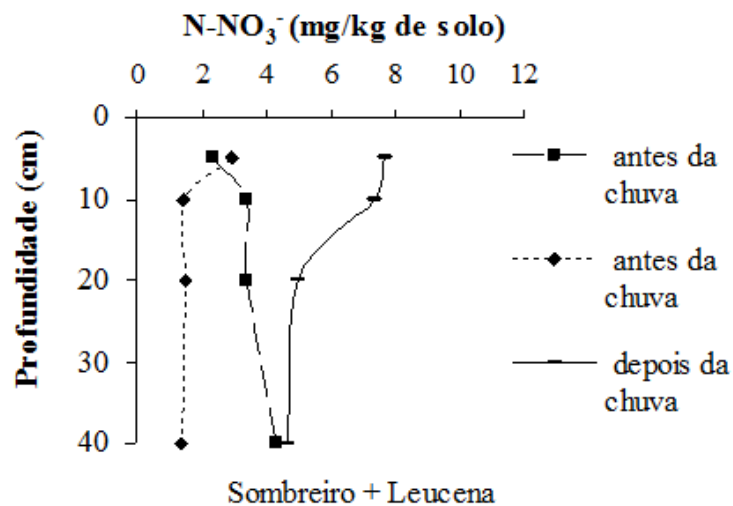


Relações entre os teores de N-amino e matéria seca (A); N-amônio e matéria fresca (B); e N-amino e açúcares solúveis (C) em arroz cultivado com alto nível de N-NH_4^+ (150 mg/L).

Efeitos de baixa luz (17,3 Klux) e alta temperatura (35°C) na composição de aminoácidos e razão N-amino e N-amida em plantas de arroz submetidas a dois níveis de nitrato e amônio (20 e 150mg/L).

Aminoácidos	N-NO ₃ ⁻		N-NH ₄ ⁺	
	20 mg N/L	150 mg N/L	20 mg N/L	150 mg N/L
	% do total			
Aspartato	10,6	5,1	1,4	2,3
Glutamato	25,1	16,3	5,5	5,0
Asparagina	3,9	11,2	26,7	12,5
Glutamina	12,3	21,5	54,7	70,5
Relação N-Amino/N-amida	5,17	2,06	0,23	0,20
Total de aminoácidos (μmoles. g ⁻¹ peso fresco)	12,80	17,93	124,50	173,00

(Adaptado de Fernandes, 1974).

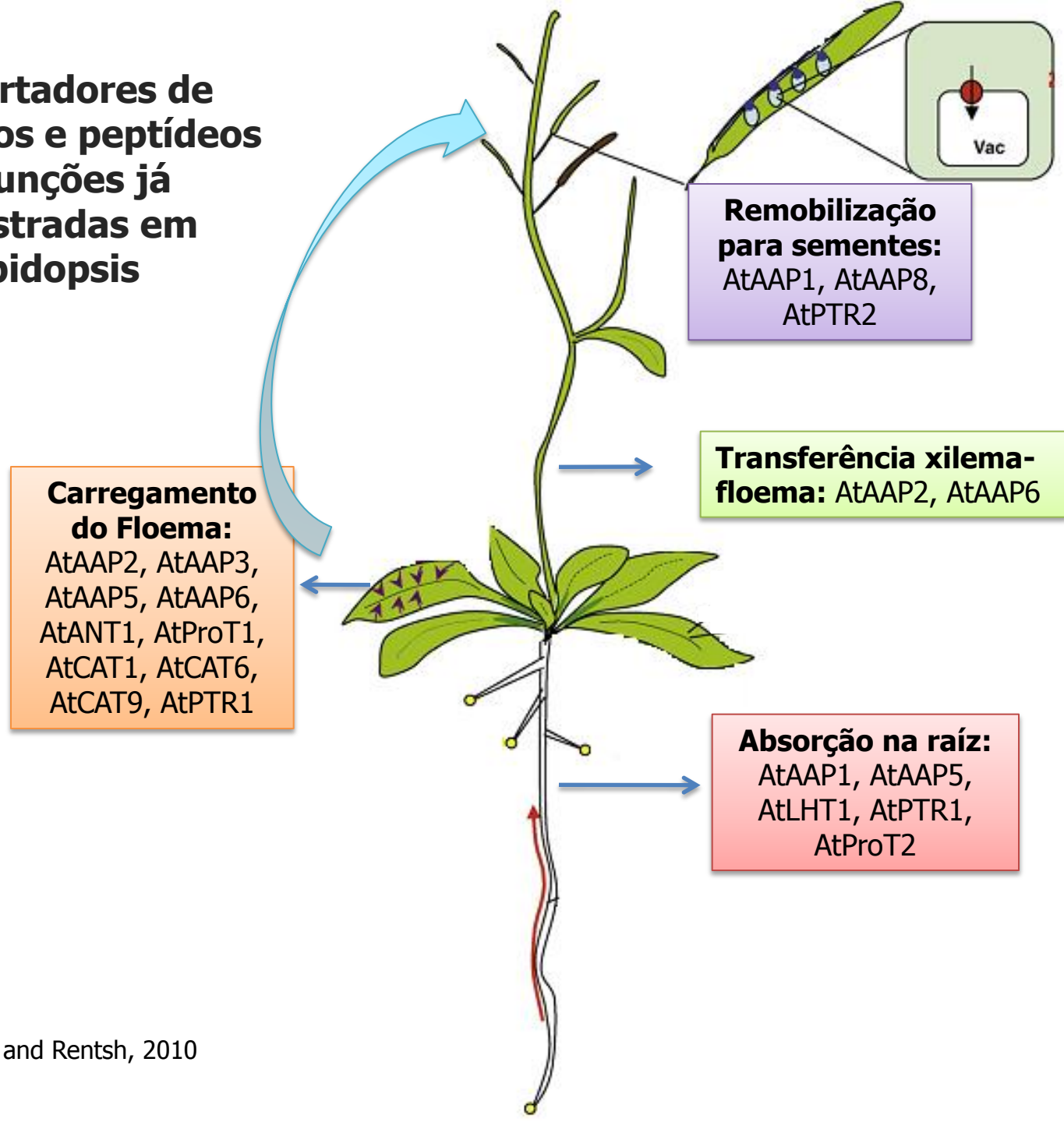


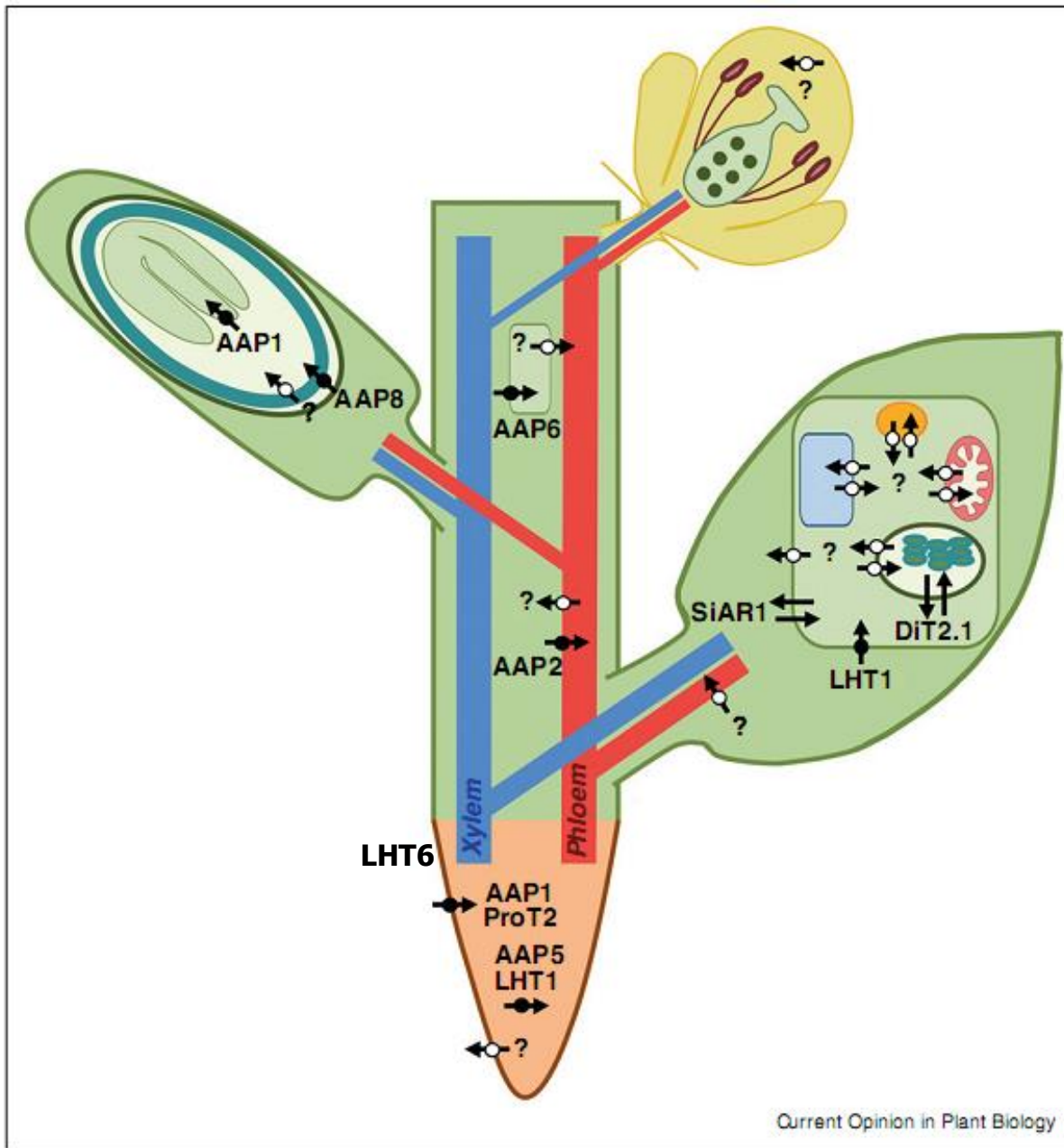
Teores médios de N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺ em amostras de solo em diferentes profundidades, no início da estação chuvosa (Janeiro) no ano de 2008 em uma área cultivada com sistema de manejo em aléias no município de São Luis, MA (Araújo, 2011)

	Sistema de Manejo						
	Aléias			Roça no toco			
	Antes da chuva (1° coleta)	Antes da chuva (2° coleta)	Depois da chuva (1° coleta)		Antes da chuva (1° coleta)	Antes da chuva (2° coleta)	Depois da chuva (1° coleta)
(N-NO₃⁻) mg.kg⁻¹ de solo	2,02	2,33	3,14		1,97	2,16	3,61
(N-NH₄⁺) mg.kg⁻¹ de solo	6,49	6,09	7,55		5,53	7,19	7,72

(Araújo, AM. 2010)

Transportadores de aminoácidos e peptídeos com funções já demonstradas em *Arabidopsis*





Transportadores de Aminoácidos

Perchlik et al., 2014

Expressão de GDH de *Sclerotinia sclerotiorum* em Arroz

Mol Biol Rep (2014) 41:3683–3693

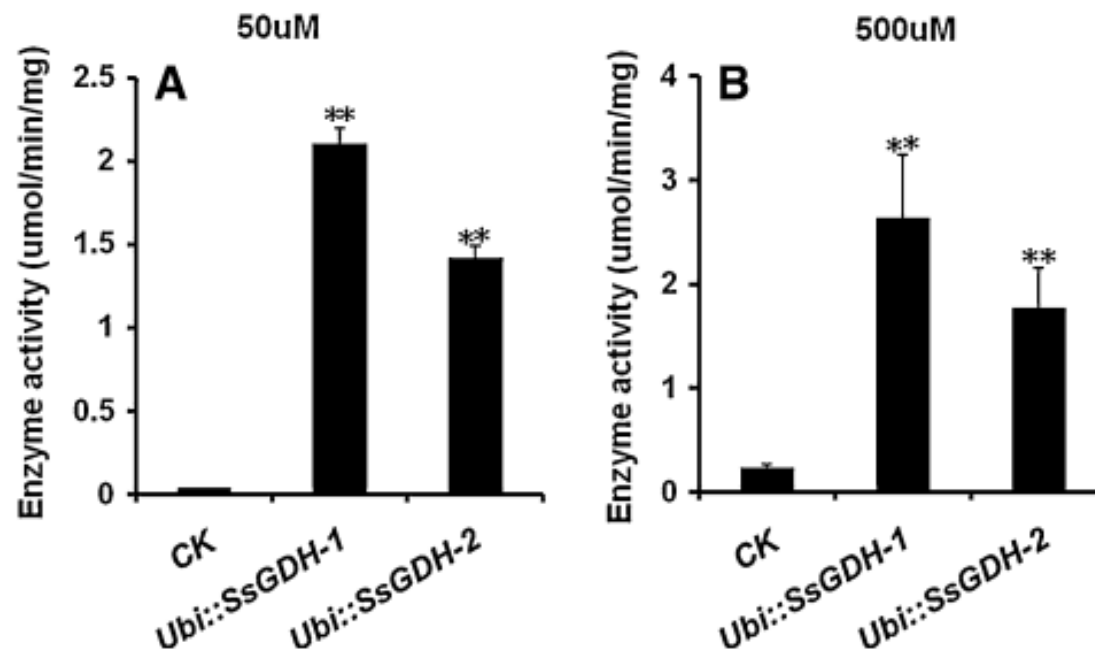


Fig. Atividade de SsGDH em Arroz

Obrigado!

MANLIO SILVESTRE FERNANDES
manlio@pq.cnpq.br

Setembro/2014